

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**TATLI SU BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN  
LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER  
BİYOLOJİK TANISI VE GÖKKUŞAĞI  
ALABALIĞINDA PROBİYOTİK OLARAK  
KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Zübeyde HANOL BEKTAŞ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsun B. UÇAR**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 401.01.04**

**Sunuş Tarihi:02.12.2016**

**Bornova-İzmir**

**2016**



**Zübeyde HANOL BEKTAŞ** tarafından **Doktora Tezi** olarak sunulan “**Tatlı Su Balıklarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Biyolojik Tanısı ve Gökkuşığı Alabalığında Probiyotik Olarak Kullanılabilme Potansiyellerinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 02.12.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı :** Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

.....

**Raportör Üye:** Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

.....

**Üye :** Prof. Dr.Semra CİRİK

.....

**Üye :** Prof. Dr. Mustafa ALPARSLAN

.....

**Üye :** Doç.Dr.Şengül BİLGİN

.....



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Tatlı Su Balıklarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Biyolojik Tanısı ve Gökkuşuğu Alabalığında Probiyotik Olarak Kullanılabilme Potansiyellerinin Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

02/12/2016

**Zübeyde HANOL BEKTAŞ**



**ÖZET****TATLI SU BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT  
BAKTERİLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK TANISI VE  
GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA PROBİYOTİK OLARAK  
KULLANILABİLME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HANOL BEKTAŞ, Zübeyde

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

Aralık 2016, 198 sayfa

Su ürünleri dünyada ekonomik olarak önemli bir endüstri haline gelmiştir. Bu yüzden küresel su ürünleri yetiştiriciliğinin amacı üretimde verimliliği maksimuma çıkarmaktır. Dünyada artan gıda ihtiyacını karşılamak için su ürünlerinde yoğun bir üretim olmaktadır bu da hastalıkların oluşmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. Hastalıkların oluşması ise stokların azalmasına neden olan en önemli etkenlerdendir.

Balık hastalıklarının kontrolünde antibiyotikler yoğun olarak kullanılmaktadır fakat bunlar dirençli patojenlerin gelişip yayılmasına neden olmaktadır. Bu durum dirençli bakterilerin sucul ortamdan insanların patojen içermeyen bağırsak sistemine geçmesi gibi bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle son yıllarda alternatif metotlar kullanılmaktadır. Son yıllarda laktik asit bakterileri su ürünlerinde önemli bir ilgi alanına sahip olmuştur çünkü hastalıkların önlenmesinde çoğu laktik asit bakterisi probiyotik olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda iyi probiyotik özelliklere sahip laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve probiyotik özelliklerinin belirlenmesi çok önemlidir.

Araştırmamızda tatlı su balıklarından izole edilmiş laktik asit bakterilerinin fenotipik ve biyokimyasal tanınması ve daha sonra moleküler biyolojik tanıları gerçekleştirilerek probiyotik özellikleri yansıtan antagonistik aktivite, pH'ya tolerans, safra tuzuna tolerans ve hidrofobisite yeteneklerine bakılarak bunlardan en iyi özelliğe sahip olanların gökkuşağı alabalığında potansiyel probiyotik olarak kullanılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, fenotipik ve moleküler tanılaması yapılan 75 bakteri strainin antagonistik aktiviteleri incelenmiştir. Bunlardan en iyi antagonistik aktiviteye sahip olanlar daha sonra probiyotik özellikler açısından incelenmiştir. Yapılan incelemelerde, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* 49156, *Escherichia coli* O157H7, *Salmonella typhimurium* 14928 gibi patojenlere karşı en iyi antagonistik aktiviteyi gösteren strainler F2, F4, F6, F7, F8, F9, F10, F38, F39, F54, F69, ve F75 numaralı izolatlar *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ve F14 *Lactococcus lactis* olarak tanılanmıştır. Daha sonra bu izolatların, Doxycycline, Enoxacin, Erithromycin, Florfenicol, Trimethoprim, Oxytetracycline, Enrofloxacin, Chloramphenicol, Vancomycin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları, pH1 ve pH3'e toleransı, hidrofobisite yeteneği ve safra tuzuna toleransına bakıldığında en iyi özelliklere sahip olan izolatın F4 numaralı izolat olduğu saptanmıştır. Bu özelliklerden dolayı F4 numaralı izolatın gökkuşağı alabalığı üzerindeki probiyotik özelliklerine bakılmıştır. Bunun için gökkuşağı alabalığı (*O.mykiss*) yavruları probiyotik ilavesiz temel yem ve bu yeme  $10^8$  kob/g oranında probiyotikli yem ile 28 gün beslenerek yaşama oranı ve vücut kompozisyonuna etkileri belirlenmiştir. Deneme sonunda probiyotikli yemle beslenen deneme grubu ve kontrol grubu arasında canlı ağırlık kazancı, canlı ağırlıkça oransal büyüme, boyca büyüme ve boyca oransal büyüme arasında farklılıklar görülmüştür. Yaşama oranlarına bakıldığında ise istatistiki olarak önemli bir fark görülmemiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışma, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bakterisinin ilave edildiği yemle beslenmenin alabalık yavrularının büyümesi açısından olumlu etkiye sahip olduğunu gözlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Lactococcus lactis*, probiyotik, laktik asit bakterisi, moleküler tanılama.



**ABSTRACT****MOLECULAR BIOLOGICAL IDENTIFICATION AND  
INVESTIGATION PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID  
BACTERIA ISOLATED FROM FRESHWATER FISH IN  
RAINBOW TROUT**

HANOL BEKTAŞ, Zübeyde

PhD in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Füsün B. UÇAR

December 2016, 198 pages

Aquaculture has become economically important industry in the world. So the purpose of global aquaculture production is to maximize efficiency of cultivation. There is an intensive production in aquaculture to meet the need for increased food in the world so this makes inevitable the emergence of diseases. The occurrence of the disease among the most important factors causing stocks decline.

The antibiotics are widely used for control of fish diseases, but they cause spread and develop of resistant pathogens. This case poses a risk such as pass of resistant bacteria from the aquatic environment to the intestinal tract which free of pathogens of people. Therefore, alternative methods have been used in recent years. In recent years, the lactic acid bacteria has had a significant interest in aquaculture, because most lactic acid bacteria are used as probiotics in the prevention of diseases. In this regard, identification of lactic acid bacteria with good probiotic properties and determination of their probiotic properties are extremely important.

Due to the importance of lactic acid bacteria in aquaculture, In the research, phenotypic, biochemical and molecular biological diagnostics of lactic acid bacteria isolated from freshwater fish were performed and then pH tolerance, bile salt tolerance and hydrophobicity ability reflecting probiotic properties were evaluated and from these the best feature of which were intended for use as potential probiotics in rainbow trout.

In this research, after phenotypic and molecular determination, antagonistic activity of 75 bacteria strain were investigated. Then the best antagonistic activity of them were analyzed in terms of probiotic properties. In the analysis, the bacteria have the best antagonistic activity against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* 49156, *Escherichia coli* O157H7, *Salmonella typhimurium* 14928 pathogens were F2, F4, F6, F7, F8, F9, F10, F38, F39, F54, F69, 75 (identified as *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) and F14 (identified as *Lactococcus lactis*). Then the isolates were evaluated in terms of Doxycycline, Enoxacin, Erithromycin, Florfenicol, Trimethoprim, Oxytetracycline, Enrofloxacin, Chloramphenicol, Vancomycin antibiotic susceptibility, pH1 and pH3 tolerance and hidrofobicity ability. from these tests the isolates with the best properties was found as F4. Because of these features the probiotic properties of isolate numbered F4 on rainbow trout were examined. For that the rainbow trout fry were feed without probiotic and with probiotic for 28 day to search and survival rates and effects on body compositions were analysed. At the end of the trial the differences between control and treatment groups in terms of weight gain, relative growth rate, size growth and relative size growth rates were observed. When looking at the survival rate, there was no significant statistical difference.

The present research showed that, the feeding with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* have positive effect on rainbow trout fry in terms of growth.

**Keywords:** *Lactococcus lactis*, probiotic, lactic acid bacteria, molecular identification.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenip yürütülmesinde bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Füsün B. UÇAR'a, hiçbir zaman benden yardımlarını esirgemeyen Soner SAVAŐER, Mehmet CİLBİZ, Mustafa CEYLAN, Betül GİRAY ve Yrd. Doç.Dr. Cengiz ÇORBACI'ya, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı eğitim elemanlarına, araştırma görevlilerine, çalışmalarım da benden desteklerini esirgemeyen Eğirdir Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam süresince beni maddi-manevi destekleyen ve bulunduğum yere gelmemde büyük emekleri olan başta eşim Ali BEKTAŞ ve kıymetli aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xii
İÇİNDEKİLER .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxii
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	7
2.1. Türkiye’de Su Ürünleri Sektörü .....	7
2.2. İç Su Balıkları Üretimi ve Tarihçesi .....	10
2.2.1. Alabalık işletme sayısı ve bölgelere göre dağılımı .....	10
2.3. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Karşılaşılan Sorunlar .....	11
2.4. Türkiye’de Görülen Bakteriyel Balık Hastalıkları .....	13
2.4.1. Vibriosis .....	13
2.4.2. Furunculosis .....	14
2.4.3. Goldfish Ülser Hastalığı .....	15
2.4.4. Yersiniosis (Kızılağız hastalığı) .....	15
2.4.5. Kokkal enfeksiyonlar .....	15
2.4.6. Pseudomoniasis .....	16
2.4.7. Photobacteriosis .....	16
2.4.8. Balık hastalıklarını önleme ve tedavi .....	16
2.5. Yetiştiricilikte Mikroorganizmaların Bağırsak Mikroflorasındaki İşlevi .....	18
2.6. Laktik asit bakterileri .....	21
2.6.1. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılmasının Tarihçesi .....	23
2.7. Probiyotik Kavramı .....	35
2.7.1. Sağlıklı bir bağırsağı uyarmak için probiyotiklerin etki yöntemi .....	39
2.7.2. Probiyotiklerin diğer etkileri .....	40
2.7.3. Probiyotik özelliklere sahip bakterileri seçme kriterleri .....	41

2.7.4. Potansiyel Probiyotikerin Konak Üzerinde İn-vivo Değerlendirilmesi.....	49
2.8. Probiyotiklerin Yetiştiricilikte Kullanılması.....	50
2.8.1. Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılan farklı strainler.....	51
2.8.2. Yetiştiricilik için düşünülen probiyotikler .....	53
2.8.3. Su Ürünlerinde Probiyotik Uygulamaları .....	54
2.9. Probiyotik Bakterilerin Tiplendirmesinde Kullanılan Yöntemler .....	60
2.9.1. Fenotipik yöntemler .....	60
2.9.2. Moleküler (genotipik) yöntemler .....	62
2.10. Türkiye’de Probiyotik Laktik Asit Bakterileriyle İlgili Gerçekleştirilen Çalışmalar.....	73
3. MATERYAL VE METOT .....	76
3.1. Materyal .....	76
3.1.1. Kullanılan örnekler .....	76
3.1.2. Kullanılan besiyerleri.....	76
3.1.3. Kullanılan çözelti, tampon ve bileşikler .....	80
3.2. Metot <b>New Text</b> .....	84
3.2.1. Balıklardan Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu.....	84
3.2.2. Laktik Asit Bakterileri İzolatlarının Fenotipik Tanılanması.....	84
3.3. Laktik asit bakterilerinin moleküler identifikasyonu .....	88
3.3.1. DNA izolasyonu ve saflık kontrolü .....	88
3.3.2. Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi ve dizileme, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA).....	89
3.4. İzolatların Potansiyel Probiyotik Özelliklerini Yansıtan Biyoteknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	92
3.4.1. Hidrofobisite .....	92
3.4.2. pH toleransı.....	93
3.4.3. İzolatların Safra Tuzuna Toleransının Belirlenmesi .....	93
3.4.4. Antibiyotik Duyarlılığı.....	93
3.4.5. In vitro antagonism .....	94
3.4.6. Patojenite Testi.....	94
3.4.7. Potansiyel probiyotiklerin balık beslemesinde kullanılması.....	94

4. BULGULAR.....	99
4.1. Fenotipik Tanılama.....	99
4.2. Moleküler Tanılama.....	112
4.2.1. 16S rDNA bölgesinin PCR ve ARDRA PCR ile analizi.....	112
4.3. Tanılanan Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	117
4.3.1. LAB izolatlarının antibakteriyel (antagonistik) aktiviteleri .....	117
4.3.2. pH toleransı.....	119
4.3.3. Safra Toleransı.....	120
4.3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi .....	122
4.3.5. Patojenite Testleri .....	125
4.3.6. Probiyotik Besleme Denemesi.....	125
4.3.7. Probiyotikli yemle beslenen balıklarda patojenle in vivo enfeksiyon.....	126
4.3.8. Probiyotikli Yem Ve Kontrol Yemiyle Beslenen Balıklarda Büyüme.....	126
5. TARTIŞMA.....	134
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	152
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	154
ÖZGEÇMİŞ.....	180





## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1 Laktik asit bakterilerine dahil edilen bazı cinslerin morfolojik özellikleri.....	22
2.2 Latik asit üretimini gösteren homofermentatif yol izi .....	25
2.3 Laktik asit, CO <sub>2</sub> , etanol ve asetik asit üretimini gösteren heterofermentatif yol izi .....	26
2.4 Probiyotik bakteriler tarafından bariyer fonksiyonunun artırılmasının şematik gösterimi .....	49
3.1 Spektrofotometrede yapılan bakteri sayımları sonucu oluşturulan standart eğri .....	96
4.1 MRS’de 22°C’de 48 saat inkübe edilen 4 numaralı izolatın çizgi ekim görünümü.....	100
4.2 22°C’de 48 saat inkübe edilen 4 numaralı izolatın gram boyama görüntüsü (1000X). .....	101
4.3 22°C’de 48 saat inkübe edilen 70 numaralı izolatın gram boyama görüntüsü (1000X). .....	101
4.4 Bakteri izolatlarının oksidasyon/fermentasyon (O/F) testi.....	104
4.5 Bakteri izolatlarının arjinin hidroliz testi.....	104
4.6 Bakteri izolatlarının oksidaz testi (mor renk olanlar oksidaz (+), sarı renkli olanlar oksidaz (-))......	104
4.7 Bakteri izolatlarının H <sub>2</sub> S üretimi .....	105
4.8 Bakteri izolatlarının %2 tuza olan toleransları .....	107
4.9. Bakteri izolatlarının %4 tuza olan toleransları .....	107
4.10 Bakteri izolatlarının % 6,5 tuza olan toleransları .....	107
4.11 16Sr DNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu oluşan band uzunlukları [M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)]. .....	113
4.12 2-75: LAB izolatlarının Msp I ile kesim sonucu oluşan fragmentler (M: Marker (50bp’lik))......	113
4.13 2-75: LAB izolatlarının Hae III ile kesim sonucu oluşan fragmentler (M: Marker (50bp’lik))......	113

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.14 2-75: LAB izolatlarının Hinf I enzimiyle kesim sonucu oluşan fragmentler (M: Marker (50bp'lik)).	114
4.15 16S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu oluşan bant uzunlukları [M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)].	114
4.16 16S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu oluşan bant uzunlukları [M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)].	115
4.17 TSA' da 22°C'de 24 saat inkübe edilen LAB izolatlarının <i>L. garvieae</i> 'ya karşı antibakteriyel aktiviteleri.	118
4.18 TSA 'da 22°C'de 24 saat inkübe edilen LAB izolatlarının <i>Y.ruckeri</i> 'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri.	119
4.19 TSA' da 22°C'de 24 saat inkübe edilen LAB izolatlarının <i>Salmonella typhimirium</i> 'a karşı antibakteriyel aktiviteleri.	119
4.20 22°C'de 48 saat inkübe <i>Lactococcus lactis</i> subsp.lactis (F4 numaralı izolat)'in antibiyotik duyarlılık testi.	124
4.21 22°C'de 48 saat inkübe <i>Lactococcus lactis</i> subsp.lactis (F4 numaralı izolat)'in antibiyotik duyarlılık testi.	124
4.22. Besleme çalışması için kuluçkahaneye getirilen balıkların (a) boy ve kilo ölçümlerinin yapılması (b) ve tanklara yerleştirilmesi	125
4.23. Besleme çalışmasınının 14.gününde patojenle enfeksiyon denemesi.	126
4.24 Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının canlı ağırlık olarak büyüme eğrisi.	127
4.25 Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlıkça oransal büyüme eğrisi (%)	128
4.26. Probiyotik bakteri ilave edilmiş ve kontrol yemlerle beslenen alabalık gruplarının boyca büyüme eğrisi	129
4.27. Probiyotik bakteri ilave edilmiş ve kontrol yemlerle beslenen alabalık gruplarının boyca oransal büyüme (%) eğrisi	130

**ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.28 <i>Yersinia ruckeri</i> ile enjekte edilen deneme grubu balıkların genel sağlık görünümleri.....	131
4.29 <i>Yersinia ruckeri</i> ile enjekte edilen kontrol grubu balıkların genel sağlık görünümleri.....	132
4.30 <i>Yersinia ruckeri</i> ile enjekte edilen kontrol grubu balığın genel sağlık görünümü.....	132
4.31 Deneme grubundaki alabalıkların bağırsak floraları .....	133
4.32 Probiyotikli yemle beslenen balıktan izole edilen 212 numaralı izolatın API 20 STREP test sonucu.....	133



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Türkiye Su Ürünleri Üretimi ve Yetiştiricilik Üretimi .....	8
2.2 Türlere göre su ürünleri yetiştiriciliği üretimi .....	8
2.3 Yıllara göre ülkemiz toplam su ürünleri üretimi (ton).....	9
2.4 Su Ürünleri Yetiştiricilik Tesisleri .....	9
2.5 İşletmelere göre balık üretimi ve kapasiteleri.....	10
2.6 <i>Vibrio</i> spp.'nin konak aralığı ve dağılımı .....	14
2.7 Laktik asit bakterilerinin temel farklı özellikleri .....	22
2.8 LAB ve sınıflandırması.....	27
2.9 <i>Lactococcus</i> cinsinin sınıflandırılması .....	29
2.10 Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar .....	52
2.11 Probiyotiklerin yetiştiricilikteki farklı uygulamaları .....	52
2.12 Probiyotiklerin yetiştiricilikte biyokontrol ajanı olarak seçilmesi için diyagram .....	53
4.1. Laktik asit bakteri izolatlarının izolasyon kaynakları ve inkübasyon koşulları .....	99
4.2 Bakteri izolatlarının bazı fenotipik özellikleri.....	102
4.3 Bakteri izolatlarının bazı fenotipik özellikleri.....	105
4.4 Bakteri izolatlarının biyokimyasal özellikleri .....	108
4.5 Çalışmadan elde edilen bakteri strainlerinin konvansiyonel tanı sonuçları .....	110
4.6 16S rDNA sekans analizi sonucunda elde edilen tanılama sonuçları .....	115
4.7 LAB İzolatlarının Antibakteriyel (Antagonizm) Aktiviteleri.....	117
4.8 İzolatların pH 1 ve pH 3'e olan toleransları .....	120
4.9 İzolatların safraya olan toleransları .....	121
4.10 Antimikrobiyal disk duyarlılık testleri için standartlar.....	123
4.11 İzolatların antibiyotiklere olan toleransları.....	123
4.12 Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlık ortalamları.....	127

**ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)**

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.13 Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlıkça oransal büyüme değeri (%) .....	128
4.14 Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre total boy ortalamaları (cm).....	129
4.15 Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre boyca oransal (OB)(%) değerleri.....	130
4.16 $10^6$ oranında patojenle enfekte edilen kontrol ve deneme grupları arasındaki yaşama oranları.....	131

## 1. GİRİŞ

Dünyada insan nüfusu arttıkça onlar için gıda bulmak karşılaşılan en önemli sorunlardan birisidir. Aynı zamanda yüksek protein içeren sağlıklı bir beslenmede şarttır. Balıklar, kabuklular ya da diğer sucul organizmalar büyüyen insan nüfusunun ihtiyacını karşılamak için yetersizdir. Ticari avcılık yoluyla bu talepleri karşılamak aşırı avcılık dolayısıyla doğal türlerin yok olmasına kadar gitmektedir. Bu yüzden yetiştiricilik hem talepleri karşılamak hem de doğal türlerin devamı için önemlidir. Su ürünleri yetiştiriciliğinin insan tüketimi için sürekli kaynak sağlaması açısından önemi yadsınmaz (Fuller, 1992; Klaenhammer and Kullen, 1999)

Su ürünleri insan beslenmesine katkısı, istihdam oluşturması, sanayiye hammadde temini ve yüksek ihracat potansiyeli nedeniyle ülke ekonomisi için çok önemlidir. Su ürünleri yetiştiriciliği, FAO tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak belirlenmiş olup dünyanın hemen her bölgesinde gelişmekte, yaygınlaşmakta ve yoğunlaşmaktadır. Dünya genelinde su ürünleri üretimi bütün olarak yılda ortalama % 8.8 oranında büyümektedir ki bu değer, diğer tüm gıda için hayvan üreten sektörlerden daha yüksektir. Dünya toplam su ürünleri üretimi 2012 yılında 158 milyon ton olup, bunun 91.3 milyon tonu avcılık, 66.6 milyon tonu ise yetiştiricilik yoluyla elde edilmiştir. Yetiştiricilik yoluyla elde edilen üretim miktarı, toplam üretimin % 42'sini karşılamaktadır (FAO, 2014).

Son zamanlarda dünyadaki balıkçılık üretiminde düşüş su ürünlerine olan talepte ise artış olmuştur. Avcılık üretimindeki azalma hızlı büyüyen kültür balıkçılığı endüstrisiyle telafi edilmeye çalışılmaktadır. Kültür balıkçılığındaki çeşitlilik ve işletme prosedürlerindeki değişikliklerden dolayı balıklar hastalık problemleri ve çevre koşullarının kötüleşmesi gibi stresli koşullara maruz kalmaktadırlar sonuçta bu durum enfeksiyon yapan birçok patojenin ortaya çıkmasına ve ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kültür balıklarının geliştirilmiş hastalık direnci, verimli beslenme ve büyüme performansları çok önemlidir çünkü yetiştiricilikte büyüme performansı ve beslenme verimliliği artarsa dolayısıyla üretim fiyatlarının da düşmesi beklenir (Dada A.A and Olugbemi, 2013).

Yetiştiricilikte büyümei arttırmak ve hastalıkları engellemek amacıyla hormonlar, antibiyotikler, iyonoforlar ve bazı tuzlu bileşikler kullanılmaktadır. Fakat uygun olmayan kullanımlar hormon dengesizliği, zehirlenme, hastalığa yatkınlık ve ekolojik kirlenme gibi düzensizliklere neden olmaktadır. Son zamanlardaki araştırma seçeneklerinde yeni bileşikleri test etmek amacıyla “fonksiyonel katkı” denilen bir kavram gelişmiştir. Bu katkılardan probiyotik denilen mikroorganizmaların yeme katılmasının konak organizmanın karbonhidratlardan kaynaklanan enerji harcanmasını düzelttiği, büyüme için gerekli protein içeriğini arttırdığı ve hastalıklara direnci arttırdığı gözlemlenmiştir. (FAO, 2005; Nomoto, 2005; Klaenhammer and Kullen, 1999; Fuller, 1992).

Laktik asit bakterileri (LAB) son yıllarda su ürünleri sektöründe önemli bir ilgi alanına sahip olmuştur çünkü hastalıkların önlenmesinde çoğu LAB probiyotik olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin ortaya çıkması 3 milyar yıl öncesine dayanmaktadır. Yayılmaları ise 65 milyon yıl önce süt üreten memelilerin ortaya çıkmasıyla olmuştur. Laktik asit bakterileri gr (+), genelde hareketsiz, spor oluşturmayan, fermantasyon ürünü olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Çubuk ve kok şekilli olup genelde katalaz negatifler ve sitokromları yoktur. LAB’leri besin ihtiyacı açısından nazlı olup karbohidrat, amino asit, peptit, nükleik asit türevleri ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar (Ringo and Gatesoupe., 1998a).

Laktik asit bakterilerinin taksonomisi değişmektedir. Bu grup *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weissella*’dır. Birçok laktik asit bakterisi benzer beslenme ve büyüme gereksinimlerine ihtiyaç duyduğu için bunları klasik metotlarla tanılamak çok zordur. Bu yüzden güvenilir ve basit metotlara ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizmaların sayılması ve aranması için geliştirilen moleküler metotlar mikrobiyal çeşitlilik ve doğadaki rolünün anlaşılması için büyük avantaj sağlamaktadır. Mikroorganizmalar genlerindeki benzerliklerine göre gruplandırılabilenekte olup bu evlasyonel ilişkilerini daha iyi yansıtmaktadır. Kompleks çevresel örneklerden mikrobiyal çeşitliliğin keşfinde kullanılan en



güçlü yaklaşımlar 16S rRNA genini kodlayan genlerin klonlanması ve dizilenmesidir (Balcazar et al., 2006a).

Birkaç LAB türünün sağlıklı balıkların normal bağırsak florasını oluşturduğu Ringo (2004) tarafından bildirilmiştir. Balıklarda bulunan bağırsak LAB'leri çok çeşitli olup su çevrelerine göre değişiklik göstermektedirler. Aynı zamanda LAB'leri hem kültür hem de doğal ortamlarda bulunan gökkuşağı alabalıklarının normal florasını oluşturmaktadır (Sanchez et al., 2011; Askarian et al., 2008). *Carnobacteria* gibi diğer laktik asit bakterileri *Salvelinus alpinus*, *Salmo salar* gibi somon balığı türleri ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve kahverengi alabalık (Brown trout) gibi türlerin bağırsaklarından izole edilmiştir (Bucio et al., 2005).

Patojenleri çeşitli mekanizmalarla kontrol eden faydalı bakterilerin ya da probiyotiklerin antibiyotik tedavilerine alternatif olarak kullanılması giderek daha çok gündeme gelmektedir. Probiyotikler bağırsağa çeşitli yollarla girip canlı kalan ve böylece bağırsak mikrobiyal dengesini ve dolayısıyla sağlığı olumlu etkileyen canlı yem katkılarıdır (Gomez et al., 2000). Probiyotiklerin hayvan ve insan beslenmesinde kullanılması uzun süredir biliniyor olup su ürünlerinde kullanılması yakın zamanlarda gerçekleşmiştir.

Yetiştiriciliğin tarihi milattan önce 475'e dayanmaktadır. Şimdilerde yetiştiricilik kazançlı bir endüstri haline gelmiştir. Fakat yetiştiricilik uygulamalarının yoğunlaşması yüksek yoğunlukta kültürasyonu gerektirmektedir. Bu da konsantre organik atıkların atılması dolayısıyla havuzlardaki çözünmüş oksijenin tükenmesi ve sıklıkla ölüme sebep olan hidrojen sülfid, metan, amonyak ve nitrit gibi toksik metabolitlerin oluşmasına sebep olur. Bu yoğun üretim koşulları altında sucul türler hastalık oluşumu ve üretkenlikte verimsizliğe neden olan çok stresli koşullara maruz kalırlar. Viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonların patlak vermesi dünya çapında yıkıcı bir ekonomik kayba neden olur. Buna ek olarak çiftliklerdeki zayıf çevre koşulları, dengesiz besleme, toksinlerin oluşumu ve genetik faktörler stoklarda yüksek oranda mortaliteye neden olur. Son yıllarda hayvan hastalıklarının kontrolü ve engellenmesi kimyasal katkıları, seçicilik, çoğalma ve bakteriyel dirençlilik oluşturarak halk sağlığını

riske sokan özellikle antibiyotik gibi veterinerlik ilaçları kullanılmıştır. Antibiyotik dirençliliği iki yolla kazanılmaktadır. Kromozomal mutasyon ya da plazmit kazanılmasıyla elde edilmektedir. Kromozomal mutasyon diğer bakterilere transfer edilmez fakat dirençli plazmitler çok hızlı transfer edilirler. Bu da halk sağlığı açısından çok tehlikeli olabilmektedir (Cruz et al., 2012).

Kimyasalların su ürünlerinde yüksek oranda kullanımı hastalık kontrolünde alternatif metotların kullanılmasıyla ilgili araştırmaları gündeme getirmiştir. Antibiyotikler hayatta kalmayı sağlamasına rağmen dirençli bakterilerin oluşmasına ve insan sağlığı üzerinde tahmin edilemeyen uzun süreli etkilere sebep olmaktadır. Bağırsak sisteminin kompleks mikrobiyal ekolojisi beslenmede faydalı olup patojenlere karşı korumayı sağlayıp çevre ve faydalı bağışıklık yanıtla etkileşiminin düzenlenmesinde hayati önem taşımaktadır. Probiyotikler genelde sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının üyeleridir bu yüzden yetiştiricilikte antibiyotiklerin kullanımını azaltmak için alternatif olarak kullanılabilirler. Çünkü probiyotiklerin ortama eklenmesi bozulmuş bir mikrobiyotanın normal faydalı kompozisyonuna dönüşmesini sağlar (Balcazar et al., 2006a).

Probiyotiklerin kullanımındaki temel yaklaşım, hayvanlardan uygun özellikli bağırsak bakterisini izole etmek ve doğal olmayan benzer türler için yemde bu bakterileri fazla sayıda tutmaktır. Çoğu probiyotik laktik asit bakterileriyle ilişkilidir (Nousiainen and Setälä, 1993). Bunun sebebi, bu bakteriler sık sık bakteriosinleri ve patojenik bakterinin gelişmesini engelleyen diğer kimyasal bileşenleri üretmektedirler (Pilet et al., 1995; Dulluç, 2010). Genellikle probiyotik strainler sucul hayvanların eksojen ya da endojen kısımlarından izole edilmektedir. *Vibrio* ve *Pseudomonas* gibi gram (-) fakültatif anaerobik bakteriler deniz hayvanlarının dominant mikrobiyotasını teşkil eder. Tatlı su hayvanlarının doğal mikrobiyotasında ise *Enterobacteriaceae* familyasının temsilcileri olan *Aeromonas* ve *Plesiomonas* genuslarıyla obligat anaerobik *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* genuslarıdır. Laktik asit üreten bakteriler memeli ve kuşların bağırsağında yaygın olup, balıklarda subdominanttır ve genelde *Carnobacterium* genusunun üyeleriyle temsil edilirler (Ringo and Vadstein, 1998; Panigrahi ve Azad, 2007).

Yetiştiricilikte probiyotikler ve faydaları ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte türe spesifik faydalı preparasyonlar çok fazla kullanılmaya başlanmıştır. Bu preparasyonlar hastalık önlenmesi gibi spesifik faydalar gösterip stabil sağlıklı bir bağırsak çevresi ve bağışıklık sistemi elde etmek için doğal bir element sunar. Sucul organizma üretiminin artırılması için iyi bir yönetim ve probiyotikleri içeren güçlü hastalık önleyici bir program uygulanabilir (Lara-Flores, 2011). Bazı çalışmalarda probiyotiklerin sucul çevrelerdeki belirli etki mekanizmaları kanıtlanmıştır. Be etkileri şöyledir: yem dönüşüm oranının ve yem kullanımının artırılması, patojenik bakterilerin tutunmasını engelleyen bağırsak mukozasına tutunma kapasitesini sağlaması ve bazı patojenik floraların büyümesini engelleyen antibiyotik benzeri ya da demir bağlama ajanı olarak bilinen ürünler üretmeleri gibi yararlar sağlarlar. Hatta su kalitesini iyileştirmeleri ve red-tide plankton problemlerini engelleme gibi avantajları vardır. Balıklarda gerek ticari gerekse potansiyel probiyotik bakteri kullanımı hakkında pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmayla ilgili olarak Brunt ve arkadaşları (2005) probiyotikleri gökkuşağı alabalıklarındaki lactococcosis ve streptococcosisi kontrol etmek için kullanmışlardır. Çalışmada *Aeromonas sobria* GC2'yi gökkuşağı alabalığının sindirim sisteminden izole edilerek alabalıkların yemine  $5 \times 10^7$  hücre/g yem oranında eklenerek 14 gün boyunca beslenmesinde kullanmışlardır. Deneme sırasında *Lactococcus garvieae* ve *Streptococcus iniae* ile enfekte edildiklerinde probiyotiklerin eklenmediği kontrol grubunda ölüm oranı %75-100 oranındayken probiyotiklerin eklendiği grupta ise bu oranın %0-6 olduğu görülmüştür. Araştırmacılar etki mekanizmasını doğal bağışıklığın uyarılmasına dayandırıp; lökosit sayısının artması ve fagositik ve solunum patlama aktivitesinin artmasına bağlamışlardır. Tüm bu nedenlerden dolayı yeni probiyotiklere olan ihtiyaç ve hastalıklarla mücadele etmek için bu çalışmada sağlıklı görünen tatlı su balıklarının mikrobiyotasının antibakteriyal aktivitesi, hidrofobisite, pH ve safra tuzu toleranslarına bakılarak özelliklerinin tanılanması ve karakterize edilmesi ve bunların varsa izole edilen patojenlere karşı potansiyel probiyotik olarak kullanılması ve en sonda probiyotik özelliğe sahip bakterilerin ticari balık yemine katılarak gökkuşağı alabalığının büyüme ve hayatta kalma oranı üzerindeki etkisine bakılması amaçlanmıştır. Probiyotik araştırılmasının bir nedeni de yoğun üretimin farklı dönemlerinde görülen hayatta kalma problemleriyle başa çıkmaktır çünkü aşının kullanılmadığı ilk zamanlarda

mecburen antibiyotik kullanılmaktadır bu da çevresel problemlere ve dirençli bakterilerin gelişmesine neden olmaktadır. Bu yüzden çevre dostu çözümlerin üretilmesi gerekmektedir. Bundan başka bu çalışmayla ülkemizdeki işletmelerde ekonomik kayıplara neden olan patojen bakterileri inhibe edebilen bakterilerin tespiti ve belirlenen potansiyel probiyotiklerin çoğaltılması, geliştirilip üretilmesi ve en önemlisi de pratikte kullanılacak ve ekonomik olarak geri dönüş sağlayacak veriler elde edilerek sonuçların su ürünleri yetiştiricilik sektöründe kullanılabilmesini sağlamak da amaçlanmaktadır.



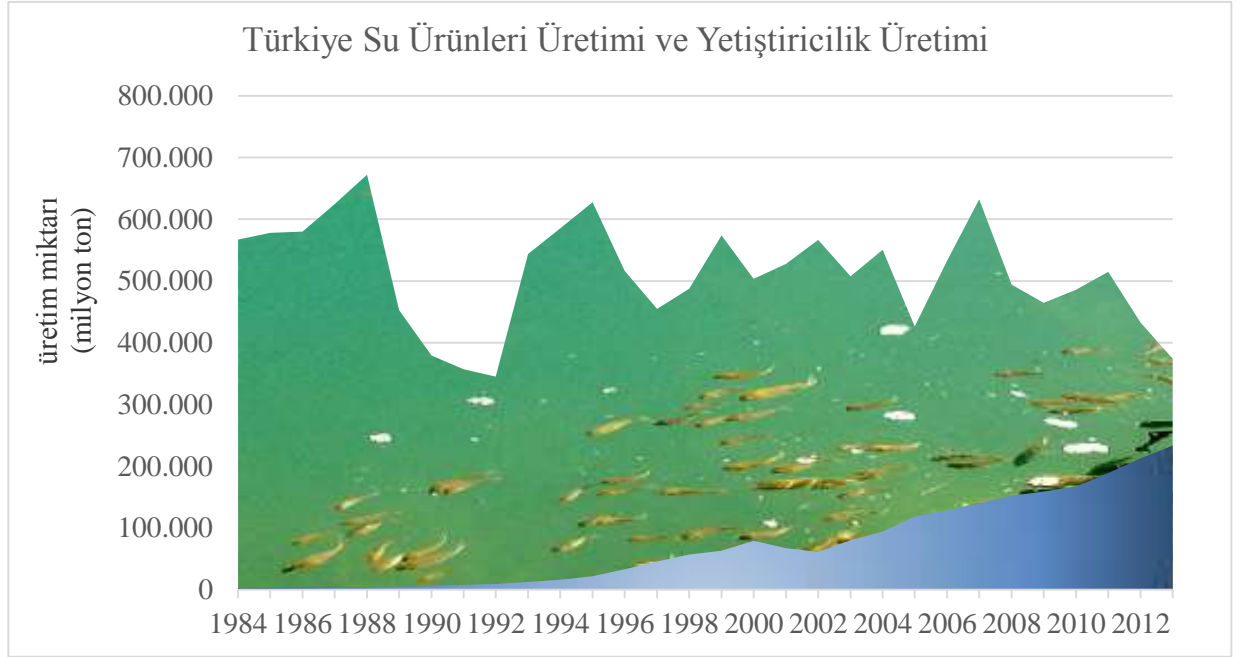
## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Türkiye’de Su Ürünleri Sektörü

Dünyadaki gelişmeler paralelinde Türkiye su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler gözlenmektedir. Ülkemiz, sahip olduğu coğrafik konum itibarı ile gerek deniz, gerek acı su ve gerekse tatlı su potansiyeli bakımından önemli bir konumdadır. Adalar da dâhil olmak üzere 8.333 km kıyı şeridinde sahip olup, yaklaşık 25 milyon ha denizalanı yanında 200 doğal göl, 293 adet baraj gölü ve 1000 adet göletin toplam yüzey alanı 1,4 milyon ha’dan fazladır. Ayrıca ortalama 177 bin km uzunluğundaki 33 adet nehirle birlikte toplamda 26 milyon hektarlık su ürünleri üretim alanına sahiptir. Türkiye, sahip olduğu iklim ve su koşullarının su ürünleri yetiştiriciliğine uygun olmasından dolayı su ürünleri kaynakları, gerek hayvansal gerekse bitkisel protein temini, istihdam sahası oluşturması ve döviz girdisi sağlama açısından büyük bir sosyo-ekonomik öneme sahiptir (Doğan, 2003).

Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinin geliştirilmesi genel bir politika olarak benimsenmiştir. Kalkınma Planları’nda su ürünlerinde sürdürülebilir üretimin artırılması amacıyla; doğal kaynakların rasyonel kullanımının sağlanması, yetiştiricilik ve açık deniz balıkçılığının geliştirilmesi ön görülmektedir. Su ürünleri ıslah ve yetiştiriciliği, kaynaklarımızın rasyonel kullanımı, üretim artışı, artan su ürünleri talebinin karşılanması, doğal stokların desteklenmesi, yeni istihdam imkânlarının yaratılması ve ihracatın geliştirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Balıkların bağımsızlık düzeylerinin yükseltilmesi, ekosistem yaklaşımı yetiştiricilik metodlarının araştırılması ve organik balık yetiştiriciliği araştırmaları ülkemiz yetiştiriciliği açısından önem arz etmektedir (I. Balıkçılık Çalıştayı Sonuç Raporu, 2013).

Deniz ve içsu kaynaklarımızın toplam yüzey alanı toplam tarım alanlarımıza yakındır. Bu nedenle balıkçılık kaynaklarının etkin kullanımı ülkemiz açısından büyük önem taşımaktadır. 2013 yılı su ürünleri üretimimiz 607.515 ton/yıl olarak gerçekleşmiş olup bu üretimin %61,6’sı avcılık yoluyla, %38,4’ü de yetiştiricilikten elde edilmiştir.

**Çizelge 2.1** Türkiye Su Ürünleri Üretimi ve Yetiştiricilik Üretimi (TUİK, 2013)**Çizelge 2.2** Türlere göre su ürünleri yetiştiriciliği üretimi (TUİK, 2013).

	Alabalık	Sazan	Deniz çipurası	Deniz levreği	Midye	Diğer	Toplam üretim
2005	49.282	571	27.634	37.290	1.500	2.000	118.227
2006	57.659	668	28.463	38.408	1.545	2.200	128.943
2007	61.173	600	33.500	41.900	1.100	1.600	139.873
2008	68.649	629	31.670	49.270	196	1.772	152.186
2009	80.886	591	28.362	46.554	89	2.247	158.729
2010	85.244	403	28.157	50.796	340	2.201	167.141
2011	107.936	207	32.187	47.013	5	1.442	188.790
2012	114.569	222	30.743	65.512	-	1.364	212.410
2013	128.059,50	145,5	35.701	67.912,50		1.575,30	233.394

**Çizelge 2.3** Yıllara göre ülkemiz toplam su ürünleri üretimi (ton) (TUİK, 2013).

	Avcılık üretimi		Yetiştiricilik üretimi				Toplam üretim		
	Deniz	%	İç Su	%	Deniz	%	İç su	%	
2008	453.13	70.1	41.01	63	85.629	13.3	66.557	10.3	646.310
2009	425.06	68.2	39.17	63	82.481	13,3	76.248	12,2	622.962
2010	445.60	68.2	40.29	62	88.573	13,6	78.568	12	653.080
2011	477.68	67.9	37.07	53	88.344	12,5	100.46	14.3	703.545
2012	396.32	61.5	36.10	56	100.83	15.6	111.57	17.3	<b>644.852</b>
2013	339.07	55.8	35.04	58	123.09	20.2	110.35	18.2	<b>607.515</b>

2013 yılı üretim rakamlarına bakıldığında denizlerden 339 bin ton, iç sulardan 35 bin ton ve yetiştiricilikten 233,4 bin ton üretim gerçekleşmiştir. Yetiştiricilik yoluyla sağlanan üretimin % 52,7'sini deniz balıkları, % 47,3'ünü tatlı su balıkları oluşturmaktadır. Yıllar itibariyle su ürünleri üretimi incelendiğinde, deniz ve iç sulardan elde edilen üretimde dalgalanmalar görülürken, yetiştiricilikte hızlı bir artışın gerçekleşmesi dikkat çekmektedir.

**Çizelge 2.4** Su Ürünleri Yetiştiricilik Tesisleri (TUİK, 2013)

Su Ürünleri Yetiştiricilik Tesisleri (2013)				
Faaliyet Alanı	Adet	Proje kapasitesi (ton/yıl)	Üretim miktarı	Atıl
İçsu	1.935	245.166	123.019	122.147
Deniz	418	217.494	110.375	107.119
Toplam	2.353	462.660	233.394	229.266

Ülkemizde 1.935 adet ve toplamda 245.166 ton/yıl üretime sahip iç su işletmesi ile 418 adet toplam 217.494 ton/yıl üretime sahip deniz işletmesi bulunmaktadır.

Ülkemizde ilk iç su işletmesi (Alabalık) 1970 yılında kurulmuştur. İlk kuluçkahane 1985 yılında İzmir’de Özel sektör tarafından kurulmuştur. 1990-1995 yılları arasında İzmir Muğla, Adana ve Antalya il sınırları içerisinde 8 adet daha kurulmuş, 1995-1998 yılları arasında İzmir, Çanakkale, Antalya, Muğla Aydın da 8 adet daha özel sektör tarafından kurulmuştur. Bundan başka devlete ait 2 kuluçkahane Antalya ve Muğla illerinde üretime geçmiştir (Çipura, levrek, az miktarda kefal, fangri, sinarit ve lahoz).

## 2.2. İç Su Balıkları Üretimi ve Tarihçesi

Türkiye’de iç su ürünleri yetiştiriciliği ilk olarak alabalıkla başlamış, daha sonra deniz balıkları türlerinin (çipura, levrek) üretimine geçilmiştir. İlk alabalık çiftliği 1970’lerde, deniz levreği ve çipura işletmesi ise 1985 yılında kurulmuştur (Aydın ve ark.,2005) 1970 yılında, yıllık 10 tonla başlayan alabalık üretimimiz, 1980 yılında 190 ton, 1990 yılında 3.212 ton, 2000 yılında 42.572 tona ulaşmıştır (Kanyılmaz ve ark., 2011). 2013 yılı itibarı ile toplam alabalık yetiştiriciliği 122.873 ton, sazan yetiştiriciliği ise 146 ton olarak gerçekleşmiştir (TÜİK, 2013).

**Çizelge 2.5** İşletmelere göre balık üretimi ve kapasiteleri (TÜİK, 2013).

Türler	İşletme (adet)	Kapasite (ton/yıl)
Alabalık	1367	87588,0
Sazan	31	651,5
Alabalık (deniz)	7	5570,0
Çipura-Levrek	332	95785,0
Orkinos	7	5840,0
Midye	4	1925,0
Genel toplam	1748	197359,5

### 2.2.1. Alabalık işletme sayısı ve bölgelere göre dağılımı

Alabalık üretimi gerçekleştirmekte olan işletmeler sayıca incelendiğinde kafes işletmeleri havuz işletmelerine kıyasla daha az sayıda olmasına rağmen



kapasite olarak bakıldığında kafes işletmelerinin daha büyük kapasiteye sahip oldukları görülmektedir. Oran olarak ifade edilecek olursa; Türkiye’de yetiştiriciliği yapılmakta olan gökkuşuğu alabalığının işletme sayısı olarak %19 ‘unu, kapasite olarak da %62’sini kafes işletmeleri oluşturmaktadır. En fazla sayıda kafes işletmesi Doğu Anadolu Bölgesinde yer almakta olup (89 adet) onu 80 işletme ile Akdeniz Bölgesi 31 işletme ile Karadeniz 30 işletme ile İç Anadolu 25 işletme ile Ege ve 2 işletme ile Marmara Bölgesi izlemektedir. İşletmelerin kapasiteleri dikkate alınarak yapılan inceleme neticesinde ise 16062 ton/yıl üretim kapasitesine sahip Akdeniz Bölgesi lider konumda olup onu 13451 ton/yıl üretim rakamıyla Doğu Anadolu Bölgesi 12495 ton/yıl ile İç Anadolu Bölgesi izlemektedir. Ege Bölgesi karasal işletmeler de birlikte düşünüldüğünde en fazla alabalık üretim kapasitesine sahip lider bölge olmasına rağmen alabalık kafes kültüründe 4. Sırada yer almaktadır. En düşük üretim kapasitesine sahip bölge ise Marmara Bölgesi’dir (Emre ve ark., 2007).

Dünyadaki gelişmeler paralelinde Türkiye su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli gelişmeler gözlenmektedir. Ülkemiz, sahip olduğu coğrafik konum itibarı ile gerek deniz, gerek acı su ve gerekse tatlı su potansiyeli bakımından önemli bir konumdadır. Adalar da dâhil olmak üzere 8.300 km kıyı şeridinde sahip olup, yaklaşık 24 milyon ha denizalanı yanında 200 doğal göl, 223’ün üzerinde baraj gölü ve 1000’in üzerinde göletlerin toplam yüzey alanı 1,4 milyon ha’dan fazladır. Ayrıca ortalama 177 bin km uzunluğundaki 33 adet nehirle birlikte toplamda 26 milyon hektarlık su ürünleri üretim alanına sahiptir (Gümüş ve Yılmaz, 2011)

Türkiye, sahip olduğu iklim ve su koşullarının su ürünleri yetiştiriciliğine uygun olmasından dolayı su ürünleri kaynakları, gerek hayvansal gerekse bitkisel protein temini, istihdam sahası oluşturması ve döviz girdisi sağlaması açısından büyük bir sosyo-ekonomik öneme sahiptir (Doğan, 2003).

### **2.3. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Karşılaşılan Sorunlar**

Yetiştiricilik insanların gıda ve besin güvenliği ve protein ihtiyaçlarının karşılanmasını sağlayan teşvik edici ve hızlı gelişmekte olan bir endüstridir. 1970 yılından beri %1.2 avcılık ve %2.8 oranında karasal hayvanlar için et üretimiyle

kıyaslandığında %8.9'luk oranla dünyada en hızlı büyüyen gıda üretim sektörüdür (Zhou and Wang., 2012).

Yıllar içinde dünyada su ürünlerindeki toplam üretim azalıp insanların bu ürünlere olan talebi artmıştır. Su ürünleri avcılığındaki azalma hızlı büyüyen yetiştiricilik endüstrisiyle telafi edilmeye çalışılmaktadır. Kültürlerin arttırılmış hastalık direnci, yem verimi ve büyüme performansı bu endüstrideki çeşitli sektörler tarafından istenen özelliklerdir. Eğer ticari yetiştiricilikte büyüme performansı ve yem verimi arttırılırsa üretim giderleri de azaltılmış olacaktır (Dada A.A and Olugbemi, 2013). Bu yüzden küresel su ürünleri yetiştiriciliğinin amacı üretimde verimliliği maksimuma çıkarmaktır.

Dünyada artan gıda ihtiyacını karşılamak için su ürünlerinde yoğun bir üretim olmaktadır bu da hastalıkların oluşmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. Hastalıkların oluşması stokların azalmasına neden olan en önemli etkenlerdendir (Subasinghe et al., 2009; Bondad-Reantaso et al., 2005; Kesarcodi-Watson et al., 2008) özellikle bakteriyel enfeksiyon hastalıkları balıklardaki ölümün en önemli sebebi olup stokların ciddi oranda azalmasına neden olan başlıca sınırlayıcı faktörler arasındadır (Gomez-Gil et al., 2000; Pieters et al., 2008). Bu sorunun nedeni mikroorganizmalar olarak gösterilmekte ve su ürünleri yetiştiriciliğindeki kontrolü zor görülmektedir ve çözümün bağışıklık ya da reddetme olduğu düşünülmektedir.

Ticari çapta yetiştiricilik yapılması hastalıkların en önemli sınırlayıcı faktörü olmasına sebep olmakta olup sonuçta birçok hastalık etkeni patojenin yaygınlaşmasına neden olmaktadır.

Balıklarda oluşan önemli balık patojenleri ve neden olduğu hastalıklar şöyledir: Furunkulozis (*Aeromonas salmonicida*), Yersiniosis ve enterik kırmızı ağız hastalığı (*Yersinia ruckeri*), Vibriosis (*Vibrio anguillarum*), Photobacteriosis (*Photobacterium damsela* subsp.piscicida), Flavobacteriosis (*Flavobacterium psychrophilum*), Pseudomoniasis (*Pseudomonas* species), Bakteriyal böbrek hastalığı (*Renibacterium salmoninarum*), Streptococcosis (*Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*) Vagococcosis (*Vagococcus salmoninarum*) *Aeromonas hydrophila*'da küçük yüzeyle lezyonlar, pul düşmesi,

hemoraji ve septisemiye neden olmaktadır (Balcazar et al., 2007a; Öztürk ve Altınok, 2014).

## 2.4. Türkiye’de Görülen Bakteriye Balık Hastalıkları

### 2.4.1. Vibriosis

Vibriosis *Vibrio* genusuna ait bakterilerin oluşturduğu bir hastalıktır. Bu hastalık geniş bir dağılım ve dünya çapında bir konakçı yelpazesine sahiptir. Bu hastalık çipura, levrek, salmonid spp., morina (*Gadus morhua*), Avrupa yılanbalığı (*Anguilla anguilla*), kalkan (*Psetta maxima*), ve tilapia (*Oreochromis niloticus*) gibi birçok balıkta ciddi zararlara sebep olmuştur.

Vibriosis’in etkenleri *Listonella anguillarum*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, ve *V. Alginolyticus* olmasına rağmen bu hastalığın ana etkeni *L. Anguillarum*’dır (Austin and Austin, 2012). Şimdiye kadar bu patojenin 10 farklı serotipi (O1-O10) tanımlanmıştır. Serotip1 ve 2 salgınların çoğundan sorumludur. *Vibrio* türleri arasında *L. anguillarum* ilk olarak Baltık Denizi’nde yılan balığının kırmızı zararlısının etiyolojik ajanı olarak Bergamn tarafından 1909 yılında tanımlanmıştır.

Türkiye’de yayınlanan literatüre göre *L. Anguillarum* ilk olarak Muğla’da çipuradan daha sonraki yıllarda ise hastalık etkeni olarak çipuradan, kırmızı porgy (*Pagrus pagrus*) ve gökkuşacağı alabalığından izole edilmiştir (Tanrikul, 2007). Patojen Türkiye’de kontrolsüz balık transferinden dolayı geniş bir dağılım alanına sahiptir (Tablo 1). *Vibrio ordalii* vibriosis’in diğer bir önemli etiyolojik ajanıdır. ABD’de asma somonu (*O. kisutch*)’nda tanımlanmıştır. Bu türün Türkiye’deki ilk izolasyonu ise Muğlada çipuradan yapılmıştır (Akayli, 2001).

**Çizelge 2.6** *Vibrio* spp.'nin konak aralığı ve dağılımı (Öztürk ve Altınok, 2014).

Hastalığın yaygın ismi	Etiyolojik etmenler	Konak	Coğrafik dağılım	Referanslar
Red-pest, Vibriosis, Salt-water furunculosis, Boil disease	<i>Listonella anguillarum</i> ( <i>Vibrio anguillarum</i> )	<i>Sparus aurata</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Salmo salar</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Pagrus pagrus</i> <i>Aulonocara maylandi</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Sparus aurata</i> Mugla <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Mugla Aegean Sea Black Sea Izmir,Mugla,Aydin Antalya Ordu Mugla Istanbul (Aquarium) Mugla, Aydin, Denizli Izmir, Black Sea	Candan (1991) Cagirgan(1993a) Candan (2000) Tanrikul <i>et al.</i> (2004) Korun (2004a) Savaş <i>et al.</i> (2006) Korun and Gokoglu(2007a) Akayli (2007) Aksit and Kum (2008) Canak (2011) Timur <i>et al.</i> (2011)
Vibriosis, Eye disease, Septicemia	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Trachurus trachurus</i> <i>Trachurus mediterraneus</i>	Aegean Sea Aegean Sea Ordu Ordu Mersin Trabzon	Cagirgan (1993a) Cagirgan (1993a) Savaş <i>et al.</i> (2006) Savaş <i>et al.</i> (2006) Ozer <i>et al.</i> (2008a) Boran <i>et al.</i> (2013)
Vibriosis <i>Vibrio ordalii</i>	Vibriosis <i>Vibrio ordalii</i>	<i>Sparus aurata</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Dicentrarchus labrax</i>	Mugla Aegean Region Izmir Canakkale Antalya	Akayli (2001) Turk (2002) Korun (2004a) Tanrikul <i>et al.</i> (2004) Korun (2004a)
Vibriosis	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Sparus aurata</i> <i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Trachurus mediterraneus</i>	Aegean Region Aegean Region Trabzon	Turk (2002) Turk (2002) Boran <i>et al.</i> (2013)
Vibriosis, Eye disease, Granuloma	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Sparus aurata</i>	Mugla Mugla, Izmir	Korun and Akayli (2004) Canak (2011)
Vibriosis	<i>Vibrioparahaemolyticus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aydin	Aydin (2000a)

#### 2.4.2. Furunculosis

*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* frunkulozis'in bilinen etiyolojik etkeni olup bilinen en eski hastalıklardan bir tanesidir. Etiyolojik ajan aynı zamanda tipik *A.salmonicida* olarak bilinip atipik *A.salmonicida* ile karıştırılmamalıdır. Etiyolojik ajanın ilk izolasyonu 1930'lu yıllarda gerçekleştirilmiştir (Austin and Austin., 2012). Frunkulozis kültür salmonlarında yaygın bir hastalık olup balıkçılık endüstrisinde ciddi ekonomik kayıplara neden

olmaktadır. En duyarlı türler salmonlar olmasına rağmen bu hastalık dünya çapında 50 farklı balık türünde görülmüştür. Patojen bakteri Türkiye'nin Marmara bölgesinde gökkuşuğu alabalıklarından izole edilmiştir. Salgın genellikle kuluçkahanelerde görülüp yüksek ölümle sonuçlanmaktadır (Kirkan et al., 2003).

#### **2.4.3. Goldfish Ülser Hastalığı**

Hastalık etkeni *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogens* olup aynı zamanda atipik *A. Salmonicida* olarak bilinir. Atipik *Aeromonas salmonicida* ciprinidlerde önemli bir hastalık etkeni olmaya başlamıştır. Hastalık Avrupa ülkeleri, Amerika ve Avustralyayı içeren geniş bir alana dağılmıştır. Birkaç salgın Türkiye'de de gözlenmiştir. Patojenin ilk bildirisi gökkuşuğu alabalığından 2001 yılında Korun ve Timur tarafından yapılmıştır.

#### **2.4.4. Yersiniosis (Kızılağz hastalığı)**

Hastalık son yıllarda gerek bölgemizde gerekse tüm ülkedeki balık işletmelerinde görülmektedir. Bölgemizde hastalık tatlı su alabalık işletmelerinde, denizde kafeslerde yetiştiriciliği yapılan levrek ve alabalıklarda izole edilmiş olup salmonidlerde görülen en önemli hastalıklardandır (Austin and Austin, 2012).

Bu hastalık yaz aylarında ve ani su sıcaklığı değişikliklerinde ortaya çıkmakta ve özellikle yavru ve genç balıklarda yüksek ölüm yapmaktadır. Erken teşhis durumunda hastalık kontrol altına alınabilmektedir. Ayrıca hastalığa karşı koruyucu aşılama da yapılabilmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014).

#### **2.4.5. Kokkal enfeksiyonlar**

Streptococcosis farklı genus ve türlerin neden olduğu bir hastalıktır. Sıcak su streptokokkozisi olarak bilinen hastalığa (15°C'nin üzerinde ölümlere neden olur) neden olan bakteriler *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis* and *Streptococcus agalactiae*'dir. Diğer bir hastalık Vagococcosis olup (15°C'nin altında ölümlere neden olur) *Vagococcus salmoninarum* bakterisinin neden olduğu bir hastalıktır. Anaç ve genç kalkan

balıkları ile levrek ve alabalıklarda hastalık izole edilmiştir. Hastalığa neden olan birçok streptokok suşu bulunmaktadır. (Öztürk ve Altınok, 2014).

#### 2.4.6. Pseudomoniasis

*Pseudomonas* türlerinin neden olduğu bir hastalıktır. *Pseudomonas spp.* hem tatlı su hem de tuzlu su balıklarının normal florasında bulunur. Bu bakterinin fırsatçı bir patojen olabileceği düşünülmektedir. Çoğu zaman *Pseudomonas spp.* Diğer bakterilerle birlikte izole edilmektedir. Örneğin alabalık *Y. ruckeri* ile enfekte olduğunda hem *P. Pseudoalcaligenes* hem *Y. ruckeri* birlikte izole edilmişleridir. *Pseudomonas spp.* nin sekonder enfeksiyon olabileceği düşünülmektedir. Bu genusun patojen türleri *P. Chlororaphis*, *P. Anguilliseptica*, *Ps. Fluorescens*, *Ps. Putida*, *Ps. Plecoglossicida*, *P. Aeroginasa* ve *P. Luteola*'dır (Kayis et al., 2009).

#### 2.4.7. Photobacteriosis

Pseudotuberculosis olarak da bilinen hastalığın etkeni *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'dır. İlk olarak Amerika'da Chesapeake körfezinde çipura ve levrekten izole edilmiştir. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Türkiye'de birçok balık türünden izole edilmiştir. İlk kez Ege Bölgesi'nde çipuradan daha sonra kefal ve gökkuşuğu alabalığından izole edilmiştir (Tanrikul ve Cagırgan, 2001; Öztürk ve Altınok, 2014).

#### 2.4.8. Balık hastalıklarını önleme ve tedavi

Enfeksiyöz balık hastalıklarını kontrol etmenin ideal yolu onları mümkün olduğunca patojen ajanlardan korumaktır böylece biyogüvenlik yolla yıkıcı sağlık problemlerinden kaçınılmış olur. Fakat sucul çevrelerde tüm hastalığa neden olan ajanları tanımlamak ve konakçı balıktan izole tutmak imkânsız gibi görünmektedir. Su birçok ajanın balıktan balığa ya da konaktan konağa transferini sağlayan mükemmel bir ortamdır. Bundan başka hastalığa neden olan birçok patojen sucul çevrelere endemik ya da fırsatçıdır (Plumb and Hanson, 2011).

Yetiştiricilik hayati bir besin kaynağıdır ve hala dünyanın en hızlı gelişen besin üreten sektörüdür. Yoğun balık yetiştiriciliği, stresli koşullar, enfeksiyöz hastalıklar özellikle bakteriyel ve viral orijinli olanlar yetiştiricilik tesislerinin en önemli sınırlayıcı faktörleri arasındadır.

Bazı hastalıklar kendilerini klinik formlarda tam olarak göstermezler. Bakteriyel böbrek hastalığı ve frunkulozis gibi hastalıklar balık hareketleriyle hastalıkları transfer etme riski taşımaktadırlar. Bu yüzden taşıma sınırlaması getirilmesi bir zorunluluktur. Bunlar hastalıkların yayılmasını önleyebilir ya da yavaşlamasını sağlayabilir. Bazı durumlarda hastalıklardan korumak gerçekten çok zordur. Enfekte balığın tamamıyla dispozisyonu özellikle haçerilerin disinfeksiyonu ölümle ilgili kayıplardan daha ekonomik olabilir. Hastalıklardan arı stokların yetiştiricilikte kullanılması da bazı hastalıkların oluşmasını engelleyebilir (Plumb and Hanson, 2011).

Yetiştiricilikte üretim seviyesini arttırmak ve balık hastalıklarını kontrol etmek için antibiyotikler, hormonlar ve iyonoforlar yoğun olarak kullanılmaktadır fakat bunlardan antibiyotikler dirençli patojenlerin gelişip yayılmasına neden olmaktadır ve sonuçta dirençli bakterilerin sucul ortamdan insanların patojen içermeyen bağırsak sistemine geçmesi gibi bir risk oluşturmaktadırlar (FAO, 2005; Nomoto, 2005). Bu problemi aşmak için balıklar aşılmalıdır. Balıkları vibriosis ve yersiniosis'e karşı korumak için birçok aşı denemesi yapılmıştır. Aşılama genelde basit ölü bakterin preparasyonlarıyla yapılmaktadır. En iyi koruma ölü bakterinin emulsifiye bir ajanla enjekte edilmesiyle sağlanmaktadır. Günümüzde zayıflatılmış canlı aşılar bazı bakteri patojenlerine karşı kullanılmaktadır. Zayıflatılmış aşılardan öldürülmüş bakteri aşılardan göre avantajları vardır. Bu aşılar canlı ve invaziv olduklarından aşı alımını kolaylaştırırlar, hücresel bağışıklığın uyarılmasıyla sonuçlanan düşük dereceli enfeksiyonlar oluştururlar ve daha uzun süreli bağışıklık meydana getirirler (Öztürk ve Altınok, 2014). Diğer yandan antibiyotikler gastrointestinal sistemdeki faydalı mikrobiyotayı inhibe edip öldürebilmekte ve balık dokusunda biriken antibiyotik kalıntıları insan sağlığı için zararlı olabilmektedir. (WHO, 2006; Romero et al., 2012; Balcazar et al., 2006c). Yetiştiricilikte en yaygın kullanılan antibiyotikler Oxytetracycline, sulfamethoxine, tetramycine ve tetracycline'dir.

Bu faktörler dikkate alındığında özellikle su ürünlerindeki antibiyotik kalıntılarının öldürücü etkisi düşünüldüğünde Avrupa Birliği ve Amerika antibiyotiklerin kullanımını yasaklamıştır (Kesarcodi-Watson et al., 2008). Bu sorunlardan dolayı kimyasal bileşenlerin kullanımına ilişkin büyüyen ilgi sadece insan ilaçları ve tarım değil aynı zamanda su ürünlerinde kuluçkahanelerdeki kayıpları engellemek için diğer metotların araştırılması üzerine de olmuştur. Komensal insan bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin ortaya çıkması antibakteriyallerin kullanımına olan güvenin kaybına sebep olmaktadır. Toplumun sentetik kimyasallara aşırı maruz kalmanın yarattığı olumsuz etkinin bilincine varması ve antibiyotik dirençliliğinin oluşması organik ve kimyasal içermeyen alternative gıdalara olan ihtiyaçla ilgili araştırmaların yapılmasına yol açmaktadır. Organik balık üretimini teşvik etmek için ise doğal kaynakları içeren materyallere dayanan tedavilere gereksinim duyulmaktadır (Eissa et al., 2014; Wang et al., 2008).

### **2.5. Yetiştiricilikte Mikroorganizmaların Bağırsak Mikroflorasındaki İşlevi**

Bağırsak sisteminin mikroflorası tüm yaşayan organizmaların integral bir parçasıdır. Birçok iç ve dış faktörler popülasyonların sayısını ve tür kompozisyonunu belirler ve kendilerini etkileyen mikroorganizmaların fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini de etkiler. Birçok farklı bakteri çevreden organizmaya katılır. Fakat doğal seleksiyondan dolayı sadece hayatta kalabilen bakteriler organizmada uygun koşulları bulurlar.

Laktik asit bakterileri birçok hayvanın bağırsak sisteminde baskın olarak dağılmış durumdadırlar. Laktik asit bakteri strainlerinin bir ya da çoklu strainlerini içeren birçok probiyotik birçok hayvanın doğal mikroflorasını oluşturur. Bu bakteriler güvenli olup patojenik bakterilere karşı antagonistik etki gösterirler. Bağırsak mikroflorası özellikle laktik asit bakterileri balıkların büyümesini ve sağlığını olumlu yönde etkilemektedir (Azizpour et al., 2009).

Mikroorganizmalar selüloz aktiviteleri ve doğal balık enzimi olarak iş görmeleriyle balıkların sindiriminde önemli olabilir. Bu yüzden bağırsak mikroflorasının anlaşılması ve manipasyonu beslenmede ve de hastalıkların



önlenmesinde önemli bir alandır. Bağırsak mikrobiyotası tek başına var olmayıp çevre ve konak işleviyle bir etkileşim içindedir. Sindirim sistemi kompleks ve dinamik bir mikrobiyal ekosistem içermekte olup bileşeni zamana, bireye ve sindirim sisteminin yerleşimine göre değişmektedir. Bağırsak mikrobiyotası konağın bağışıklık sistemi ve bağırsak gelişiminde öncü bir uyarıcı olarak rol almaktadır. Mikrobiyotanın temel fonksiyonu yem bileşiklerinin parçalanması yemlerin ayrılması ve lipit metabolizmasında, mikrobiyal metabolizma sonucunda oluşturulan gerekli yemleri sağlamak, istilacı patojenlere karşı koruma ve bağırsak morfolojisini uyarmaktır. Bunların dışında patojenitenin ilk aşaması olan bağırsağa tutunma bölgelerini bloke ederek bağırsak patojenlerine karşı bir bariyer oluşturmaktır. Aynı zamanda bağışıklık fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli rol oynarlar. Böylece doğal sucul mikrofloranın üyeleri balık patojenlerinin inhibisyonunda etkili olurlar. Patojen birleşmelerini sınırlamasına ek olarak laktobasil gibi doğal mikroflora türleri antibakteriyal etkiye sahip olduğu bilinen bakteriyosin üretirler. Bu yüzden bağırsak mikroflorasının stabilitesi organizmaların sağlığı için çok önemlidir (Rollo et al., 2006; Ringø, 2004).

Bağırsak florası çevreden ve antibiyotiklerden dolayı değişebilir. Çevre açısından: İlk yaşam çevresi mikrobiyal çeşitlilik üzerinde çok etkili olup bu değişiklikler yetişkin yaşam boyunca devam edebilir. Sucul çevrelerde birçok patojen doğal olarak oluşurken su ürünleri yetiştiriciliğinin bütün formları konak duyarlılığı olarak belirlenen hastalık salgınlarına meyillidirler (Pieters et al., 2008).

Fizyolojik stresler de hastalıklara sebep olup yetiştiricilikte ölüm oranını arttırmaktadırlar bu streslerin neden olduğu başlıca etkiler hastalık direncinde azalma, üremenin bozulması ve sonuçta büyüme artışında azalmaya neden olmalarıdır. Aynı zamanda faydalı mikroorganizmaların seviyesinin azalmasına sebep olan bağırsak mikrobiyota düzensizliklerine de yol açıp birçok balık kuluçkahanesinde ölüme sebep olan bakteri hastalıklarına barınak olurlar. Yoğun su ürünleri yetiştiriciliği uygulamaları da göl çevrelerinde enfeksiyöz hastalıkların yayılmasına ve vitellus kesesinden gelişimin ilk beslenme safhasına geçiş aşamasında yüksek oranda ölüme neden olarak olumsuz etki oluştururlar. Antibiyotik açısından: Su ürünleri yetiştiriciliğindeki büyüme ve sonuçları çok

sayıda hastalığın yayılmasına sebep olup aşı ve antibiyotiklerin kullanımını zorunlu hale getirmektedir. Fakat bu da antibiyotik dirençliliğine neden olmaktadır. Antibiyotiklerin kullanımı doğal bağırsak mikrobiyotasını toplam canlı sayısı ve popülasyon çeşitliliği açısından seçer. Doğal mikrobiyotanın çeşitlilik ya da sayısındaki azalma muhtemelen çevredeki sekonder potansiyel patojenlerle rekabeti sağlayan komensal mikrobiyota tarafından sağlanan efektif bariyer mekanizmasını azaltır. Canlı kalan bakteriler bağırsak sistemine giren sekonder patojenlere dirençliliği sağlayan genetic materyal değişimi (antibiyotik dirençliliğin yayılımı ve ilerde oluşacak hastalıklara karşı antibiyotik verimliliğini azaltan) olan dirençlilik genleri taşırlar. Bu balıklar için çok tehlikeli bir senaryodur. Çünkü balık bağırsak mikrobiyotası çoğunlukla geçicidir ve patojen bakterilerin kolaylıkla çoğalmasını destekleyen kültür çevresinin mikrobiyotasından büyük oranda etkilenir. Bu da yoğun balık çiftliklerinin sonucu olarak konak ve patojen arasındaki doğal bariyerin bozulmasından kaynaklanır (Merrifield et al., 2010). Bu durum büyüme ve sağlıklı olmayı sağlayan alternative katkılarla ilgili araştırmaları harekete geçirir. Böylelikle probiyotiklerin özellikle hayvan çiftliklerinde kullanımı önem arz etmektedir. Beslenme, su kalitesi, düşük stok yoğunluğu ve non-spesifik immunostimulantlar gibi faktörler diğer alternatifler arasında sayılabilir. Antibiyotiklerin kullanımı yerine patojenlerin alternative kontrolü bağırsak mikrobiyotasını probiyotiklerin yeme katılmasıyla manipule ederek sağlığı indükleyici bakteri oranı arttırılabilir.

Probiyotiklerin çiftliklerde yem ilavesi olarak kullanılması Avrupa Birliğinin 2006'da antibiyotiklerin kullanımını yasaklamasıyla popüler olmuştur. Tüketicilerin de sağlık için tehlike arz eden artıkları içermeyen yem talebi antibiyotiklere alternative araştırma da önemli bir role sahip olmuştur. Bağırsak sisteminin çeşitli mikrobiyal patojenlerle kolonizasyonunun engellenmesi probiyotik kullanımını içeren birincil mekanizmadır. Probiyotik kullanımı balık gelişiminin ilk aşamasında uygulanan başarısız aşı uygulamalarına karşı uygulanabilir olması açısından avantajlıdır. Probiyotiklerin yetiştiricilikteki diğer avantajları büyüme performansının iyileştirilmesi, bağışıklığın arttırılmasıyla hastalık kontrolü ve patojen dışlanmasıdır (Yun-Zhang Sun et al., 2010; Abdelhamid et al., 2009).

Daha öncede bahsedildiği gibi yetiştiricilikte hormon ve antibiyotik gibi kimyasalların kullanılması istenmeyen yan etkilere neden olabilir. Dünya sağlık örgütü küresel trendin doğallığa dönüşü gibi kimyasal yerine şifalı otların ve bitkilerin kullanımını desteklemektedir. Bunlar yetiştiricilik üretim performansının artırılması için kabul edilen yem katkı maddeleridir. Günümüzde probiyotikler de yetiştiricilikte kullanılan antibiyotiklere alternative olarak kullanılan potansiyel yem katkı maddeleridir (Dada A.A and Olugbemi, 2013). Yukarıdaki bahsedilen tüm bu nedenlere ek olarak probiyotik bakteriler yemlerin sindirimini iyileştirmeleri, bağışıklık sistemini geliştirmeleri ve sucul organizmaların büyümesi üzerinde pozitif etkiye sahip olmaları açısından yetiştiricilikte kullanılabilecek iyi birer adaydırlar. (Irianto and Austin, 2002 ve Lara-Flores et al., 2003; Dosta et al., 2012). Şimdiye kadar maya, laktik asit bakterileri ve *Pseudomonas* sucul hayvanlarda probiyotik olarak kullanılmıştır (Balcazar et al., 2007b).

Üzerinde en çok çalışılan ve beslemede en çok denenip başarı elde edilen adaylardan biri de laktik asit bakterileridir. Laktik asit bakterilerinin hastalık direncini arttırmaları, balıkların büyümesi ve bağışıklık yanıtlarını arttırmalarıyla ilgili probiyotik özelliklerinin kullanılmasıyla ilgili dikkate değer bir ilgi vardır (Zhou et al., 2010).

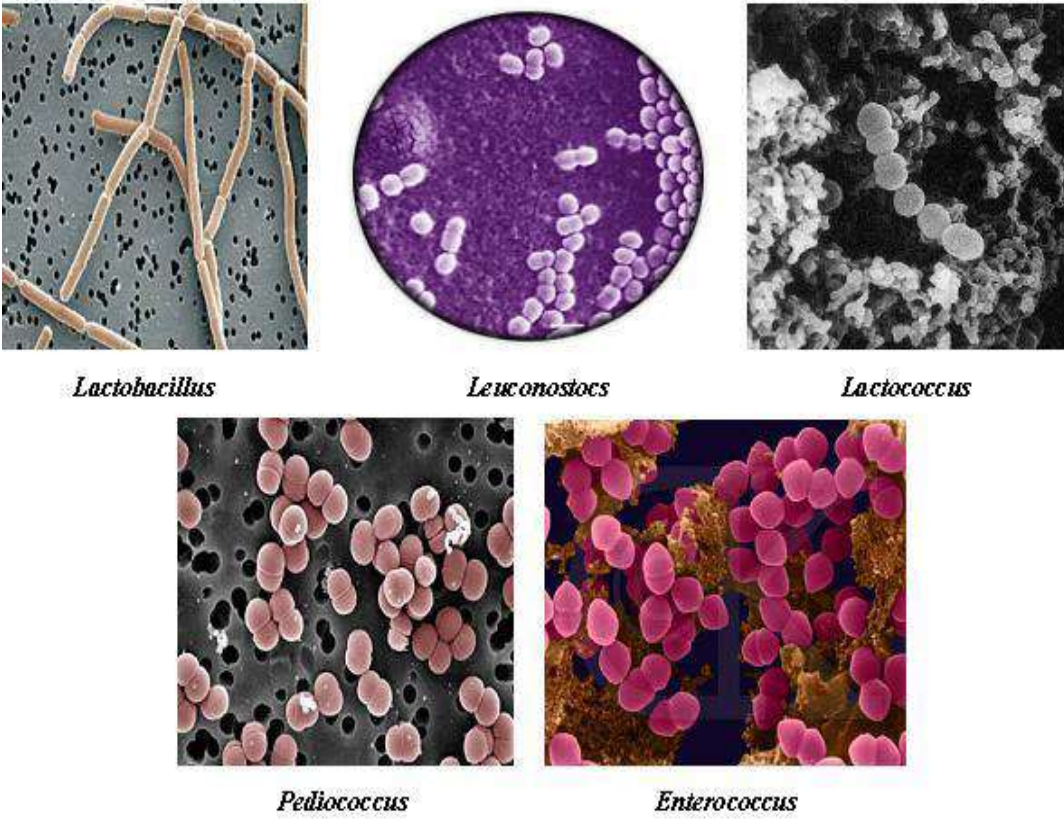
## **2.6. Laktik asit bakterileri**

Yukarıda bahsettiğimiz gibi laktik asit bakterileri (LAB) son yıllarda su ürünleri sektöründe önemli bir ilgi alanına sahip olmuştur çünkü hastalıkların önlenmesinde çoğu LAB probiyotik olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin ortaya çıkması 3 milyar yıl öncesine dayanmaktadır. Yayılmaları ise 65 milyon yıl önce süt üreten memelilerin ortaya çıkmasıyla olmuştur. Laktik asit bakterileri gr (+), genelde hareketsiz, spor oluşturmeyen fermantasyon ürünü olarak laktik asit üreten bakterilerdir. Çubuk ve kok şekilli olup genelde katalaz negatifler ve sitokromları yoktur. LAB'leri besin ihtiyacı açısından nazlı olup karbohidrat, amino asit, peptit, nükleik asit türevleri ve vitaminlere ihtiyaç duyarlar (Ringo ve Gatesoupe, 1998a).

**Çizelge 2.7** Laktik asit bakterilerinin temel farklı özellikleri (Axelsson, 2004).

Genus	Fermentasyon	Tek hücre	Hücre düzenlenmesi
<i>Streptococcus</i>	homolaktik	kok	çift, zincir
<i>Leuconostoc</i>	heterolaktik	kok	çift, zincir
<i>Pediococcus</i>	homolaktik	kok	tetrad, küme
<i>Aerococcus</i>	homolaktik	kok	tetrad, küme
<i>Enterococcus</i>	homolaktik	kok	çift, zincir
<i>Vagococcus</i>	homolaktik	kok ya da çubuk	çift, zincir
<i>Lactobacillus</i>	homo yada hetero	çubuk	çift, zincir
<i>Carnobacterium</i>	heterolaktik	çubuk	çift, zincir

Laktik asit bakterileri yiyecek, çürümüş materyaller, kuş ve hayvanların bağırsak sistemlerinin mukozal yüzeylerinde bulunup burada muhtemelen konağı patojenlere karşı korurlar (Bucio et al., 2005).



**Şekil 2.1** Laktik asit bakterilerine dahil edilen bazı cinslerin morfolojik özellikleri (Doğan, 2009)

Birkaç LAB türünün sağlıklı balıkların normal bağırsak florasını oluşturduğu Ringo (2004) tarafından bildirilmiştir. Balıklarda bulunan bağırsak LAB'leri çok çeşitli olup su çevrelerine göre değişiklik gösterirler. Aynı zamanda LAB'leri hem kültür hem de doğal ortamlarda bulunan gökkuşağı alabalıklarının normal florasını oluşturmaktadır (Sanchez et al., 2011; Askarian et al., 2008). *Carnobacteria* gibi diğer laktik asit bakterileri *Salvelinus alpinus*, *Salmo salar* gibi somon balığı türleri ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve kahverengi alabalık (Brown trout) gibi türlerin bağırsaklarından izole edilmiştir. (Bucio et al., 2005).

Laktik asit bakterilerinde patojen olan ve olmayan bakteriler vardır. Bazı patojen genusların (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Vagococcus*) patojen türleri balıkların karaciğer, böbrek, dalak ve kalbinden izole edilmiştir. Bunların dışında balık patojenlerine karşı antagonistik etkiye sahip genusların yararlı türleri de vardır. Balık bağırsak sistemiyle ilgili yapılan çalışmalarda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* ve *Pediococcus* gibi laktik asit bakterilerine rastlanmıştır. Bunlar bağırsakta baskın olmayıp kolonize olabilenler bazı balık patojenlerin adhezyonunu engellemektedirler (Balcazar et al., 2008; Ringo, 2004; Denev et al., 2009).

### 2.6.1. Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılmasının Tarihçesi

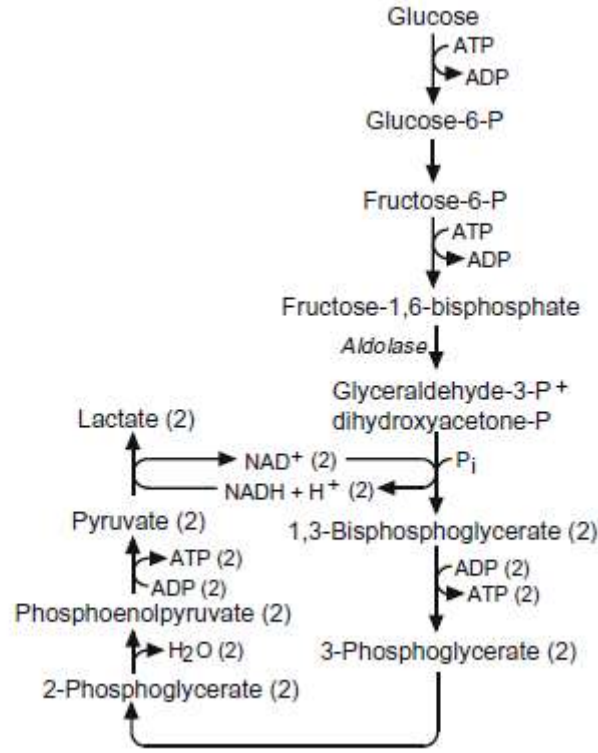
LAB'ın bir grup olarak ilk tanımlanması, koliform bakterilerle birlikte laktiklerin sütü fermente ve koagüle etme özellikleri üzerine yapılmıştır. 1901 yılında *Lactobacillus* mikroorganizmalarının gram pozitif olarak tanımlanması ile koliform bakteriler LAB grubundan ayrılmıştır. 1919 yılında Orla-Jensen, LAB'lar gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, kok, kokobasil, karbonhidratları ve yüksek alkollerini başlıca laktik asit oluşturarak fermente eden bir grup olarak tanımlamış ve 7 tane soy ileri sürmüştür (Çizelge 2.8) (Stiles and Holzapfel, 1997). Orla-Jensen'in LAB üzerine olan makaleleri streptokokların süt ve süt ürünlerindeki önemi üzerine olmuştur. Streptokokların ilk sistematik klasifikasyonu Sherman tarafından 1937 yılında yapılmıştır. Mutlak anaeroblar ve pneumokoklar bu sınıflandırmadan çıkarılmış ve geri kalan fakültatif anaerob

streptokoklar dört gruba (Piyojenik, Viridans, Laktik, *Enterococcus*) bölünmüştür (Stiles and Holzapfel, 1997). Bakterilerin klasik taksonomisi; morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine dayanmıştır. Bu daha sonra hücre duvarı kompozisyonu, hücre yağ asitleri, aromatik bileşiklerden elde edilen quinone ve isoprene gibi organik bileşiklerin varlığına bakılarak genişletilmiştir (Stiles and Holzapfel, 1997). 1986 yılında yayınlanmış olan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ile LAB'ın *Streptococcus* cinsi *Enterococcus*, *Lactococcus*, ve *Streptococcus* cinsleri olmak üzere üçe ayrılmıştır. Bu yeni sınıflandırma LAB'nin sınıflandırılmasında büyük bir yenilenme olarak kabul edilmektedir (Schleifer 1986, 1987). Daha sonraları hareketsiz olan bazı LAB diğer bir deyişle *Lactococcus* cinsleri ile tanımlanmış olan bakteriler *Vagococcus* ve *Lactococcus* cinsi olmak üzere ikiye ayrılarak LAB'nin sınıflandırılmasında yerini almıştır (Collins et al., 1989; Oral, 2010). *Lactobacillus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri ise değişme uğramamıştır. Ancak daha önceden *Lactobacillus* cinsi içinde yer alan çubuk şeklindeki bazı LAB günümüzde *Carnobacterium* cinsi altında toplanmaktadır. Ek olarak *Pediococcus halophilus* türü olarak tanımlanmış olan bakteriler cins seviyesine yükseltilecek *Tetragenococcus* cinsi olarak sınıflandırmada yerini almıştır (Collins et al., 1987). Heterofermantatif LAB lerinin belirgin kümeleri arasında yer alan ve daha önceleri *Lactobacillus* ya da *Leuconostoc* cinslerine ait olduğu düşünülen bazı bakteriler ise *Weissella* cinsine dahil edilmişlerdir. Şarap *Leuconostoc* ları olarakta bilinen *Leuconostoc oenos* türü ise *Oenococcus* cinsi altında toplanmıştır (Dicks et al., 1995). Fizyolojik ve filogenetik olarak LAB ile benzerlik gösteren bazı şuslar ise *Alloiococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Eremococcus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum*, ve *Lactosphaera* gibi yeni cinslerin tanımlanmasını sağlamıştır (Collins et al., 1999). LAB, *Weissella* cinsi dışında çubuk şeklinde olanlar (*Lactobacillus* ve *Carnobacterium*) ve kok şeklinde olanlar olmak üzere ikiye ayrılabilir (Collins et al., 1999; Woese, 1987). Ayrıca kok şeklindeki bakterilerin karakteristik özelliği olan tetrat formu ise *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Tetragenococcus* cinlerini oluştururlar.

LAB cinslerinin ayırımında kullanılan önemli bir özellik ise standart koşullar altındaki glukoz fermentasyon yollarıdır. Bu durum göz önüne

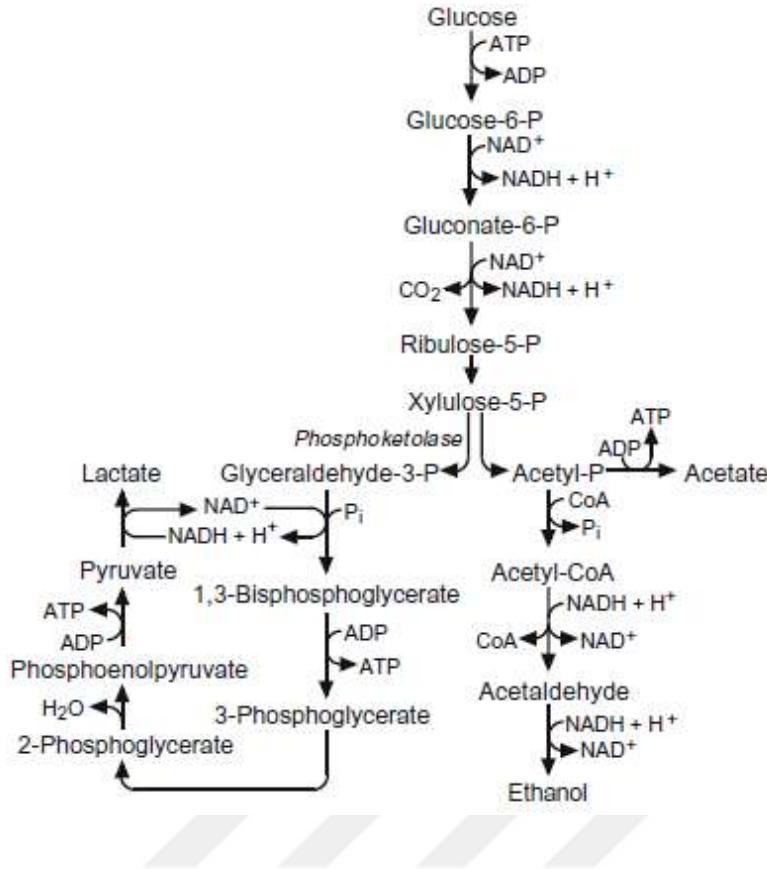
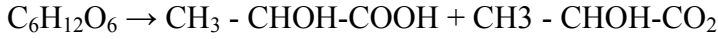
alındığında LAB iki gruba ayrılabilir. Birinci grup homofermentatif yani glukozu büyük oranda laktik aside dönüştüren LAB. İkinci grup ise heterofermantatif yani glukozu laktik asit, etanol ya da asetik asit ve CO<sub>2</sub>'e dönüştüren laktik asit bakterileridir. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* cinsleri ve bazı *Lactobacillus* cinsinin alt grupları heterofermantatif, diğer cinsler ise homofermantatif olarak tanımlanmışlardır (Sharpe et al., 1979).

Homofermantatif LAB'leri glukozu, fruktoz di fosfat yoluyla parçalayıp fermentasyon sonucu % 95-100 oranında laktik asit üretirler (Drinan et al., 1976).



**Şekil 2.2** Laktik asit üretimini gösteren homofermantatif yol izi (Fugelsan and Edwards, 2007).

Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise glukozu; hekzoz mono fosfat yoluyla parçalayarak fermentasyon sonucu % 50 oranında laktik asit üretirken, bunun yanı sıra etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluştururlar (Drinan et al., 1976). Tepkimenin reaksiyonu aşağıda verildiği gibi gerçekleşmekte olup yol izi Şekil 2.3'te verildiği gibidir.



**Şekil 2.3** Laktik asit, CO<sub>2</sub>, etanol ve asetik asit üretimini gösteren heterofermentatif yolu (Fugelsan and Edwards, 2007).

Günümüzde bakterilerin taksonomisindeki büyük değişiklikler, önemli düzeyde bakteri DNA'sındaki nükleotit oranları (G+C içeriği) ile belirlenmektedir. G+C içeriği kesin olmamasına (%50'den daha az) rağmen, geniş dizimli cinslerin alt dallarına ayrılmasında iyi bir göstergedir (Stackebrand and Teuber 1988). Ayrıca izole edilen genlerinin elektroforetik özellikleri, DNA: DNA hibridasyonu ve RNA'nın yapısı ve sıralanması gibi moleküler özellikler taksonomide kullanılan başlıca çok önemli tekniklerdir. Bunlar LAB taksonomisinde çok önemli değişikliklerin yapılmasına neden olmuştur (Stiles and Holzapfel, 1997). Çünkü LAB'de daha önce yapılan sınıflandırmanın temeli fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerin (farklı sıcaklık, pH değeri ve tuz konsantrasyonlarında gelişim ve karbonhidrat katabolizması) incelenmesini içeren fenotipik özelliklere dayanmaktaydı (Stiles and Holzapfel, 1997; Gobetti et al., 2005). Bundan dolayı, günümüzde yeni ortaya koyulan farklı soylar



bilinmiyordu ve mikrobiyologlar LAB'dan veya laktiklerden bahsettiklerinde *Lactobacillus*, *Lactococcus* (*Streptococcus*), *Leuconostoc* ve *Pediococcus*'lar anlaşılmaktaydı (Yörük ve Güner, 2011).

Özet olarak LAB'ın sınıflandırılmasında günümüze kadar gelinen süreç içerisinde fenotipik ve genotipik tanımlamaların kullanımı ile 4 ana başlık altında toplayabilmek mümkündür.

1. Grup: *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinsinin dallanmaları ile oluşturulmuş olan *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* ve *Vagococcus* cinsleri.
2. Grup: Kendilerine özgü hücre bölünmelerinin ortaya koymuş olduğu tetrat formuna sahip *Aerococcus*, *Pediococcus* ve *Tetragenococcus* cinlerini.
3. Grup: *Leuconostoc*, *Oenococcus* ve *Weissella* cinsleri
4. Grup: *Lactobacillus* ve *Carnobacterium* cinslerini içermektedir.

**Çizelge 2.8** LAB ve sınıflandırması (Yörük ve Güner, 2011)

Tür	Şekil	Katalaz	Nitrit indirgemesi	Fermentasyon	Cinsler
<i>Betabacterium</i>	Çubuk	-		Heterofermantatif	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Çubuk	-		Homofermantatif	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Çubuk	-		Homofermantatif	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Kok	-		Homofermantatif	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Kok			Heterofermantatif	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	Çubuk	+	+	Homofermantatif	<i>Brochotrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Kok	+a	+	Homofermantatif	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

### **2.6.1.1. *Streptococcus* cinsi bakterilerin özellikleri**

Gr(+), küresel veya oval, genellikle hareketsiz ve fakültatif anaerobik, bazen gelişimleri için karbondioksit ihtiyacı duyan, bazen de anaerobik ortamda gelişebilen ve katalaz (-) mikroorganizmalardır. Optimum üreme sıcaklıkları 37°C'dir (Yaygın ve Kılıç, 1993). *Streptococcus* soyu morfolojik, serolojik,

fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre *S. pneumonia*, *S. pyogenes*, ve *S. agalactiae* gibi patojen mikroorganizmaları, *S. faecalis*, *S. faecium* gibi intestinal bakterileri ve *S. cremoris* ve *S. lactis* gibi starter bakterileri içermektedir. 16S rRNA üzerine yapılan gen dizinlerinin tespit edilmesi ile streptokoklar genetik olarak farklı üç gruba ayrılmıştır. Bunlar, *S. sensu stricto*, *Enterococcus* ve *Lactococcus*'dur. *Streptococcus* soyu içerisinde kalan türler patojenik ve oral streptokokları içermektedir (Stiles and Holzapfel, 1997; Yörük ve Güner, 2011; Oral, 2010).

*Streptococcus*'un alabalıkların bağırsak sistemindeki varlığını ilk rapor eden Trust ve Sparrow (1974)'dur (Ringo and Gatesoupe., 1998b). Bu çalışmada *Streptococcus* kalın ve ince bağırsaktan izole edilmiştir. Daha sonra *Streptococcus* Arctic charr, Avrupa yılanı (*Anguilla anguilla*), sazan (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Car. Auratus*) sarıkuyruk ve kalkan balığı (*Scophthalmus maximus* L)'ndan izole edilmiştir (Ringo and Gatesoupe., 1998b).

#### **2.6.1.2. *Lactococcus* cinsi bakterilerin özellikleri**

*Lactococcus*'un zaman zaman düz uzun zincir görüntüsü (kokobasil) bazı laktokokların laktobasil olarak yanlış yorumlanmasına yol açabilmektedir. 1985 yılında Lancfield grup N laktik streptokokların önemli bir kısmı *Lactococcus* soyuna devredilmiştir. *Lactococcus* soyu oldukça fazla ve çok yaygın bilinmeyen türler içermektedir: Sığır mastitisinde rol oynayan *Lc. garvieae*, somon balıklarında bulunan *Lc. piscium*, dondurulmuş bezelyede *Lc. plantarum* ve çiğ sütte *Lc. raffinolactis* ve *Lc. lactis*'in alt türleri ekonomik öneme sahiptirler. Sitratı kullanarak diasetil üreten *S. diacetylactis*, *Lc. lactis* subsp. *diactylactis* olarak sınıflandırılmıştır. Sitrat kullanımı bu bakterilerde stabil bir durum olmadığı için bu bakteri, fermente süt ürünlerinde çok yaygın bir kullanımı olan *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris*'in bir varyetesi olarak klasifiye edilmiştir. *Lactococcus lactis*'in varyeteleri lantibiotic, nisin gibi önemli bakteriosinleri üretirler (Stiles ve Holzapfel, 1997; Yörük ve Güner, 2011; Oral, 2010). Laktokoklar; *L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garviae*, *L. piscium* ve *L. plantarum* olmak üzere bes tür içermektedir. *Lactococcus* cinsine ait bu beş tür; 40°C üzerinde ve yüksek tuz konsantrasyonlarında (>% 4 sodyum klorür)

gelisebilme ve farklı şekerlerden (laktoz, mannitol ve rafinoz) asit oluşturma özellikleri bakımından farklılık göstermektedir.

**Çizelge 2.9** *Lactococcus* cinsinin sınıflandırılması (Casalta and Montel, 2008)

Türler	Alttürler
<i>Lactococcus garvieae</i>	-
<i>Lactococcus piscium</i>	-
<i>Lactococcus plantarum</i>	-
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	-
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

Laktokoklar genellikle bitkilerde ve hayvanların derilerinde bulunurlar. *L. garvieae* balıklardan, hayvanlardan ve süten, *L. piscium* somon balığından, *L. Plantarum* çoğunlukla bitkilerden izole edilmektedir. *L. raffinolactis* nadiren çiğ sütte ve peynirlerde bulunur (Casalta ve Montel 2008). *L. lactis* subsp. *lactis*, arjinin hidrolizi sonucu amonyak oluşturma ve 40°C’de gelişebilme yetenekleriyle, *L. lactis* subsp. *cremoris*’den ayrılmaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997). *L. lactis* türü basta olmak üzere *Lactococcus* cinsinin üyelerinin çoğunluğu insan ve hayvan sağlığı açısından tüketilmelerinde sakınca bulunmayan güvenilir mikroorganizmalar (GRAS) olarak sınıflandırılmaktadır (Salminen vd. 1998; Özdoğan, 2011).

### **2.6.1.3. Enterococcus cinsi bakterilerin özellikleri**

10–45°C sıcaklık aralığında, pH 9,6’da, %6,5 NaCl’de üreyebilirler. Katalaz (-) özellik yansıtmalarına rağmen bazı türleri yalancı katalaz aktivitesi verebilir (Doming ve ark., 2003). Fakültatif anaerob bakterilerdir. *Enterococcus* soyu ilk defa 1899 yılında Thiercelin tarafından, intestinal orjinli olduğu için, enterekok olarak tanımlanmıştır. Andrewes ve Horder 1906 yılında endokarditisli bir hastadan izole edilen bu bakteri için *S. faecalis* adını kullanmıştır. Klina 1970 yılında *S. faecalis* ve *S. faecium* için *Enterococcus* soyunu önermişse de, bu 1984

yılında Scheilfer ve Kilpper-Balz tarafından yapılan öneriye kadar kabul görmemiştir (Stiles and Holzapfel, 1997).

*Enterococci*, özellikle de *E. faecalis* endokarditis, üriner sistem ve hastane enfeksiyonlarında yer almasına rağmen *E. faecium* enterokokal enfeksiyonların yalnızca %20'sinde, her ikisi de abdomen ve pelvisin miks enfeksiyonlarından bildirilmiştir. Enterokokların gıda ve halk sağlığı mikrobiyologları tarafından kabul edilen önemleri; gıda güvenliği açısından indikatör olarak kullanılmaları ve muhtemel gıda kaynaklı hastalıklarda yer almasından kaynaklanmaktadır. Enterokoklar aynı zamanda bazı gıdalarda starter kültür olarak kullanılırlar. Ticari probiyotik olarak kullanılmaları da mevcuttur. *E. faecium* Kuzey Avrupa'da üretilen bazı peynirlerin fermentasyonu ile ilişkilidir. Son tanımlanan bazı *Enterococcus* soyları (örn., *E. durans* ve *E. Flavescens*) klinik orijinlidir (Stiles and Holzapfel, 1997; Yörük ve Güner, 2011).

#### **2.6.1.4. Carnobacterium cinsi bakterilerin özellikleri**

Bu soy 1987 yılında Collins ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Thorney, soğukta muhafaza edilen kanatlı etlerinde gram (+), katalaz(-), spor oluşturmeyen bakterileri tespit etmiştir. Benzer grup bakteriler vakum paketlenmiş soğuk depodaki etlerden tespit edilmiş ve asit oluşturmeyen laktobasiller olarak tanımlanmıştır. Asit oluşturmeyen bu bakterilerin iki grubu *Lb. divergens* ve *Lb. carnis* yeni tür olarak önerilmiştir. Yapılan filogenetik çalışmalarda *Carnobacterium* soyu önerilmiştir. *Carnobacteria* laktobasillerle birlikte izole edilse de filogenetik olarak *Enterococcus* ve *Vagococcus*'a daha yakın olarak bulunmuştur (Wallbanks et al., 1990) *Carnobacteria*'nın kırmızı et, kanatlı eti ve balık eti dışında diğer gıdalarda nadir de olsa varlığı bildirilmiştir. (Stiles and Holzapfel, 1997). *Carnobacteria*'nın balıklarda bulunmasıyla ilgili bazı araştırmalar vardır. *Carnobacterium* sp gökkuşuğu alabalığında, Atlantik somonunda (Joborn et al., 1997 a,b), doğal ortamda ve kuluçkahanelerde bulunan *Salvelinus alpinus*'ta (Ringø et al., 1997) rapor edilmiştir. *Carnobacterium* 9 türe ayrılır bunlar, *C. alterfunditum* ve *C. Funditum*, *C. divergens*, *C. gallinarum* ve *C. mobile*, *C. inhibens*, *C. Maltaromaticum*, *C. vifidans* ve *C. Pleistocenium*'dur (Kim and Austin, 2008). Bunlardan özellikle *C. divergens* ve *C. Maltaromaticum*

füme balık, et, peynir ve balık bağırsağından izole edilmiştir. Bu türler çözdürme ve dondurmaya ve yüksek basınca dayanıklı olup düşük sıcaklıklarda, anaerobik ortamda ve CO<sub>2</sub> 'nin yüksek konsantrasyonlarında büyüyebilir. Arjinini ve kitin içeren çeşitli karbohidratları metabolize edebilirler bu da onların buldukları çevrede hayatta kalabilme şanslarını arttırır.

*C. divergens* ve *C. maltaromaticum* balıklarda ve ette bulunan *Listeria monocytogenes* inhibisyonunu sağlamak koruyucu kültür olarak fazlaca çalışılmıştır. Birkaç carnobacterial bacteriocin biliniş bunların üretimini etkileyen parametreler tanımlanmıştır. Bundan başka koruyucu kültür olarak uygulanan ticari izolatlar bulunmamaktadır. *Carnobacteria yetiştiricilikte probiyotik olarak düşünülmesine rağmen C. maltaromaticum* balık patojeni olabilir (Leisner et al., 2008).

Birçok balığın bağırsağından izole edilen *C. inhibens*, *C. divergens* and *C. Piscicola* türlerinin bakteriyel balık patojenlerini inhibe ettiği düşünülmektedir. Dolayısıyla *Carnobacteria*'ların bağırsak sistemi bağışıklığında anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. Diğer bir araştırmada, *C. divergens* verilmiş Atlantik morina (*Gadus morhua*) ve yavrularında *Vibrio anguillarum*'a dayanıklılığın arttığı gösterilmiştir (Gildberg et al., 1997). Ayrıca *Lactococcus lactis* AR21'i kullanan bilim adamları bunların rotiferlerin büyümesini teşvik ettiğini ve *V. anguillarum*'un gelişmesini engellediğini belirtmişlerdir (Harzevili et al., 1998).

#### **2.6.1.5. Vagococcus cinsi bakterilerin özellikleri**

Tavuk dışkısından ve nehir suyundan izole edilen hareketli grup N streptokoklar *Vagococcus fluvialis* olarak isimlendirilmiştir. *V. salmoninarum* adlı yeni bir tür hasta somon balıklarından izole edilmiştir. 16S rRNA ile yapılan filogenetik çalışmalar sonucu, hareketli grup N streptokokların *Streptococcus* ve *Lactococcus*'dan daha çok *Enterococcus*, *Carnobacteria* ve *Listeria*'ya daha yakın olduğu ortaya konmuştur (Stiles and Holzapfel, 1997).

### **2.6.1.6. *Lactobacillus* cinsi bakterilerin özellikleri**

*Lactobacillus* soyundaki mikroorganizmalar basil şeklinde, gr(+), spor oluşturmeyen ve katalaz (-) bakterilerdir. Bu soydaki bakteriler 2-53°C'de (optimum 30-40°C) gelişmektedirler, hafif asidik ortamda hızlı çoğalarak *Streptococcus*'lardan daha çok asit oluştururlar (Kıran, 2006). %1-3 oranında laktik asit oluşturarak pH'yı 3.2-3.5'e kadar düşürmektedirler. Proteolitik aktiviteleri de yüksektir (Tekinşen ve Atasever, 1994; Ünlütürk ve Turantaş, 1999). Oksijeni kullanma özelliğine göre mikroaerofilik ya da anaerob olup %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda gelişme gösterebilirler. Genellikle katalaz ve oksidaz negatif olarak bilinmektedirler (Hammes and Vogel, 1995). *Lactobacillus* türleri, bitki, toprak, süt ürünleri ve bağırsak florasında bulunur. Fermente et, süt ve sebze ürünlerinin üretiminde rol oynamaktadırlar (Ünlütürk ve Turantaş, 1999).

Günümüze kadar laktobasillerin klasik divizyonunda fermentatif özellikleri dikkate alınarak; obligat homofermentatifler, fakültatif heterofermentatifler ve obligat heterofermentatifler olmak üzere bir bölünme yapılmıştır. Grup 1 ve 2'deki bakterilerin çoğu ile grup 3'deki bazı bakteriler fermente gıdalarda kullanılmış, fakat grup 3 genelde gıda bozulmaları ile ilişkilendirilmiştir (Stiles and Holzapfel, 1997).

1986 yılında yayınlanan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de düzenli spor oluşturmeyen 7 soydan 4'ü gıda mikrobiyolojisi için önemli olarak gösterilmiş ve besin fermentasyonunda *Lactobacillus*'lar, besin bozulmalarında *Brochotrix* ve *Lactobacillus*, besin kaynaklı enfeksiyonlarda *Erysipelothrix* ve *Listeria* bildirilmiştir. 1980'li yıllardan sonra gerçekleştirilen filogenetik çalışmalarda *Lactobacillus* soyunda önemli değişiklikler gerçekleştirilmiştir. Buna göre; laktobasiller tam fermentatiftir (homo ve hetero) ve kompleks besin ortamlarına ihtiyaç duyarlar. Oldukça farklı çevrelerde ürer ve bulunur. Asidurik ve asidofilik özellik gösterirler. Fermentatif karbonhidratların bulunduğu gıdalarda pH'yı 4 düzeylerine kadar düşürebilirler. pH 7.2'ye kadar üreyebilirler. Laktobasiller, değişik çeşitte peynirler, fermente bitkisel ürünler, fermente etler, şarap ve bira üretimi, ekşi hamur ve silajda starter kültür olarak kullanılırlar (Stiles and Holzapfel, 1997).

Obligat homofermentatif olan grup 1'de *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* ve *Lb. helveticus*'un yanı sıra *Lb. farciminis* ve *Lb. kefiranofaciens* bulunmaktadır. *Lb. delbrueckii*, 1983 yılında *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* olarak yeniden klasifiye edilmiştir. *Lb. acidophilus* ilk defa 1990 yılında dışkıdan izole edilerek bu isim verilmiştir. Probiyotik bakterileri temsil eden önemli bir bakteri olarak bilinir. *Lb. acidophilus* BG'F04 1982 yılında *Lb. johnsonii* olarak tanımlanmıştır. Bu suş sağlık etkilerinden faydalanmak üzere yeni tip yoğurt üretiminde kullanılmaktadır. *Lb. helveticus*'un *Lb. acidophilus*'a daha yakın *Lb. delbrueckii*'den daha uzak olduğu düşünülmektedir. İsviçre-İtalyan tipi peynirlerin üretiminde kullanılır (Stiles and Holzapfel, 1997). Fakültatif heterofermentatif olan grup II'de gıda ile ilişkili başlıca soylar *Lb. casei* ve *Lb. plantarum*'dur. *Lb. casei*, süt ürünleri, silaj, insan ağızı ve bağırsaklarında bulunur. Ekşi hamur ve salamurada fermente edilen peynirlerde ve bazı gıdalarda sitratı CO<sub>2</sub>'e fermente ederek bozulmalara sebep olur. *Lb. plantarum*, bazı fermente sosisler ve tahıl ürünlerinde starter olarak kullanılır. Grup ikide yer alan diğer alt grup laktobasiller başlıca *Lb. curvatus* ve *Lb. sakei*'dir. Bu bakteriler modifiye atmosfer ve vakum paketlenmiş soğuk muhafaza edilen et ve et ürünlerinin başlıca florasını oluşturur. Vakum paketlenmiş Frankfurter, Vienna vb. sosislerin bozulmasında rol oynayan dominant bakteri olarak *Lb. curvatus* tespit edilmiştir. Ayrıca fermente et ürünlerinde kullanılan önemli starterlerdendir (Stiles ve Holzapfel, 1997). Grup 3 obligat heterofermentatif bakterileri içerir. Hekzosları laktik asit, asetik asit ve/veya etanol ve CO<sub>2</sub>'e fermente eden bakteriler yer alır. Glikozdan gaz oluşturması bu bakterilerin en önemli özellikleridir. (Stiles and Holzapfel, 1997). Laktobasillerin balıkların deri, solungaç ve bağırsak sisteminde bulunduğunu gösteren ilk çalışma Dyer (1947) tarafından Atlantik kodu (*Gadus morhua*)'da bildirilmiştir. Kvasnikov ve arkadaşları (1977) laktik asit bakterilerinin *Cyprinidae*, *Escocidae* ve *Percidae* familyalarının normal mikrobiyotasını oluşturduğunu bildirmiştir.

#### **2.6.1.6.1. Lactobacillus acidophilus**

*Lactobacillus acidophilus* çubuk şeklinde, anaerob veya fakültatif anaerob, hareketsiz, katalaz (-) bir bakteridir. Optimum gelişme sıcaklıkları 35-38 °C 'dir

(Kırdar, 2000). *Lactobacillus acidophilus* laktozu homofermentatif yönden fermente etmekte ve DL laktik asit oluşturmasının yanı sıra az miktarda da asetik asit, asetaldehit ve etanol oluşturmaktadır.

Tüketilen üründe *Lactobacillus acidophilus* gibi canlı probiyotik bakterilerin varlığı, kanser oluşumunu engelleme, serum kolesterol seviyesini düşürme, bağırsak mikrobiyel florasına hakim olma ve laktoz tolerans kişilerde laktoz kullanımını geliştirme gibi çeşitli tıropatik yararlar sağlamanın yanı sıra, ürünün duyuusal özelliklerini de etkilemektedir (Shah ve Lankaputhra., 1997). *Lactobacillus acidophilus*, asidik koşullara ve safra tuzlarına karşı dayanıklı olması ve aynı zamanda antogonistik maddeler üretmesi nedeniyle bağırsaktaki epitelyum hücrelere başarılı bir şekilde kolonize olmakta ve gastrointestinal bölgede patojen mikroorganizmalarla rekabet etmektedir. *Lactobacillus acidophilus* pH 3 ve daha aşağı değerlerde gelişebilmekte ve bazıları gastrointestinal bölgenin mide kısmından geçerken canlılığını sürdürmektedir. Laktik asit bakterisinin aside karşı toleransı, sitoplazmik membran tabakasının kompozisyonuna bağlı olduğu söylenmektedir. Safra tuzlarına karşı dayanıklılık ise, bir türün probiyotik olarak kullanılabilmesi için gerekli olan kriterlerden biri olduğu söylenmektedir (Oh ve ark., 2000). *Lactobacillus acidophilus*'un tümör hücrelerini inhibe ettiği ve prokanserojenleri kanserojen maddelere dönüştürebilen mikroorganizmalara karşı antogonistik etkide bulunduğu da bildirilmektedir.

#### **2.6.1.6.2. *Lactobacillus rhamnosus***

*Lactobacillus rhamnosus* fakültatif heterofermentatif (Grup II) mikroorganizmalardır. Pentozları ve glukogonları fermente edebilme yeteneğine sahiptirler (Hessle et al., 1999). *Lactobacillus rhamnosus* insan kanındaki monositlerde düzenleyici sitokin IL-10 üretimini tetiklemede, *Lactobacillus plantarum* veya *Lactobacillus paracasei* cinslerinden daha etkilidir. *L. rhamnosus* 'un farklı suşları birçok probiyotik üründe uzun zamandır kullanılmaktadır. En iyi bilinen suşu ise *L. rhamnosus* GG' dir. *L. rhamnosus*'un bu özel suşunun birçok yararlı etkisi olduğu kanıtlanmıştır. En iyi bilinen etkisi akut gastroenterit



süresini, bağırsak mukoza dengesini sağlayarak ve immun cevabı destekleyerek kısaltmasıdır (Majama ve ark., 1995).

#### **2.6.1.7. *Leuconostoc* cinsi bakterilerin özellikleri**

Bu bakterinin orijinal sınıflandırılması morfolojisi üzerine olmuştur. *Leuconostoc* soyu, her ne kadar Orla-Jensen tarafından betacocci olarak adlandırılmasına ve heterofermentatif kok olarak ayrı bir soyda kabul edilmesine rağmen, morfolojisi bu soyu streptokoklara yakın kılmıştır (Stiles ve Holzapfel, 1997). *Leuconostoc*, bitkilerden izole edilen dominant bir soydur ve *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* bitkilerden izole edilen başlıca türüdür. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de soydaki tür sayısı altıdan dörde düşürülmüştür. *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. Dextranicum* ve *Leuc. cremoris*, *Leuc. mesenteroides*'in alt türleri olarak kabul edilmiştir (Stiles ve Holzapfel, 1997). Soğutulmuş olarak depolanan etlerden elde edilen 52 *Leuconostoc* izolatının taksonomik çalışması sonucunda üç grup oluşturulmuştur. Bir grup *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* olarak tanımlanmıştır. Diğer iki grup *Leuc. gelidum* ve *Leuc. carnosum* adı verilen iki türü taşımaktadır. Asıl grup *Leuc. sensu stricto* olarak düzenlenmiş ve üç alt gruptan oluşturulmuştur. Bunlar; 1. *Leuc. Mesenteroides* ve *Leuc. Pseudo-mesenteroides*, 2. *Leuc. lactis* ve *Leuc. Citreum* 3. *Leuc. carnosum*, *Leuc. gelidum* ve *Leuc. Amelibiosum*'dur.

#### **2.7. Probiyotik Kavramı**

Probiyotikler antibiyotiklerdeki kısıtlamalar, aşı ve kimyasalların sınırlandırılmasından dolayı sağlık yönetimi için alternatif iyileştirici olarak tanınmaktadır. Su ürünlerinde kullanımları ise yeni olup çevre dostu olduklarından probiyotikler üzerindeki araştırmalar devam etmektedir. Probiyotiğin anlamı yaşam için demek olup yunanca köken olan pro ve bios'tan gelmektedir (Gismondo et al., 1999). Bu tanım potansiyel probiyotiklerin temel bileşen olarak canlı hücrelerin önemini ortaya koymaktadır. Sucul probiyotik kavramı yeni olup probiyotikler sucul kullanım için düşünüldüğünde kara amaçlı probiyotiklerden temel olarak farklı olan belirli etkili faktörleri dikkate almak gerekmektedir. Sucul hayvanlar çevreleriyle çok daha yakın ilişki içerisindeyler.

Karasal ve sucul hayvanların bağırsak mikrobiyotasıyla çevresi arasındaki etkileşim düzeyi arasında büyük farklılıklar vardır. Potansiyel patojenler sucul hayvanların dış ortamında varlıklarını sürdürüp konaktan bağımsız olarak çoğalabilirler. Bu patojenler osmoregülasyon ve beslenme prosesleriyle sürekli alınırlar. Sucul hayvanların bakteriyel topluluk kompozisyonu karasal olanlardan farklıdır. İnsanlar ve hayvanlar amniyon içeren embriyonik bir gelişme geçirirken birçok balık ve kabuklunun larval formları ontogenetik safhanın başlarında dış ortama bırakılır. Bu larva bağırsak sistemi ve mikrobiyotayla ilişkili düzensizliklere çok fazla maruz kalmaktadır. Çünkü beslenme sindirim sistemi ve bağışıklık tamamıyla gelişmeden başlamaktadır. Bu yüzden larval safhada probiyotik uygulamalar düzenli olarak istenmektedir. Atlantik somonuyla (*Hippoglossus hippoglossus*) yapılan bir çalışmada *Flavobacterium* spp. ile baskın olan bağırsak florasının ilk besleme başladığında *Aeromonas* sp. ve *Vibrio* sp. ile baskın hale geldiği görülmüştür. Bu çalışma dış çevre ve beslenmenin balıkların mikrobiyal durumu üzerindeki etkisini göstermektedir. Her zaman var olan dış çevre faktörleri sucul hayvanların iç florasını etkilemesine rağmen bu hayvanlar herhangi bir zamanda konağa spesifik bir flora da sahip olabilirler. Sucul hayvanların çevresiyle olan karışık ilişkilerine bağlı olarak probiyotik kavramının geliştirilmesi gerekmektedir.

Probiyotik kavramı ilk kez Lilly ve Stilwell (1965) tarafından bir protozoon tarafından üretilen ve bir başkasının büyümesini uyaran bileşenler anlamında kullanılmıştır. Sonra Parker (1974) bağırsak dengesini sağlayan bileşenler ve organizmalar olarak tanımlamıştır fakat bu tanım antibiyotikleri ve kısa zincirli yağ asitlerini içerdiğinden Fuller (1989) daha geniş bir tanım yaparak probiyotikleri konak hayvanın bağırsak mikrobiyal dengesini faydalı yönde etkileyen canlı mikrobiyal katkılar olarak tanımlamıştır. Gatesoupe (1999), probiyotikleri sağlığı geliştirmek amacıyla canlı kalmak için bağırsak sistemine çeşitli yollardan giren mikrobiyal hücre olarak tanımlamıştır. Gatesoupe'un tanımı probiyotiklerin ağız yoluyla alımı ve bağırsak sistemindeki varlıklarının sonucu olarak konağın sağlığını geliştirme kabiliyeti üzerine odaklanmıştır (Balcazar et al., 2006d).

Bahadır-Koca ve arkadaşları (2011) ve Verschuere et al., (2000) ise probiyotikleri: konağın intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden, tüketilmeleri sonucunda sindirim sisteminde yararlı etkileri ile konağın sağlığında iyileşmeye ve hızlı büyümeye neden olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleri veya bunların metabolitleri olarak tanımlamışlardır.

Probiyotiklerin bir diğer tanımı ağız boşluğuyla yeterli miktarda alındığında bağırsak mikrobiyal dengesini iyileştirerek konakçıya faydalı olan canlı mikroorganizmalar şeklindedir (Giorgio et al., 2010). Probiyotiklerin su ürünlerinde kullanımıyla ilgili tanımı ise yem yoluyla ya da kültür suyuna eklendiğinde konakçıya hastalıklara direnç, büyüme performansı, yem kullanımı, strese yanıt ya da dış çevredeki mikrobiyal dengeyi sağlayan mikrobiyal hücrelerin canlı, ölü, ya da bileşen halleridir. Ayrıca büyümeyi ve hayvanlardaki bağırsak florasını optimize eden ve sindirim süreciyle bağışıklığı uyaran canlı mikroorganizmaları içeren biyoproteinler olarak isimlendirilirler (Dahanaraj et al., 2010).

Yetiştiricilikte probiyotiğin diğer tanımı: gelişmiş bir mikrobiyal denge sağlayarak konak sağlığına fayda sağlamak amacıyla bağırsak mikrobiyotasında tüketilen canlı mikrobiyal yem katkıları olan biyolojik olarak aktif olan bileşen ya da karışık mikroorganizma kültürleri, hastalığa dirençliliği sağlayan canlı mikroorganizmalar ya da yeterli miktarda alındıklarında konağın sağlığında iyileşme sağlayan canlı mikroorganizmalar şeklindedir (Gomez et al., 2007; Gram et al., 1999).

Balık bağırsak mikrobiyotası konağın sağlığında önemli rol aldığı için floranın faydalı mikrobiyal toplulukla maniplasyonu ilgi odağıdır. Bu durumda bu bakterilerin zararsız kolonizasyonu ve etki mekanizmaları düşünülmesi gereken noktalardır. Probiyotik bir mikroorganizmanın tanımı için zorunlu kriterler LABIP (Laktik Asit Bakteri Endüstriyel Platformu) tarafından belirlenmiştir (Ewaschuk and Dieleman, 2006). Buna göre probiyotik potansiyeli taşıyan mikroorganizmalar:

- Balık kökenli olması
- Doğada patojenik olmaması

- Mide asidi, safra tuzu ve proteazlar tarafından oluşturulan yıkıma dirençli olmaları
- Patojenlerin azaltılması ya da kolonize olmasını engellemek için bağırsak epiteline yapışabilmeleri
- Bakteriosin, organik asit, hidrojen peroksit ve siderofor gibi organik asitlerin üretebilmeleri
- İmmün yanıtı hafifletmeleri
- Gastrointestinal enzim ve metabolik aktiviteleri etkilemek (Balcazar et al., 2006d; Sahu et al., 2008; Denev et al., 2009) gibi özelliklere sahip olmaları gerekmektedir.

Sucul probiyotikler iki tiptir:

1) Bağırsak probiyotikleri olup besinle birlikte oral olarak alınıp bağırsağın faydalı mikrobiyal florasını arttıranlardır. 2) Su probiyotikleri olup ortamdaki besinleri tüketerek patojenlerin elimine olmasını sağlayan gruptur (Sahu et al., 2008).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotiklerin hastalıkların önlenmesinde ve beslenmenin geliştirilmesinde kullanılması çok popüler olmuştur (Sanchez et al., 2011; Balcazar et al., 2007c) çünkü geleneksel olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar insan sağlığı için tehlikeli olup sadece bakterilerde değil fungi, virüs ve parazitlerde antimikrobiyal dirençliliği geliştirdiği için çevre açısından da tehlikelidir. Probiyotikler sağlıklı mikrobiyotanın üyeleri olup ortamdaki varlıkları sağlıklı mikrobiyotanın normal hale dönmesini sağlar.

Probiyotiklerin diğer yararlı etkileri mukozal yüzeyde spesifik patojen reseptörleriyle rekabet, inhibitör bileşiklerin üretilmesi, besin substratları için rekabet ya da konağın doğal ve adaptif immün yanıtının geliştirilmesi şeklinde sayılabilir (Balcazar et al., 2007a; Merrifield et al., 2010a).

Gatesoupe (1991) inaktive preperasyon ya da ekstraktlardan ziyade canlı probiyotiklerin ticarileştirilmesinin daha önemli olduğunu vurgulamıştır. Yapılan farklı çalışmalarda laktik asit bakterilerinin balık türleri ve coğrafik lokasyonlara göre büyük bir farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur (Buntin et al., 2008;

Burshell C and Burns M., 2012). Son 15 yılda probiyotiklerin taksonomisi değişmiş olup belki de yeni tür ve strainler bulunabilecektir. Çalışmamızın esin kaynaklarından biri de bu olmuştur.

### 2.7.1. Sağlıklı bir bağırsağı uyararak için probiyotiklerin etki yöntemi

Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasının büyümesini modüle ederler, potansiyel zararlı bakterileri baskırlar ve vücudun doğal savunma mekanizmasını güçlendirirler böylece enfeksiyöz hastalıklara karşı direnç geliştirirler. Probiyotik bakteriler etki moduna sahip olmayıp türe spesifik ya da straine spesifik olarak etki ederler. Bunun yanında canlıların bağışıklık yanıtı ve bunun bağırsak bakteri topluluğuyla olan etkileşiminde anahtar bir rol oynarlar. Probiyotikler bağırsak patojenleri üzerinde antagonistik etkiye sahip olan inhibitör maddeler üretirler. Probiyotiklerin bağırsak mukozasına yapışma yeteneği birçok patojende yaygın olan bağırsak enfeksiyon yolunu bloke edebilir (Ringo et al., 2010), iştahı uyarıp, vitamin üretimiyle beslenmeyi düzeltebilir ve yemdeki bileşikleri detoksifiye edebilir. Bu etkileri birkaç yolla açıklamak mümkündür bunlar:

- 1) Patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemek için bağırsak yolu duvarına rekabetçi tutunmaları. Örneğin *Escherichia coli*'nin bağırsak duvarına hareketi *Lactobacilli*'nin bu bölgedeki başarılı mücadelesiyle engellenebilir. Patojenlerin adhezyonunu inhibe etme yeteneği spesifik probiyotiklere ve mukozal bölgedeki patojenlere bağlı görülmektedir. Probiyotiklerin bağırsağı giren zararlı bakterilere karşı antagonistik özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bağırsaktaki mikrobiyal anormallikler yetersiz sindirim ve gıda asimilasyonuna yol açabilmektedir. Bağırsak enfeksiyonunun ilk aşaması patojenik bakterilerin mukozal yüzeylere tutunması ve mikrobiyotanın bozulmasıyla gerçekleşmektedir. Probiyotik bakterilerin koruyucu rolü tutunma ve mukozal simulasyona kolonizasyon yoluylaadır. Bağırsak mukozasına yapışma probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmalardan beklenen birincil özelliktir. Gastrik patojen mukus tabakasına tutunmak için ya kolonize olmak ya da burayı aşmak zorundadır çünkü bağırsak mukoza bariyeri paraselüler yolu ve

bireyleri normal bağırsak florasını oluşturan kompleks popülasyonlardan ayıran efektif fiziksel bariyeri oluşturan yüzeysel mukus tabakasını kontrol eden sıkı kavşakları içerir.

- 2) Probiyotikler bağırsaktaki patojenlerde antagonistik etkiye sahip inhibitör bileşenler üretirler. Antagonizm probiyotik strainlerin büyümesi ya da bağırsaktaki inhibitör etkilerinin ifadesini destekleyen gıda rekabetinden ileri gelebilir. Probiyotiklerin mukus bağlantılı popülasyonları muhtemelen rekabet, bakteriosin ve diğer antimikrobiyal bileşiklerin salgılanması ve konakçı bağışıklık uyarısı sağlarlar.
- 3) Bakterisidal aktivite. Laktobasiller laktozu laktik asite fermente ederek pH'yı bakterilerin dayanamayacağı bir seviyeye düşürürler. Gram negatif bakterilerin üremesini engelleyen hidrojen peroksitte üretilmektedir. Hatta laktik asit üreten *Streptococcus* ve *Lactobacillus* türlerinin antibiyotik ürettikleri bildirilmiştir (Klose et al., 2010). Probiyotikler aynı zamanda kısa zincirli yağ asit üretimini arttırmak ve dolayısıyla su ve sodyum emilimini arttırmak ve kolonik motiliteyi düşürmek için kalın bağırsaktaki mikrobiyal ekosistemi modifiye ederler.
- 4) Amin sentezinin engellenmesi. Koliform bakteriler bağırsağı tahriş eden toksik olan ve diareyle oluşumuyla eş zamanlı olan amin üretmek için amino asitleri dekarboksile ederler. İstenilen bakteriler koliform çoğalmasını engellerse amin oluşumu da engellenmiş olur.
- 5) İmmun yeteneğin arttırılması. Probiyotik aktivitelerinin yardımıyla antikor üretiminin uyarılması ve fagositik aktivitenin arttırılması bağışıklık sisteminin gelişmesine yardım eder. Aynı zamanda virulens gen ifadesi, gastrik morfolojinin geliştirilmesi ve sindirim fonksiyonlarına yardım ederler. Bazı bakteriler balıklarda ve karideslerde konakçının patojenlere karşı antikor üretimini arttırarak savunma mekanizmasını geliştirir ve immüno stimulant olarak iş görürler (Tukmechi et al., 2007).

### **2.7.2. Probiyotiklerin diğer etkileri**

Probiyotikler konağın normal mikrobiyotasının stabilitesi ve gelişimini uygun şekilde etkiler ve patojenlerin kolonizasyonunu engeller. Probiyotikler aynı zamanda mukozal bariyeri, bağırsak epitelindeki besleyici etkileri ve bağışıklık sisteminin spesifik ve spesifik olmayan bileşenleriyle etkiler. Yüksek bir büyüme ve yem verimliliği sağlar, bağırsak düzensizliklerini önler gıda bileşenlerindeki besleyici olmayanların ön sindirimini sağlayarak gıdaların faydalı kullanımı geliştirirler. Gıda gereksinimini azaltarak üretim masraflarını azaltırlar. Probiyotiklerin aktivitelerinin sonucu olarak sağlık statüsünün yükseltilmesi, hastalık direncinin artırılması, büyüme performansı, vücut kompozisyonu, azaltılmış şekil bozuklukları, geliştirilmiş bağırsak morfolojisi, su kalitesinin artırılması, balıkların daha az atık üretmesinin sağlanması ve mikrobiyal dengenin sağlanması olarak özetlenebilir (Merrifield et al., 2010b; Tuan et al., 2013).

### **2.7.3. Probiyotik özelliklere sahip bakterileri seçme kriterleri**

Probiyotik mikroorganizmaların seçim kriterleri; güvenilirlik, teknolojik ve fonksiyonel yönler olmak üzere üç temele dayandırılmaktadır.

#### **2.7.3.1. Güvenlik Kriterleri**

Geleneksel olarak gıda endüstrisinde kullanılan probiyotikler güvenli kabul edilip insanlar üzerinde belirlenen herhangi bir risk gözlenmemiştir bu probiyotiklerin güvenli olduklarının en iyi kanıtıdır. Teorikte probiyotikler 4 tip yan etkiye neden olabilirler. Sistemik enfeksiyon, zararlı metabolik aktiviteler, bağışıklığın aşırı uyarılması ve gen transferi gibi. Genelde bu etkilerle ilgili güçlü bir kanıt bulunmamaktadır. Pratikte insanlarda birkaç bakteriyemi bildirilmiştir. Probiyotik olarak kabul edilen bazı laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliği kromozom, plazmit ya da transpozonlar üzerindeki genlerle ilişkilendirilebilir. Bazı enterocociler virulens özelliğe sahip olup antibiyotik dirençlilik elementlerini transfer edebilirler. Probiyotik ürün oluşturmak amacıyla yeni cins ve türlerin seçiminde FAO/WHO tarafından önerilen, uyulması zorunlu güvenlik kriterlerine dikkat edilmesi gerekmektedir.

Probiyotiklerin verimi ve güvenliğiyle ilgili uluslararası bir konsensus olmadığından FAO ve WHO probiyotiklerin besin/yem'lerde kullanılmasıyla ilgili bir sistematik yaklaşımda bulunmak ve iddialarını doğrulamak için bir rehber ihtiyacı duymaktadır. Uzmanlardan oluşan bir çalışma grubu bilimsel kanıtlara dayanan probiyotiklerin değerlendirilmesiyle ilgili bir metodoloji önermek için kurulmuştur (Pineiro and Stanton., 2007).

Probiyotiklerin yemlerde kullanılmasıyla ilgili sunulan rehberde onların yemdeki sağlık ve besleyici özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışma grubu laktobasil, bifidobakteri ve laktokoklarda patojenik ya da virulens özelliğe rastlamamışlardır. Probiyotiklerle ilgili araştırmaların üç yaklaşımla sürdürülmesi gerekmektedir. Probiyotik strainlerin intrinsik özelliklerinin analizi, bağırsaktaki canlılık, aktivite, dozaj cevabı ve mukozadan yenilenme gibi farmakokinetik özelliklerin çalışılması, mikroorganizma ve konak arasındaki etkileşimlerin anlaşılması gerekmektedir.

#### **2.7.3.2. Teknolojik Kriterler**

Probiyotik suşların seçiminde birçok teknolojik yön de göz önünde bulundurulmalıdır (Saarela et al., 2000). Bu teknolojik kriterler: Faj dirençlilik ve genetik stabilite, Üründe ve depolama sırasında stabil kalabilmek, ürün tadına olumsuz etkide bulunmamak, büyük ölçekte üretime uygun olmak, üretim süresince canlı kalabilmesi gibidir.

#### **2.7.3.3. Fonksiyonel kriterler**

Probiyotiklerin fonksiyonel gereklilikleri, in-vitro metodlar kullanılarak ve bu çalışmaların sonuçları in-vivo çalışmalarla kontrol edilerek kanıtlanmalıdır. Probiyotik bir suş seçilirken aşağıdaki fonksiyonel yönler göz önüne alınmalıdır (Saarela et al., 2000).

- a) Epitel yüzeye tutunabilmeli ve insan gastrointestinal sisteminde sürekli kalabilmeli,
- b) İmmün sistemi uyarmalı fakat proinflammatuar etkisi olmamalı,
- c) Patojenlere karşı antimikrobiyel etkiye sahip olmalı,



- d) Aside ve insan mide suyuna dirençli olmalı,
- e) Safra tuzlarına dirençli olmalıdır.

Öncelikle probiyotikleri kullanmadaki amaç, sucul hayvanların bağırsak deri mukoza florasını oluşturan patojenik ve faydalı mikroorganizmalar arasında sağlıklı bir ilişki kurmak ve bunu sürdürmektir. Dolayısıyla başarılı probiyotiklerin faydalı etkilerini desteklemek için birkaç özel özelliklere sahip olması beklenmektedir (Ringo and Vadstein, 1998; Panigrahi and Azad, 2007).

Probiyotiklerin seçilmesi çok kritiktir çünkü uygun olmayan strainler konak üzerinde istenmeyen etkilere yol açabilirler. Bağırsak kolonizasyonu yetiştiricilikte seçilecek potansiyel probiyotikler için önemli bir kriterdir. Konak, sucul çevre ve tüketiciler için patojenik olmamalıdır. İyi bir strain üst bağırsak sisteminden geçerken hayatta kalabilmeli, etki bölgesine ulaşım bağırsak çevresinde fonksiyonel olmalıdır. Bağırsak sıvısı ve safra tuzuna dayanıklı olup epitelyum yüzeyine tutunmalı, bağırsak sisteminde kalıcı olup bağışıklık uyarısına sahip olmalıdır. *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* gibi bağırsak patojenlerine karşı antagonistik aktiviteye sahip olmalıdır. Antibiyotik dirençlilik genlerini kodlayan plazmitler içermemelidir. Konakta ve yetiştirme çevresinde doğal olup yem katkısı olarak tescillenebilir olmalıdır. Probiyotik seçimi için teknolojik görüşler faj dirençliliği, algısal özellikler, işleme sırasında çeşitlilik, depolama ve üretimde stabildedir. Antibiyotik dirençliliği için genetik değiş tokuş özelliğini kazanmamalıdır. Probiyotik kullanımındaki ana strateji istenilen özelliklere sahip bağırsak bakterilerini olgun hayvandan izole etmek ve bunların yemde yüksek oranda bulunmasını sağlamaktır. *Lactobacilli* gibi probiyotikler deri, solungaç ve bağırsaktan izole edilebilirler. Bazen larva ve yavruların mikrobiyotasının normal parçası olduğuna inanılmaktadır. İstenilen özellikteki probiyotik strainlerin bir araya getirilmesiyle bir strainin faydasından çok daha fazla yarar sağlanabilir (Ige Badina, 2013).

*Lactobacillus* gibi strainlerin ve diğer laktik asit bakterilerinin balıklarda uygulanması canlı mikroorganizmaların yeme katılmasıyla gerçekleşmektedir. Strainin seçilmesi balık türü, yetiştirme koşulları, hastalık önlenmesi, geliştirilmiş büyüme performansı gibi sayılabilir. Probiyotiklerin balıklarda mikrobiyal bileşen olarak başarılı bir şekilde uygulanması için işleme, depolama ve bağırsak

geçişinden sonra yüksek oranda hayatta kalmasıdır. Alabalık çalışmalarında canlı kültürler temel yeme spreylenecek, dondurulmuş ya da kurutulmuş olarak, ölü hücre, parçalanmış hücre, hücresiz süpernatant, etkili sporlar olarak sıralanabilir. Probiyotik uygulamaları larval safhada istenebilir çünkü balıklardaki bu safha beslenme başlangıcında ya da sindirim sistemi tamamiyle geliştiğinde ve bağışıklık sistemi eksik olduğunda bağırsak mikrobiyotasıyla ilişkili bozukluklara maruz kalmaktadır. Uygun dozaj seviyesi dikkate alınmalıdır. Bu bakteriler çeşitlidir ve probiyotik türlere, konak balık türüne, konağın fizyolojik durumuna, besleme uygulamasının ana amacına bağlıdır. İdeal olan probiyotiklerin faydalı olması ve konağa herhangi bir zararlı etkisinin olmamasıdır. Bu yüzden tüm strainler sucul hayvanlar tarafından alındığında yan etkilere sebep olmaması için toksik ve patojenik olmamalıdır. Probiyotiklerin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibi olmalıdır.

#### **2.7.3.4. Rekabetçi dışlama**

Rekabetçi dışlama kurulmuş bir mikroflorada bağırsaktaki aynı lokasyona olan rekabetçi kolonizasyonu azaltan ya da engelleyen bir olgudur. Bu mikroflora sucul hayvanların bağırsağında oluşmak için kuluçkalama işleminde ve bakterilerin ortamda oluşmasından kısa bir süre sonra başlar. Rekabetçi dışlamada kültürlerde dizayn edilen probiyotik ürünlerdeki amaç mukozadaki tutunma bölgeleri için rekabet, besinler için rekabet, inhibitör bileşiklerin üretilerek patojenite bakterilerin çoğalmasını ya da kolonizasyonunu engelleyen stabil, anlaşılır ve kontrollü bir mikrobiyotanın oluşturulmasına dayanmaktadır. Mikroorganizmaların tutunma bölgelerine bağlanmasında pasif güçler, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik, sterik güçler, lipoteikoik asitler, adezyonlar ve adezyonların spesifik yapıları gibi farklı stratejiler rol almaktadır. Rekabetçi dışlama faktörleri bağırsak epitelyum hücrelerine tutunma ya da bağışıklık sisteminin aktivasyonu için önemli faktörler olup organizmaların sağlığına, bağırsak dengesine ve sindirimine yardım eder (Lara –Flores, 2011).

Probiyotik bakterilerin intestinal sistemdeki konağın doğal florasının patojenler için bir bariyer oluşturmasına yardımcı olmak en önemli fonksiyonlarından biridir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizmaların seçiminde,

patojenleri ve bozulma etmeni mikroorganizmaları inhibe etme potansiyeli önemli bir kriterdir. Birçok probiyotik suş, bu fonksiyonu hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), organik asit, diasetil, biyosürfaktan maddeler, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri molekülleri içeren bir ya da birkaç antimikrobiyel maddeyi üretmek ya da bağırsak epitel hücrelerine patojen bakterilerin tutunmasını engellemek suretiyle yerine getirmektedir (Ouweland et al., 2000).

Aday probiyotiklerin in-vitro antagonizm testini gerçekleştirmesi için genel yol patojenlerin aday probiyotiklere ya da sıvı ortamda ekstraselüler ürünlerine maruz bırakılmasıyla olur. İn-vitro antagonizm sonuçları büyük bir dikkatle yorumlanmalıdır. İnhibisyon sürekli üretilen inhibitör bileşiklerin sonucu olmayıp primer metabolitlerden ya da ortamdaki pH değişiminden de kaynaklanabileceği dikkate alınmalıdır. Bu teste dayanarak probiyotiklerin ön seçimi efektif probiyotiklerin seçilmesini sağlamaktadır (Vershuere, 2000).

Yüksek çeşitlilikteki mikrobiyal toplulukların kontrol edilmesi zordur. Bu tip topluluklar istilayla ya da belirli patojen mikroorganizmaların eklenmesiyle oluşan etkileri dağıtabilir. Bakteriyal antagonizm doğada yaygın bir fenomendir. Bu yüzden mikrobiyal etkileşimler patojen ve faydalı mikroorganizmalar arasındaki dengede çok önemli rol oynarlar. Ek olarak mikroorganizmalar temel araştırmalarda ticari anlamda mikrobiyal büyüme üzerinde inhibitör etkiye sahip biyoaktif doğal ürünlerin kaynağı olabilir (Vershuere, 2000).

Antagonistik bileşikler mikroorganizmalar tarafından üretilen başka mikroorganizmalar üzerinde toksik ya da inhibitör olan kimyasal bileşenler olarak adlandırılırlar. Konağın bağırsağında, yüzeyinde ya da kültür suyunda antibakteriyal bileşik üreten bakterilerin varlığı patojen bakterilerin çoğalmasını engelleyen hatta onların elemine etmesi düşüncesini akla getirmektedir. Antibakteriyal bileşikler bakteriler üzerinde direkt ya da indirekt etkilerine göre ayrılabilirler. Laktik asit bakterileri sıklıkla bakteriyosin üretirler fakat bunlar sadece yakın ilgili türler yetiştiricilikte bulunan türler üzerinde etkilidirler. Antibakteriyal bileşiklerin yapısı her zaman ayırt edilemeyip etki mekanizmaları henüz bildirilmemiştir ve bunların in vivo'da üretildiklerine dair herhangi bir bilgi

bulunmamaktadır. Patojenlerin bu bileşiklere karşı dirençlilik geliştirmesi mümkündür (Vershuere, 2000).

Diğer taraftan antagonizm testlerinde probiyotik türlerin kaynağı önemli bir elementtir. Mikroorganizmalar gelişmeleri boyunca farklı fizyolojiler ve biyokimyasal aktivitelerde bulunurlar. Bu özellikler tutunma bölgeleri için probiyotik potansiyeli etkiler ve belki de in vivo testlerde probiyotiklerin inhibisyonunda yanlış izlenimlere sebep olur. Probiyotik taranması antagonizm, faydalı bileşiklerin üretimi, tutunma ve çeşitli çevrelerde büyüme gibi farklı stratejileri gerektirmektedir (Vershuere, 2000).

#### **2.7.3.5. Bağışıklık uyarılması**

Balıkların ve daha yüksek vertebratların bağışıklık sistemleri benzer olup iki integral bileşene sahiptir. Bunlardan ilki çeşitli hücreler ve humoral bileşikler tarafından oluşturulan doğuştan, doğal ya da spesifik olmayan savunma sistemi; diğeri adapte, kazanılmış ya da antikor üretimi yardımıyla oluşan humoral bağışıklık cevabı ve T-lenfositlerle karakterize edilen özel bağışıklık sistemidir. Bağışıklık ekosistemindeki normal mikrobiyota balıklarda hastalığa dirençte hayati öneme sahip olan doğuştan bağışıklığı etkiler ve fiziksel bariyer, humoral ya da hücrel bileşenlere bölünür. Doğuştan humoral parametreler antimikrobiyal peptitleri, lizozim, tamamlayıcı bileşenler, ileticiler, pentraksinler, lektinler, antiproteazlar ve doğal antikorları içerir. Spesifik olmayan bağışıklık sistemi probiyotikler tarafından uyarılabilir. Gökkuşığı alabalıklarına ağızdan verildiğinde *Clostridium butyricum*'un lökositlerin fagositik aktivitesiyle balığın vibriosise dirençliliğini arttırdığı görülmüştür (Lara –Flores, 2011).

#### **2.7.3.6. Antiviral etkiler**

Aday probiyotik olarak kullanılan bazı bakteriler antiviral etkilere sahiptir. Bazı çalışmalar doğal bakteri ve probiyotiklerin bağırsak yüzeyinin glikolizasyonunu değiştirebilen dolayısıyla viral reseptörlerin yapısını değiştirerek virüs girişini ve tanıma bölgesini bozan çözülebilir etkenler üretirler (Freitas et al., 2003). Bu mekanizma tam olarak bilinmemesine rağmen laboratuvar ortamında virüslerin inaktivasyonunun deniz algleri ve bakterilerin hücre dışı kimyasal ve

biyolojik bileşenleriyle gerçekleştirdiği görülmüştür. Alabalık çiftliklerden izole edilen *Pseudomonas* sp. *Vibrio* sp. *Aeromonas* sp. ve coryneformların infeksiyöz hematopietik nekroziz virusun oluşturduğu plağı %50 oranında azalttığı görülmüştür (Lara –Flores, 2011).

### **2.7.3.7. Bağırsak Hücrelerine Tutunma ve Sindirim Sistemine Kolonizasyon**

Probiyotikler doğal mikroflorayı oluşturup konaklarının sağlıklı olmasını sağlar. Bazı strainlerin mukusa, bağırsak sistemine, epitelyum hücre ve diğer dokulara tutunmaları probiyotik seçmedeki genel kriterlerden olup bakteri kolonizasyonu ile ilgilidir. Probiyotik mikroorganizmaların intestinal epitelyum yüzeylere tutunabilme kapasiteleri; intestinal bölgede kolonize olabilmelerinde, patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellemede, immün sistem modülasyonunda, hasarlı mukozanın iyileştirilmesinde ve daha fazla ve uzun süreli probiyotik etki sağlayabilmede kritik önem taşımaktadır. Probiyotik bakteriler, ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmaların kolonizasyonunda etkili olan tutunma ve/veya koagregasyon faktörleri gibi farklı kolonizasyon mekanizmalarına sahiptir. Hayvanların bağırsak sisteminin probiyotiklerce kolonizasyonu yalnızca doğumdan sonra ve rekabetçi doğal mikrobiyotanın kesin olarak kurulmasından önce mümkündür. Bu kurulumdan sonra probiyotiklerin yüksek dozlarının verilmesi yapay ve geçici baskınlığı sağlar. Laktobasillerin insanlarda ince ve kalın bağırsağa tutunma ve kolonize olma mekanizmaları, hayvanlardaki tutunma ve kolonizasyon mekanizmalarından farklıdır. Hayvanlarda bu tutunma proksimal sindirim sistemde bulunan katlanmış epitel yüzeylerinde gerçekleşmektedir. Olgun hayvanlarda bağırsak sistemindeki probiyotik organizma popülasyonu alım bittikten sonraki birkaç gün içinde keskin bir azalış gösterir (Sanchez et al., 2011).

Conway (1996) bir organizmanın bağırsakta uzun süre kaldığında ve çoğalması dış ortama çıkmasından yüksek olduğunda oraya kolonize olabildiğini belirtmiştir. Mukozal yüzeylere tutunma ve kolonizasyon tutunma bölgeleri ve besinlere ya da bağışıklık modülasyonu ile olan rekabet yoluyla patojenlere karşı bir savunma mekanizması oluşturur. Tutunmanın temel prensibi konakta belirli bir

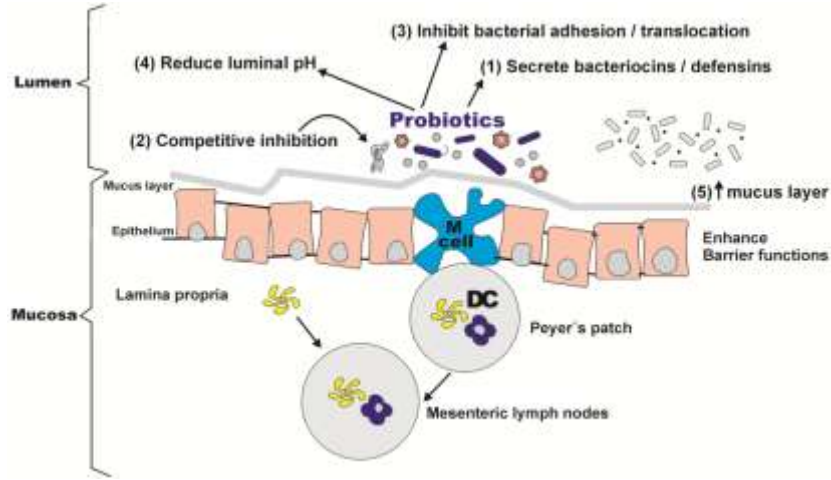
seviyesini elde etmek ve sindirim sisteminden yiyeceklerle dışa atılımını engellemektir.

#### **2.7.3.8. Sindirim işlemi**

Probiyotikler mideden geçip bağırsağa tutunduklarında büyümeleri için birçok karbonhidrat kullanırlar ve organik maddelerin ve proteinlerin sindirimini sağlayan (amilaz, proteaz ve lipaz) sindirim enzimleri üretirler, bağırsak düzensizliklerini engellerler, bitki protein kaynaklarında bulunan sekonder bileşiklerin üretimini uyarırlar ya da üretirler. Balıklarda probiyotikler kullanıldığında büyüme performansı, yem verimi, organik maddelerin ve proteinlerin sindiriminde yararlı oldukları kanıtlanmıştır (Lara-Flores, 2011).

#### **2.7.3.9. Asiditeye ve Safra Tuzlarına Direnc**

Probiyotik olarak kullanılacak bir mikroorganizmanın, sindirim sisteminden geçişi sırasında canlı kalabilmesi zorunludur. Bu nedenle lizozim başta olmak üzere, ağız boşluğunda bulunan enzimlere dayanıklı olması ve midenin gastrik ortamından (pH 1,5-3,0) büyük ölçüde etkilenmemesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriter suşların asit dirençleridir. Probiyotik seçiminde kullanılan diğer bir kriter ise suşların safra tuzlarına direnç özellikleridir. Safra tuzları kolesterolün suda çözünebilen son ürünüdür. Safra tuzları, karaciğerde kolesterolden sentezlenir ve safra kesesinden duodenuma salgılanır (500-700 mL/gün). Bu asitler daha sonra kolonda mikrobiyal aktiviteden dolayı kimyasal modifikasyonlara (dekonjugasyon, dehidroksilasyon, dehidrojenasyon ve deglukuronidasyon) uğrar (Lara-Flores, 2011). Safra asitlerinin konjuge olan ve olmayan formları özellikle mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Ancak bu etki konjuge olmayan formlarda ve gram pozitif mikroorganizmalarda daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır (Başyigit, 2004).



Şekil 2.4. Probiyotik bakteriler tarafından bariyer fonksiyonunun artırılmasının şematik gösterimi (Otutumi et al., 2012).

#### 2.7.4. Potansiyel Probiyotikerin Konak Üzerinde İn-vivo Değerlendirilmesi

Probiyotiklerin besleme etkisi düşünüldüğünde aday probiyotikler sucul türlerin kültürüne eklenerek büyüme ve hayatta kalma parametreleri üzerindeki etkisi değerlendirilebilir. Probiyotikler konağa ya da çevresine birkaç yolla eklenebilir: yapay yeme ekleme, kültür suyuna ya da canlı yeme eklenebilirler.

##### 2.7.4.1. İn-vivo antagonizm test- deneysel enfeksiyon

Bir kültür probiyotik olarak değerlendirilmeden önce konakta patojenik etki oluşturup oluşturmadığına bakmak gerekmektedir. İn vivo patojenite testi temsili patojenle deneysel enfeksiyonu içerir. Bu yüzden hedef tür aday probiyotikle normal ve stresli koşullarda patojenite edilmelidir. Patojenler ya da fırsatçı patojenler yem, immersiyon ya da kültür suyuna ekleme yoluyla eklenebilir. Bunların henüz kurulmuş mikrobiyotadaki her türlü kültürel etkileşimi engellemek için monoksenik koşullarda yapılması gerekmektedir. Probiyotikler biyolojik kontrol ajanı ya da canlı yemin üretimini arttırmak amaçlı düşünüldüğünde predatör larva ya da juvenile karşı patojenitesi dikkate alınmalıdır. Patojenin nasıl geliştiğini belirlemek için uzun dönemli etkiler çalışılmalıdır. Patojenin büyümesi ya da patojenitesinin probiyotiğin antagonizm etkisi

tarafından gerçekten baskılandığı mı yoksa geçici bir besin rekabetinden mi kaynaklandığının incelenmesi önemlidir (Vershuere, 2000).

#### **2.7.4.2. İzleme araçlarının geliştirilmesi**

Probiyotiklerin büyük çaplı kullanımına karar verildiğinde bakteriyel kültürlerin üretim ve uygulamalarının kontrol edilmesi için izleme araçlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Büyük çaplı bakteriyel biyomasın üretilmesi diğer bakterilerin kontaminasyonunu engelleyen kalite kontrole ihtiyaç duyar. Üretilen bakteriyel strainlerin genetik stabilitesine dikkat edilmelidir. Çünkü spontan ya da indüklenen mutasyonlar strainlerin probiyotik aktivitesini etkileyebilir. İzleme probiyotiklerin yetiştirilen sucul türlerin girişinden sonra yapılmalıdır ve rutine alınmalıdır (Vershuere, 2000).

### **2.8. Probiyotiklerin Yetiştiricilikte Kullanılması**

Su ürünleri yetiştiriciliği hayvan proteini üretiminde en önemli seçeneklerinden birisidir ve organizmayı sağlıklı tutmak ve büyümeyi desteklemek için bazı tamamlayıcı katkılar ve yüksek protein içeren yüksek kaliteli yemlere gereksinim duyar. Probiyotiklerin çiftlik hayvanlarında yem olarak kullanılması 1970'lere dayanmaktadır. Probiyotiklerin yetiştiricilikte kullanılması yem katkılarını kullanarak yem fiyatını azaltmanın en iyi yollarından biri olarak kabul edilmektedir. Probiyotiklerin başlıca etkileri yem verimini ya da günlük alımı iyileştirmektir. Bu katkı maddelerinin kullanılması balık çiftçilerine sağlık, kazanç ve üreme ve yem verimi açısından maksimum performans sağlar. Probiyotiklerin yeme katılmasının sebebi hayvanın büyümesini arttırmak ve hastalıklara direncini arttırarak sağlığını iyileştirmektir. Birçok ülkede yapılan araştırmaların probiyotik olarak kullanılan bazı bakterilerin (*Lactobacilli*) bağışıklık sistemini uyardığını göstermiştir. Bazı probiyotiklerin sucul organizmaların beslenmesi üzerindeki pozitif etkiler üzerinde çok yoğun çalışmalar bulunmaktadır.

Akrami ve arkadaşları (2008) yavru *Huso huso*'ların yemine probiyotik katıldığında büyüme, hayatta kalma ve beslenme veriminde gelişme olduğunu göstermiştir. Gatesoupe (1991) kalkan larvalarının laktik asit bakterilerinin



probiyotik strainleriyle beslendiğinde en iyi büyüme ve hayatta kalma oranına sahip olduğunu göstermiştir.

Yem katkı maddelerinin kullanılması bakteriyostatik bir etki gösterir ya da beslenme alanında yaşayan bakteri popülasyonlarını uyarır. Su ürünleri yetiştiriciliğindeki probiyotikler birkaç etki moduna sahiptirler. İnhibitör bileşiklerin sentezlenmesi yoluyla patojen bakterilerin rekabetçi dışlanması, su kalitesinin iyileştirilmesi, konakçı türlerinin bağışıklık cevabının geliştirilmesi ve ek sindirim enzimleri yoluyla beslenmesinin geliştirilmesi (Carnevali et al., 2006). Yemdeki katkı formunda bulunan ilave yemler kültür sistemlerinin taşıma kapasitesinin artırır ve sazan gibi sıcak sularda bulunan balıkların üretimini artırır ve kısa zamanda en iyi üretimi sağlar (Deveraj et al, 1986).

Sazan gibi omnivor ve karnivor balıklar için en önemli faktörlerden birisi sindirilebilirlik ve yapay pelet yem sindirilebilirliğidir. Yemlerdeki lif ve probiyotik gibi geleneksel olmayan katkıları yem sindirilebilirliği ve emilimini geliştirir. Sucul hayvanların üretiminde ticari yönden bakıldığında yem balık yetiştiriciliği yönetiminin %50 masrafını oluşturmaktadır (Noveirian et al., 2012).

### **2.8.1. Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılan farklı strainler**

Probiyotiklerin çoğu laktik asit bakterilerine aittir. *Vibrio*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Roseobacter* genusları bunların başlıcalarıdır (Ringo et al., 2010). Bağırsak sistemiyle ilişkili laktik asit bakterilerinin popülasyon seviyesi yaş, beslenme alışkanlığı, mevsim, tuzluluk ve stresle ilişkili fizyolojik, gıdasal ve çevresel faktörlerden etkilenir. Yapay yemle beslenen yavru balıklarda çok az bulunmalarına rağmen eğer yeme eklenirlerse bağırsak florasında baskın olabilirler. Yetiştiricilikte kullanılan probiyotikler şöyledir: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aeromonas sobria*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Carnobacterium divergens*'tir. *Bacillus*'ların yemde probiyotik olarak kullanılmalarındaki avantaj pelletleme aşamasında hayatta kalma yetenekleridir.

**Çizelge 2.10** Probiyotik olarak kullanılan bazı mikroorganizmalar (Çakır ve Çakmakçı, 2004).

İnsanlar için kullanılanlar	Hayvan beslemede kullanılanlar	
<i>L.acidophilus</i> <i>L. casei</i> Shirota <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L.reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. longum</i> <i>B. infantis</i> . <i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophiles</i> , <i>S. boulardii</i>	<i>L.acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L.reuteri</i> <i>L.fermentum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. helveticus</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. brevis</i> <i>B. pseudolongum</i> <i>B. thermophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>  <i>B. natto</i> <i>B. toyoi</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>P. acidilactici</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Candida pintolopesi</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulopsis spp</i>

**Çizelge 2.11** Probiyotiklerin yetiştiricilikteki farklı uygulamaları (Cruz et al., 2012).

Uygulama	Probiyotik adı	Uygulanan tür
Büyüme promotu	<i>Bacillus sp. S11</i>	<i>Penaeus monodon</i>
	<i>Bacillus sp.</i> <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Alteromonas CA2</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus lactis AR21</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptomyces</i> <i>L. casei</i> <i>Bacillus NL 110, Vibrio NE 17</i> <i>Bacillus coagulans</i>	<i>Catfish</i> <i>Gadus morhua</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Xiphophorus helleri</i> <i>Poeciliopsis gracilis</i> <i>Macrobrachium rosenbergii</i> <i>Cyprinus carpio koi</i>
Patojen inhibisyonu	<i>Bacillus sp.</i> <i>Enterococcus faecium SF 68</i> <i>L. rhamnosus ATCC53103</i> <i>Micrococcus luteus A1-6</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>P. fluorescens AH2</i> <i>Pseudomonasp.</i> <i>Roseobacter sp. BS. 107</i> <i>Saccharomyces cerevisiae, S.</i> <i>exiguus, Phaffia</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>V. fluvialis</i> <i>Tetraselmis suecica</i> <i>Carnobacterium sp. Hg4-03</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus spp., Enterococcus sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Penaeids</i> <i>Anguilla anguilla</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i>  <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Scallop larvae</i> <i>Litopenaeus vannamei</i>  <i>Salmonids</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salmo salar</i> <i>Hepialus gonggaensis larvae</i> <i>Clarias gariepinus</i> <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> <i>Epinephelus coioides</i>
Besin sindirimi	<i>L. helveticus</i> <i>Bacillus NL 110, Vibrio NE 17</i> <i>Carnobacterium sp. Hg4-03</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Shewanella putrefaciens Pdp11</i>	<i>Scophthalmus maximus</i> <i>Macrobrachium rosenbergii</i> <i>Hepialus gonggaensis larvae</i> <i>Clarias gariepinus</i> <i>Solea senegalensis</i>

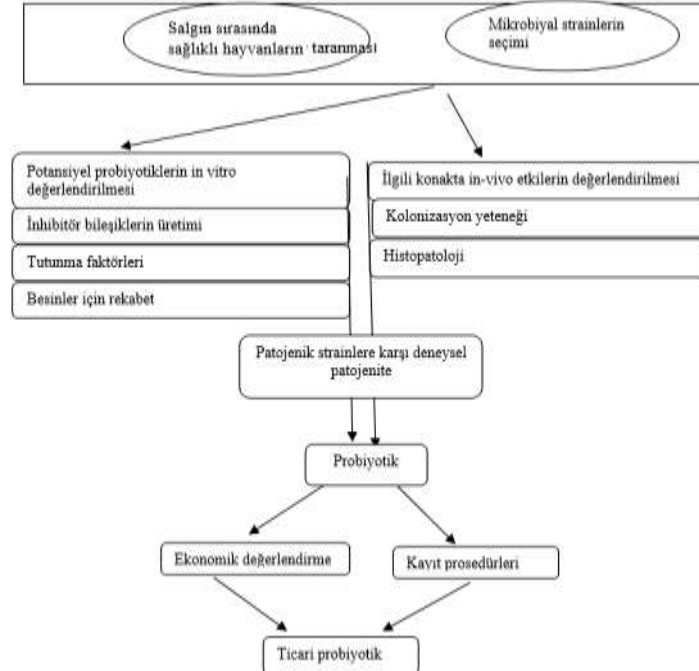
**Çizelge 2.11** (Devam)

Su kalitesi	<i>Bacillus sp. 48</i> <i>Bacillus NL 110</i> , <i>Vibrio sp. NE 17</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>B. coagulans SC8168</i> <i>Bacillus sp.</i> , <i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Penaeus monodon</i> <i>Macrobrachium rosenbergii</i>  <i>Clarias gariepinus</i> <i>Pennaeus vannamei</i> <i>Penaeus monodon</i>
Stres toleransı	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Alteromonas sp.</i> <i>B. subtilis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. cerevisiae</i> <i>L. casei</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Shewanella putrefaciens Pdp11</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Sparus auratus</i> <i>Paralichthys olivaceus</i>  <i>Poecilopsis gracilis</i> <i>Litopenaeus stylirostris</i> <i>Makimaki</i>
Üremenin iyileştirilmesi	<i>Bacillus subtilis</i>  <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Poecilia reticulata</i> , <i>Xiphophorus maculatus</i> <i>Danio rerio</i>  <i>Xiphophorus helleri</i>

### 2.8.2. Yetiştiricilik için düşünülen probiyotikler

Uzun süre önce keşfedilen probiyotikler laktik asit üreten *Lactobacillus* sp.'dir. Bu yüzden *Aeromonas hydrophila*, *A. media*, *Alteromonas* sp., *Carnobacterium inhibens*, *Debaryomyces hansenii*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Roseobacter* sp., *Streptococcus thermophilus*, *S. exiguus*, *Vibrio alginolyticus*, *V. fluvialis*, *Tetraselmis suecica* ve *Weissella helenica*, *Lactococcus* sp. gibi birçok tür yetiştiricilik amaçlı kullanılmakta ya da kullanılacaktır (Sahu et al., 2008).

**Çizelge 2.12** Probiyotiklerin yetiştiricilikte biyokontrol ajanı olarak seçilmesi için diyagram (Balcazar et al., 2006d).



### 2.8.3. Su Ürünlerinde Probiyotik Uygulamaları

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotikler; özellikle üretimi arttırmak, sudaki patojenlerin engellenmesi ve su kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

#### 2.8.3.1. Patojenlerin yayılımının engellenmesi

Balık sağlığı mikrobiyal istilalara karşı kendi bünyelerindeki direnç mekanizmasına birinci dereceden bağlıdır. Bundan dolayı sucul çevrede bulunan mikroorganizmalar balıkların büyümesinde doğrudan etkilidirler (Maeda, 1999). Sucul ortamda mililitrede bir milyondan fazla mikroorganizma bulunur; bu mikroorganizmalar ürettikleri ve yaydıkları maddeler ile birbirlerinin yaşamları üzerinde etkiye sahiptirler. Bu nedenle yetiştiricilik suyuna düşük dozlarda organik madde ilavesi hem balık larvalarının yaşama oranlarını artırır hem de organik maddeleri besin olarak kullanan faydalı mikroorganizmaların gelişmesini sağlar (Maeda, 1999).

Sudaki virüs ve zararlı bakterileri tespit ederek onları uzaklaştırmak yetiştiricilikle uğraşan kişilerin temel hedefidir. Bunun için suyun filtre edilmesi, sodyum klorit ilavesi, ozonlama, UV sterilizasyonu ve yapay antibiyotikler bulunduran yemler kullanma, yetiştiricilikte düzenleyici metotların yaygın olanlarıdır. Bu metotlar her ne kadar etkili olsa da patojenleri uzaklaştırmak için çözüm olmamaktadır. Özellikle uzun süreli çözüm şansı hemen hemen hiç yoktur. Örneğin eğer kanamycin antibiyotiği suya ilave edilirse iki günlüğüne bakteri sayısı azalır, fakat sonra bakteri sayısı eski seviyesine gelecektir. Deniz suyu; filtrasyon, UV ve ozonlama ile sterile edildikten sonra da aynı durum görülebilir; bu uygulamalardan sonra bakteri popülasyonu çok hızlı çoğalır. Çünkü bakteriyel popülasyonlar arasındaki antagonizm azaltılmış olur. Daha da önemlisi hiç kimse yukarıda sayılan uygulamalardan sonra oluşan boşlukta tekrar hangi bakterilerin üreyeceğini bilemez (Maeda, 1999). Bu nedenle yukarıda sayılan uygulamalardan sonra ortama yararlı bakteri ilavesi zararlı bakteri ve virüslerin gelişimini sınırlandıracaktır. Yetiştiricilik çevrelerinde sürekli hastalıklar artmakta ve bunlara yönelik farklı tedavi yöntemleri bulunamamaktadır. Çünkü bazı

hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerde direnç gelişimi olmakta ve uygulanan tedavi yöntemleri gitgide etkinliğini kaybetmektedir. Bu olguların farkına varılmasından sonra bakterilerin antagonistik özelliklerinden faydalanma yoluna gidilmiştir. Bu yüzden belirli patojen mikroorganizmalara yönelik antagonizm gösteren spesifik bakteriler öne çıkmaya başlamıştır. Mikroplar arasındaki antagonizm doğal olarak sucul çevrede hangi mikropların ölmesi veya azaltılması gerektiği yönünde bir görüş ortaya çıkardı. Bu biyolojik veya biyokontrol olarak bilinen metot yetiştiricilik alanında çoktan beri uygulanmaya başlamıştır. Örneğin patojenik böcekleri oral yolla etkileyerek sonunda onları öldüren ünlü bakteri *Bacillus thuringiensis*, Avrupa ve Kuzey Amerika'da binlerce ton kullanımı ile şu an yaygın olarak uygulanabilmektedir. Bu olumlu sonuçlar biyokontrol aracı olarak patojen organizmaların elimine edilmesi için kullanılan virüs, mantar ve protozoonlarla ilgili ileri çalışmalarına öncülük etmiştir (Maeda, 1999).

Chabrillon ve arkadaşlarının 2006 yılında çipuralardan izole edilen probiyotik organizmaların *Listeria anguillarum*'un önlenmesi konusunda yaptıkları çalışmada; çipuraların deri, solungaç ve bağırsak mukuslarında yerleşmiş olan 4 tane suş üzerinde çalışılmıştır. Bunların *L. anguillarum*'a karşı etkileri incelemişlerdir. Mukusa tutunma özelliğinin bütün izolatlarda %7'den daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 3 suşun patojenlere karşı antagonistik etkisi gözlenmiştir. Bu suşların *L. anguillarum*'un balık mukusuna tutunması üzerine etkisi de incelenmiş ve yalnızca iki adet suşun balığın mukusuna *L. anguillarum*'un tutunmasını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu şekilde bir suş seçilerek oral yolla invivo probiyotik potansiyeli test edilmiştir. Daha sonra *L. anguillarum* ile epruvasyon yapılmıştır. Besleme denemeleri için 50 adet balık alınmış ve ticari balık yemine liyofilize edilmiş bakteri  $10^8$  cfu/g olacak şekilde eklenmiştir. Uygulama 15 gün devam etmiştir. Diğer deney grubunda ise hiçbir şey eklenmemiş ticari yem verilmiş ve epruvasyondan sonra balıklarda mortalite; diyete probiyotik ilave edilmiş olan grupta kontrol gruba oranla daha düşük bulunmuştur.

### **2.8.3.2. Probiyotiklerin Bağışıklık Sistemine Etkisi**

Kim ve Austin (2006), doğuştan gelen savunma sisteminin probiyotiklerle desteklenmesi konusunda yaptıkları çalışmada; sağlıklı gokkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum) bağırsaklarından izole edilen *C. maltaromaticum* ve *C. divergens* probiyotik olarak denenmiş; *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı yapılan direnç testlerinde başarı göstermiştir. Böylece alabalıklar bu bakterileri  $10^7$  hücre/ml içeren yemlerle beslenmişler ve yukarıda sayılan patojenlerin virülens suşları ile test edilmişlerdir. Her iki bakteri de uygulamadan 3 hafta sonra midede bulunmuştur. Bu kültürler balıklarda humoral (salgisal) ve hücresel bağışıklık sistemini güçlendirmişlerdir. Özellikle *C. maltaromaticum* içeren yemlerle beslenen balıklarda n böbreklerdeki makrofajların fagositik aktivitelerinde büyük oranda artış olmuştur. Bununla birlikte *Carnobacterium divergens* içeren yemle beslenenlerde de serum lizozim aktivitesi ve respiratory burst aktivitesi (Super oksit anyon aktivitesi) yükselmiştir. Bağırsak mukusunun lizozim aktivitesinde her iki probiyotikle beslenen balıklarda da istatistiki olarak kontrol gruba oranla yüksek farklar bulunmuştur.

Brunt ve Austin'in (2005) alabalıklarda *Lactococcus* ve *Streptococcus*'un önlenmesi konusunda yaptıkları çalışmada; Gokkuşağı alabalığı ve sazanların sindirim kanalından 125 bakteri suşu izole edilmiş ve bu suşların *Lactococcus garviae* ve *Streptococcus inae*'ye karşı balık yemine ilave etme suretiyle etkileri araştırılmıştır. Probiyotik olarak belirlenen *Aeromonas sobria* ortalama ağırlıkları 20 g olan gokkuşağı alabalıklarının yemine  $5 \times 10^7$  hücre/g dozunda 14 gün süre ile verilmiştir. *Lactococcus garviae* ve *Streptococcus inae* ile kas içi enjeksiyon ile yapılan eprvasyonda kontrol grubu balıklarında %75–100 arasında ölüm görülürken; probiyotikli balıklarda ölüm oranı sadece %0–6 arasında gerçekleşmiştir. Bu çalışmada probiyotik etki ile birlikte balıklarda lökosit sayıları, fagositik ve respiratory burst aktivitenin de arttığı bildirilmiştir.

### **2.8.3.3. Probiyotiklerin sindirim ve yem değerlendirmeye etkisi**

Yanbo ve Zirong (2006) probiyotiklerin sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) büyüme performansı ve sindirim enzim aktiviteleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada balıkların proteaz, lipaz ve amilaz üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kültür ortamından *Bacillus* ve *Photobacterium* izole edilmiştir. Fotosentetik bakteriler ve basilluslar liyofilize edilerek 1 kg yeme 1 g ilave edilerek karıştırılmıştır. 60 gün sonra probiyotik eklenmiş ve eklenmemiş diyetlerle beslenen balıklar incelenmiş ve probiyotik ilave edilenlerde yem değerlendirme ve büyüme oranı önemli ölçüde yüksek çıkmıştır. Sindirim enzimlerinin aktivitesi açısından da önemli farklar bulunmuştur. Proteaz aktivitesi *Bacillus* ilave edilenlerde ve karışık olanlarda kontrole ve fotosentetik bakterilere göre daha yüksek çıkmıştır. Yine amilaz ve lipaz etkisi de mix probiyotik ilave edilenlerde kontrole göre yüksek bulunmuştur. Sonuçta bu çalışmalarda probiyotiklerin sindirim ve enzim aktivitesini artırdığı ve Yem dönüşüm oranını (Food Conversion Ratio, FCR) azalttığı belirlenmiştir. Bu amaçla probiyotik uygulamanın iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte farklı probiyotik formları farklı etkiler göstermiş ancak karma probiyotik uygulamasının en iyi sonucu verdiği ortaya çıkmıştır.

### **2.8.3.4. Probiyotiklerin deformasyon ve mortaliteye etkisi**

Aubin ve arkadaşlarının 2005 yılında alternatif tedavi yöntemlerinin sınırlı olduğu alabalıklarda omurga eğriliği sendromundan, (Vertebral Column Compression Syndrome (VCCS)) korunmada probiyotik kullanımı konusunda yaptıkları çalışmada; iki probiyotik suş kullanımının florfenikol kullanımı ile karşılaştırılması yapılmıştır. Antibiyotik, laktik asit bakterisi (*Pediococcus acidilactici*) ve bir maya (*Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*) yemlere ilave edilmiş ve hiçbir şey ilave edilmeyen kontrol yemi ile karşılaştırılmıştır. Antibiyotik, tedavinin ilk haftasında bileşimindeki toksisiteden dolayı biraz mortaliteye sebep olmuştur. Bununla birlikte antibiyotik uygulaması VCCS'ye duyarlılığı %3'e düşürmüştür. Kontrol grupta balıkların % 13'ü hastalıktan etkilenmiştir. *Pediococcus* uygulaması da antibiyotik kadar etkili olmuştur. Fakat yaşama oranında herhangi bir zıt etki göstermeden 5 ay boyunca uygulanmıştır.

Çünkü VCCS'nin sınırlandırılması için *Pediococcus*'un sadece ilk yemlemeden itibaren 20 gün kullanılması yeterli bulunmamıştır. Uzun süreli probiyotik uygulaması VCCS sendromundan sonra korunma için etkili gibi görünmüş fakat büyük çaplı yetiştiricilik işletmelerinde probiyotik uygulamasının yanı sıra korunma yöntemlerine de sıkı sıkıya uyulmasının gerektiği belirlenmiştir.

#### **2.8.3.5. Probiyotiklerin Su Kalitesi Üzerine Etkisi**

Su ürünlerinde probiyotik kullanımı konusundaki araştırmalar çevre dostu yetiştiricilik fikrinin benimsenmesinden sonra artmıştır. Probiyotik canlıların yemlerine katılan ve onların sağlıklarını iyileştiren mikroorganizmalar olarak bilinir. Balık ve kabukluların bağırsak mikroflorası çevreye çok bağlıdır. Çünkü birçok mikrop besinler ve suyuyla barsağa geçer. Bazı ticari ürünler doğrudan probiyotik gibi üretimi iyileştirici olarak üretilir ve onlara probiyotik ilave etmeye gerek yoktur. Probiyotik uygulamalarının temelinde balığın mikroflorasını düzenleme amacı vardır. Diğer taraftan biyokontrol veya biyo remediasyon (Su kalitesini iyileştirici) terimleri de probiyotikler için kullanılır. Bununla birlikte balıklarda ilk denenen probiyotikler karasal hayvanlar için hazırlanmış ürünlerdi (Gatesoupe, 1999). Probiyotik verilmeden önce onun sucul ortamda yaşayıp yaşamayacağı konusu belirlenmelidir. Bunun için su ürünleri için kullanılacak probiyotikler sucul çevrelerden izole edilmelidir. Bu mikroplar *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Enteromonas*, Laktik asit bakterileri özellikle *Bacillus* spp. ve mayalardır (Gatesoupe, 1999). Probiyotiklerden; patojenlerle besin veya ortama tutunma konusunda rekabet ve bağışıklık sistemini güçlendirmek gibi çok önemli görevler ve etkiler beklenir (Gatesoupe, 1999).

Sucul canlılar probiyotiklerin kullanımı, hazırlama için gerekli ön çalışmaları ve gelişim aşamaları bakımından çok farklıdır. İnsanlar ve karasal canlılar embriyonik gelişimlerini bir kese içinde geçirirler. Birçok balık ve karides türünde larval dönem ve erken başkalaşım dönemleri dış çevrede gerçekleşir. Bu larvalar mikrobiyal faaliyetlerden çok etkilenirler. Çünkü ilk yemlemenin yapıldığı dönemlerde sindirim sistemleri (Timmermans, 1987) ve bağışıklık sistemleri yeterince gelişmemiştir. Bu yüzden probiyotik uygulamaları larval safhada daha çok tercih edilir. Ayrıca çok küçük balıkların bağışıklık sistemleri



yeterince gelişmediği ve aşılama yapılamaması nedeniyle erken dönemlerdeki probiyotik uygulamaları patojenlere karşı larvayı koruma konusunda daha etkili olur.

Gram negatif fakültatif anaeroblar balık ve karideslerde sindirim sistemlerinde baskın durumdadırlar. Bazı tropik otçul balıkların sindirim kanalının sonunda yararlı anaerobik bakteriler de bulunabilir (Clements, 1997). *Vibrio* ve *Pseudomonas* kabuklularda (Moriarty, 1990), deniz balıklarında ve midyelerde baskın cinstirler. *Aeromonas*, *Plesimonas* ve *Enterobactericidae* familyası tatlı su balıklarında baskındır. Sucul organizmalara probiyotiklerin etkisi karasal hayvanlara etkisinden daha fazladır. Sucul canlılar poikiloterm oldukları için onların vücutlarındaki mikrobiyal konsantrasyon sıcaklıkla değişir (Lesel, 1990). Tuzluluk değişimleri mikrop yoğunluğunu artırır ve deniz balıkları vucutlarının su kaybını önlemek için devamlı su içerler. Bu devamlı su alma çevredeki maddelerin etkisini artırır. Özellikle midye, karides larvaları ve canlı yemler gibi süzerek beslenen canlılara dikkat edilmelidir. Bu etki özellikle mide engellerinin olmadığı larval dönemde önemlidir. Bununla birlikte sucul canlıların bağırsak mikroflorası yem ve sudan gelen mikroorganizmalarla hızlı bir şekilde değişir (Moriarty, 1990).

Taoka ve arkadaşları (2006) tarafından *Paralichthys olivaceus* yetiştiriciliğinde resirküle sistemlerde probiyotiklerin büyüme, stres toleransı ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, ticari probiyotikler yeme ve suya ilave edildiklerinde özellikle su kalitesi parametrelerinden pH, amonyum azotu, nitrat azotu ve fosfatın kontrol gruba göre probiyotik ilaveli yemle beslenenlerde daha az olduğu görülmüştür.

#### **2.8.3.6. Probiyotiklerin Kullanılmasında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar**

Probiyotik mikroorganizmalar ortam koşullarına duyarlı olduklarından, depolanmalarına ve kullanılan taşıyıcının özelliğine dikkat edilmelidir. Gram (+) mikroorganizmalar dondurma ve dondurarak kurutma işlemlerine oldukça duyarlıdırlar. Probiyotik mikroorganizmalar biyolojik ürünlerin elde edilme

teknolojisine göre dondurularak kurutulduğunda canlılığını uzun süre devam ettirebilmektedirler (Vanbelle et al., 1990). Ticari probiyotik ürünler toz, granül, pelet, sıvı süspansiyon, kapsül gibi değişik şekillerde hazırlanmaktadır. Üretilen mikroorganizmalar dondurma tekniğine uygun olarak kurutulduğunda canlılıklarını uzun süre korumaktadırlar. Probiyotikler genellikle nem içeriği çok düşük olan karma yemlerde daha uzun süre canlı kalabilmektedirler. Fakat bu tip yemlerdeki probiyotiklerin sayıları zamanla azalmaktadır. Bu azalmanın hızı mikroorganizmanın tür ve şekline bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Probiyotikler yemdeki su ile reaksiyona girdiklerinde canlılıklarını hızla kaybetmektedirler. Bu nedenle probiyotik ilave edilen yemler, kuru ve serin yerlerde usulüne uygun şekilde depolanmalıdır. Probiyotik ürünlerin 22-25°C' de ve kuru yerde tutulmaları gerekmektedir. Ortam sıcaklığı 30°C' nin üzerine çıktığında bakteriler canlılıklarını kaybetmektedirler.

## **2.9. Probiyotik Bakterilerin Tiplendirmesinde Kullanılan Yöntemler**

### **2.9.1. Fenotipik yöntemler**

Suşlar arasındaki ayrımı sağlayabilmek için gen ekspresyonunun ürününü karakterize eden (gözlemlenebilir karakterleri) ve genelde genus-tür düzeyinde identifikasyona olanak sağlayan geleneksel fenotipik yöntemler arasında morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler ve kemotaksonomik markırlar (hücre sel yağ asitleri, mikolik asit, polar lipitler, quininler, poliaminler, hücre duvarı bileşikler, ekzopolisakkaritler) ile beraber faj tiplendirmeleri, hücre yüzeyindeki antijenler, antimikrobiyal duyarlılık profilleri ve toplam hücre ya da hücre duvarı proteinlerinin elektroforetik paternleri yer almaktadır. Farklı pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonunda gelişme, gaz üretimi gibi bazı basit fizyolojik testler genus identifikasyonunda kullanılmaktadır. Karbonhidrat fermentasyonu gibi biyokimyasal testler fenotipik yöntemler olarak kullanılmakta ve tür bazında ayırım sağlayabilmektedir. Kullanışlı olmasına rağmen, türler arası varyasyonlar ve tekrarlanabilirliğinin zayıf olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bununla birlikte; standardize edilmiş sonuçlardan oluşturulmuş veri tabanlarından hazırlanmış API 50CHL gibi ticari amaçlı sistemler yüksek sayıdaki suşların tanımlanmasında kullanılmakla beraber yeni özellik kazanmış türlerin veya alt

türlerin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Şimdiye kadar identifikasyonda kullanılan fermentasyon özellikleri ve API Kit prensibine dayalı biyokimyasal testler tür ve genus bazında ayırım sağlarken; identifikasyonda kullanılan fenotipik yöntemler arasında en güvenilir yöntemin protein profil analizi olduğu belirtilmiştir. LAB'larda en iyi bilindik türlere ait protein patern veri bankası oluşturularak bu problemin de üstesinden gelinmeye çalışılmıştır (Pot et al., 1993). Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez sisteminde elde edilen toplam hücre protein profillerinin kıyaslanması, tür ve alt tür bazında identifikasyon için oldukça güvenilir bir yöntem olmakla beraber bazı türler için yeterli değildir dolayısıyla, protein profiline dayalı tiplendirme tekniğinin yeterli olmadığı ve doğruluğunu kanıtlamak için moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Temmerman et al., 2004). Bununla beraber, fenotipik yöntemler ile gen ekspresyonunun ürünü karakterize edildiğinden bu özelliklerin hepsi spontan mutasyon ve büyüme koşullarındaki farklılıklar neticesinde değişim göstermeye meyillidirler. Probiyotik olarak kullanılacak LAB'ların çoğu oldukça benzer besinsel ihtiyaçlara sahip olup benzer çevresel şartlar altında gelişim gösterebildiklerinden dolayı tür düzeyinde tanımlanmalarında kullanılan bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da çoğu zaman şüphe uyandırıcıdır. Bununla beraber büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda genus düzeyinde dahi identifikasyon işlemlerinde zorluk yaratmaktadır. Bu kriterler kaba bir identifikasyon amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir identifikasyon amacına yönelik değildir. Bundan dolayıdır ki LAB'ların genus ve tür bazında identifikasyonunda kullanılan fenotipik ve biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon sistemlerinin kullanımı genellikle yanlış identifikasyonlara ve hayal kırıklığı yaratan identifikasyon sonuçlarının ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Dolayısıyla tanı ve tiplendirmede fenotipik yöntemler yetersiz kalmaktadır. Çünkü uygun probiyotik analizleri için genus ve tür düzeyinde tanımlama çok önemlidir. Dolayısıyla biz çalışmamızda fenotipik testlerle birlikte moleküler yöntemleri kullandık.

### 2.9.2. Moleküler (genotipik) yöntemler

Probiyotik üretiminde ilk aşama bağırsak mikrobiyotasının normal bileşenlerinin izolasyonu ve tanılanmasıdır çünkü probiyotik olarak kullanılacak strainlerdeki istenen özelliklerden biri mideye alındıklarındaki ekosistemde doğal olarak bulunup oranın bir parçası olmalarıdır.

Bağırsak sisteminin doğal mikrobiyotası konağın biyokimyası, immunolojisi, fizyolojisi ve enfeksiyöz hastalıklara spesifik olmayan direnci üzerinde etkilidir. Bu yüzden mikrobiyota konağın beslenmesi üzerinde hayati öneme sahiptir. Özellikle de yoğun yetiştiriciliği yapılan hayvanlar için daha önemlidir. Bu yüzden bağırsak flora topluluğunu ve onu oluşturan farklı mikroorganizmaları tanılamak gerekmektedir. Bu özellikle doğal mikrobiyota ile probiyotiklerin ayrılması gereken alanlarda gereklidir.

Mikrobiyal tanılamada verimin ve kalitenin artırılmasında moleküler metotların kullanılması devrim niteliğinde olup çok sağlıklı sonuçlar vermektedir. Genetik metotlar ve yeni nesil dizileme metotları probiyotik mikroorganizmaların filogenetik tanılamasını geleneksel yöntemler olmadan çok kolay bir şekilde sağlamaktadır (Cruz et al., 2012).

Mikrobiyal topluluklardan bakterileri hızlı tanılayıp analiz etmek için klasik, fizyolojik ve biyokimyasal testler yeterli değildir çünkü bakteriyal popülasyonlar benzer beslenme gereksinimlerine sahip olup benzer çevresel koşullarda büyürler. Güvenilir bir probiyotik seçiminde en önemli kriter, suşun tanımlanmış olmasıdır. Bu amaçla DNA-DNA hibridizasyonu veya 16S rRNA dizi analiz teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Probiyotik özellik gösteren bir bakteri, patojen suşlara da sahip bir türün üyesi ise detaylı bir klinik tanının yapılması gerekmektedir.

Moleküler teknikler organizmanın genetik yapısının analizini temel alan yöntemlerdir. DNA temelli yöntemler, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların genus seviyesinden suş seviyesine kadar identifikasyonunu sağlayabilmektedir. Nükleotit sekanslarının kullanımını içeren bu teknikler oldukça hızlı teknikler olup besiyerindeki değişikliklerden etkilenmemeleri bakımından fenotipik identifikasyon yöntemlerine kıyasla oldukça önemli avantajlar sunmaktadır. Bununla beraber, genotipik yöntemler kromozomal DNA

molekölünün insersiyon ve delesyonu, ekstrakromozomal DNA'nın kazanılması/kaybedilmesi veya restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerinin yaratılmasına veya var olan kesim bölgelerinin elemine olmasına sebep olan rastgele mutasyonlardan etkilenmekle beraber doğal varyasyona daha az maruz kalmaktadırlar (Miljković-Selimović et al., 2009).

Fenotipik ya da genotipik olsun, tüm identifikasyon sistemleri yorum ve performans rahatlığı, ayırım gücü, üretilebilirlik ve tiplendirilebilirlik bakımından karakterize edilmelidir. Günümüzde, LAB identifikasyon/tiplendirme çalışmalarında ilgi odağı fenotipik yöntemlerden daha kesin ve hassas sonuçlar veren moleküler (genotipik) yöntemlere doğru kaymıştır. DNA temelli moleküler yöntemler filogenetik çalışmalarda mikroorganizmaların birbirleri ile bağlantısının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlardandır ve kullanılan yöntemle ilgili olarak genus düzeyinden suş düzeyine kadar mikroorganizmaların farklı seviyelerde tanımlanmasında gelişmiş bir bakış açısı sunmaktadır. Moleküler teknikler, güçlü bir ayırım gücüne sahip olmaları, tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olmasının yanında, sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı son yıllarda sıklıkla kullanılmakta ve geliştirilmektedir (Bush and Nitschko., 1999; Kıran ve Osmanoglu, 2011).

Şimdilerde kullanılan moleküler stratejiler farklı primerleri içeren DNA-temelli tiplendirme yöntemlerinin temel avantajı ayırım gücüne ve evrensel olarak uygulanabilir olmasına dayalıdır. Birbiri ile hemen hemen aynı fenotipik özelliklere sahip akraba suşlar günümüzde plazmid profillemesi, 16S-23S ribozomal DNA analizleri, moleküler ribotiplendirme, rRNA oligonükleotidlerinin kullanılması, çoklu lokus dizi analizleri (MLSA), DNA-DNA hibridizasyonu, darbeli alan jel elektroforezi (PFGE), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP), denatürasyon gradiyent jel elektroforezi (DGGE), amplifiye edilmiş parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), çoğaltılmış ribozomal DNA'nın restriksiyon analizi (ARDRA) gibi kromozom temelli teknikler sayesinde güvenilir şekilde ayırt edilebilmektedir. Moleküler tanı yöntemlerinin bir kısmı sadece tür düzeyinde tanımlama yapabilecek uygulama yeterliliğine sahip iken, bir kısmı ise alt türlerin evrimsel süreçte genomlarında meydana gelen genetik olaylar ve meydana getirdikleri varyasyonların saptanmasında da kullanılmaktadır. 16S rRNA genleri

evrimsel süreçte çok iyi korunmuş, değişmez ve sınırlandırıcı fonksiyonlara sahip, erken safhada gelişimi belirlenmiş ve diğer genlere nazaran çevresel baskılardan etkilenmemiş evrensel belirteçler olmalarına rağmen, tanımlama çalışmaları için tek başına kullanımlarında karşılaşılan bazı olumsuzluklar bulunmaktadır. Bu olumsuzluklardan ilki 16S rRNA genlerinin genomda çok iyi korunmuş olarak bulunmasının bakteri analizi için sınırlandırıcı bir etki oluşturmasıdır. İkinci olarak, 16S rRNA genleri çeşitli bakteri türlerinde evrensel belirteçler olarak kullanılsalar bile genlerin kopya sayısı farklılık göstermektedir. Bu durum 16S rRNA genleri hedef olarak kullanıldığında bazı bakteri türlerinin çok iyi ayırt edilebilmesine bazılarının ayırımının ise daha güç olmasına yol açmaktadır (Mohania et al., 2008).

### **2.9.2.1. Dalgalı Alan Jel Elektroforezi (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin en başarılısı olarak kabul edilen bu yöntemde sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısıyla agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonuna tabi tutulmaktadır. PFGE’de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA’da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu uygun değildir. Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalmaktadır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmaktadır. Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı 10-800 kb’lık DNA fragmanlarının net olarak ayırt edilmesini sağlamaktadır. Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir. Bu bant profilleri bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilerek suşların birbiriyle ilişkileri ortaya konulmaktadır. Son senelerde, PFGE ile DNA parmakizi tiplendirmeleri büyük restriksiyon fragmentlerinin karşılaştırılmasına imkân vererek çeşitli LAB suş

tiplendirmelerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla beraber, oldukça fazla zaman/iş gücü harcanmasını gerekli kılan bu yöntem aynı zamanda da türe spesifik bir yaklaşımı gerekli kılmakta (farklı restriksiyon enzimleri ve elektroforez koşulları) ve dolayısıyla genelde tür içi ayırım veya ilişkilerin ortaya konulmasında, bakteriyel suşların ayrılmasında da kullanılmaktadır. PFGE'yi yüksek ayırım gücü gösteren bir yöntem olarak kabul edilmektedir. PFGE restriksiyon biçimi zamana karşı stabildir, tekrarlanabilir ve yorum için standart kriterler mevcuttur. Bu nedenle bu yöntemin türlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında kullanışlı bir araç olduğu bildirilmiştir. Birçok araştırmacı prosedürü hızlandırmak için ve zaman tüketen prosedürlerin üstünden gelebilmek için PFGE protokollerinin değişik modifikasyonlarını tanımlanmış bulunmaktadır (Moschetti et al., 1998; Bush and Nitschko, 1999; Kıran ve Osmanoglu, 2011).

#### **2.9.2.2 Ribotiplendirme (Ribotyping):**

Bakterilerde, ökaryotlarda ve arkealarda bulunan rRNA moleküllerinin birçoğunun moleküler evrimin gidişatında çok az değişmiş olduğu görülmektedir (Woese, 1987), bundan dolayı bu sekanslara spesifik problemler bakterilerin geniş bir sınıflandırmasını, benzer rRNA sekanslarıyla belirleyebilmektedir. Diğer prob tipleri ise belirli türler veya tür içinde sınırlı kalmaktadır. Ribotiplendirmede total genomik DNA bir restriksiyon enzimiyle daha küçük fragmentlere parçalanmakta ve bu parçalar jel elektroforeziyle birbirinden ayrılmaktadır. Fragmentler jelden bir membrana transfer edilmekte ve ribozomal 16S ve 23S rRNA'yı kodlayan genlerin korunmuş bölgelerine spesifik işaretlenmiş evrensel bir proba hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Hibridizasyondan sonra fragmentleri göstermek için problemlerin hibridize olduğu yerde probdaki işaret gözlenmektedir. Ribotip denilen bu bantlar, referans bir tür veri bankasıyla karşılaştırılarak izolatların tanımlanması için kullanılabilir. Ribotiplendirme aynı zamanda muhtemelen bu yöntemin en yaygın kullanım amacında olduğu gibi, izolatların filogenetik amaçlar için tiplendirilmesinde de kullanılabilir. Geçmiş yıllarda bu yöntem *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Weissella* türlerinin veya alttürlerinin taksonomik çalışmalarında da kullanılmıştır (Lee and Salminen, 2009). PFGE ile karşılaştırıldığında ribotiplendirme, alttür ve suş identifikasyonu için yetersiz kalmaktadır buna rağmen türlerin ayırımında uygulanabilir bir

yöntemdir. Ribotiplendirme; araştırmacıların yanlış bir şekilde PCR-ribotiplendirme olarak tanımladığı, 16S-23S ara bölgesinin PZR bazlı fragment uzunluk polimorfizminden ayrılmalıdır.

### **2.9.2.3. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)**

Aynı zamanda kromozomal DNA restriksiyon analizi veya DNA mikrorestriksiyon analizi olarak da bilinmektedir. Bu yöntemde kromozomal DNA izole edilmekte ve restriksiyon enzimiyle muamele edildikten sonra oluşan fragmentlerin agaroz jelde ayrımı yapılmaktadır. Restriksiyon enzimlerinin kesim sonucunda oluşturduğu parçalara “restriksiyon parçaları” denmektedir. Bunların büyüklüğü kullanılan restriksiyon enzimlerine bağılı olarak değişim göstermektedir. DNA molekülü farklı kesim bölgelerine sahip olabilmektedir. DNA parçalarında görülen bu polimorfizmin nedeni nokta mutasyonu olabileceği gibi, inversiyon, delesyon, translokasyondan kaynaklanan büyük mutasyonlar da olabilmektedir. Kısaca; bu yöntemde RFLP analizinde restriksiyon enzimlerinin DNA’daki kesim noktalarındaki değişmelerden faydalanılmaktadır. Bantlar ve bantlar arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak her izolatin ayrımı sağlanmaktadır. RFLP; hızlı, ucuz ve uygulanması nispeten kolay olan bir yöntemdir. Ancak birçok fragmentin oluşması ve bunların jelde yakın bir şekilde dizilmesiyle bu bant profillerini ayırmak güçleşmektedir. Bu nedenle tutarlı sonuçların oluşması için birden fazla restriksiyon enziminin kullanımı gerekebilmektedir (Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

### **2.9.2.4. Rastgele Coğaltılmıs Polimorfik DNA-PZR (RAPD)**

Geleneksel PCR çalışmaları belirli bir türe veya hatta suşa özğü DNA sekanslarını amplifiye etmek için kullanılabilmele beraber sistemin çalışabilirliği spesifik oligonükleotitlerin varlığına ihtiyaç duyduğu için üzerinde çalışılacak organizmanın DNA sekansının bilinmesi gerekmektedir. Bu da özellikle üzerinde çalıştığımız organizmanın DNA sekansı hakkında bilgi sahibi olmadığımız durumlarda dezavantaj olarak karşımıza çıkabilmektedir. RAPD analizleri bu gereksinimi ortadan kaldırmaktadır çünkü primer tasarlamak için parmakizi analizi yapılacak olan genomun sekansını bilmeye gerek yoktur. Literatüre



RAPD-PZR olarak geçen bu yöntemin analizleri sonucu elde edilen çoğaltılmış ürün polimorfizm göstermekte ve böylelikle genetik markörler olarak kullanılabilir. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Oligonükleotit primerleri PZR'nin anahtarıdır. Oluşan parçaların sayısı ve büyüklüğü; primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA'da bu diziye komplementer dizinin varlığına bağlı olarak araştırılan genomda özgü bir desen (patern) vermektedir. Bu sistemle, genom dizisi hakkında hiçbir şey bilinmeyen DNA'lar çalışılmaktadır. Primer bağlanmasıyla, polimeraz enzimi 5'→3' yönünde çalışarak DNA moleküllerini çoğaltılmakta ve bunlar agaroz jel veya poliakrilamid jel elektroforezi ile birbirinden ayrılıp uygun boyalarla boyanarak izlenebilmektedir. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olmaktadır. Düşük sıcaklık derecesinde gerçekleştirilen bağlanma aşamasında, seçilen primerler, kromozom üzerinde hem kendilerine özgün bölgelere, hem de özgü olmayan bölgelere bağlanmaktadır (Cocconelli et al., 1997).

Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine olan uzaklıkları değişik olacağından agaroz elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan bir mutasyon (delesyon veya insersiyon) bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılmaktadır. Aynı bant profili gösteren izolatlar filogenetik olarak ilişkili şeklinde yorumlanabilmektedir. Bant profilleri benzer olan izolatlar yeni primerlerle tekrar test edilmeli veya diğer tiplendirme yöntemleriyle çalışılmalıdır. RAPD yönteminin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı değişken bulunmaktadır. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. (Cocconelli et al., 1997).

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden önce yöntemin optimize edilmesi oldukça

önemlidir. Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntem diğer moleküler yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. Kullanılan primer sayısı arttıkça ayırım gücü artmaktadır. LAB'ların türler arası ayırımında, bazı türlerin (*Enterococci*, *Pediococci* ve *Lactobacilli*) tür içi ayırımında ve gıdalardan izole edilen suşların genus bazında ayırımında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Cocconelli et al., 1997).

#### **2.9.2.5. Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)**

AFLP; moleküler markör teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir. AFLP temelde RFLP ve RAPD-PZR tekniklerinin bir arada kullanıldığı ve identifikasyonda özellikle RFLP ve RAPD-PZR'de olduğu gibi tür-suş düzeyinde oldukça yüksek oranda başarıya ulaşan ve son yıllarda diğer moleküler yöntemlere alternatif olarak sunulan popüler bir tekniktir. Yöntem, uygun koşullarda amplifiye edilecek olan kalıp DNA'yı yaratmak için DNA fragmanlarının uçlarına eklenmiş olan çift zincir DNA adaptörlerini tanıyan primerlerle seçici amplifikasyonu gerekli kıldığından elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özellik sergilemektedir. AFLP çalışmalarında kullanılan restriksiyon endonükleazların her biri DNA üzerinde spesifik bir bölgeyi veya sekansı tanımakta ve kesim işlemi neticesinde DNA fragmanları meydana gelmektedir. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA fragmanının oluşmasına sebep olmaktadır. İstenilen hedef fragmanı çoğaltmak adına pre-selektif amplifikasyon adı verilen bir işlem ile fragmanlar taranmakta ve daha sonra PZR tekniği kullanılarak istenilen hedef fragmanın sayısı binlerce kere arttırılmaktadır. Genelde her bir AFLP reaksiyonunda yaklaşık 30-80 restriksiyon fragmanı beraber amplifiye olduğundan ve denatüre koşullarda gerçekleşen jel elektroforez sisteminde tespit edilebildiklerinden teknik DNA polimorfizmin tespiti için oldukça güçlüdür. Tür ve alt tür seviyesinde ayırım sağlayan bu tekniğin kullanımı diğer DNA tiplendirme yöntemlerine kıyasla sergilemiş olduğu avantajlardan dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Tekniğin

çok geniş bir alanı taraması, az miktarda iş gücüne gereksinim duyması, kısa sürede neticelenmesi ve yorumlanabilmesinin oldukça kolay oluşu en temel avantajlarından olup bu yeni tekniğe olan ilgiyi arttırmaktadır. Bununla beraber, analiz için gerekli olan DNA miktarı çok az olmakla beraber ulaşılan bilgi oldukça fazladır. Analiz öncesi DNA sekansına ait bir bilgiye gerek yoktur ve diğer tekniklere kıyasla AFLP'nin tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir (Vos et al., 1995).

#### **2.9.2.6. Tekrarlanan Palindromlara dayalı PZR (Rep-PZR)**

Bakteri DNA'sı içerisinde sürekli tekrarlayan elementler bulunmaktadır. DNA içindeki değişken sayıda tekrarlayan ve ökaryotik organizmalarda rep olarak isimlendirilen bu elementler bakteri hücrelerinde merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber bu bölgelerin kromozomal organizasyonda yer aldıkları düşünülmektedir. Rep-PZR çoğu bakterinin genomunda birçok kopyasının doğal olarak bulunduğu, oldukça korunmuş ve tekrarlanan DNA sekanslarının amplifikasyonu üzerine kurulmuş bir genomik parmakizi tekniğidir (Olive and Bean, 1999; Georghiou et al., 1995).

Bugüne kadar tekrarlanan DNA sekanslarının 3 türü tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi; tekrarlanan ekstrasjenik palindromik (REP) olarak adlandırılan 35-40 baz çifti büyüklüğünde ve çeşitli halkaları yapısında bulunduran elementlerdir. Enterobakteriyal tekrarlanan interjenik palindromik konsensus (ERIC) ise; 124-127 baz çifti büyüklüğünde ve merkezi korunmuş palindromik yapıya sahip sekanslardır. Son olarak BOX dizisi ise 154 baz çiftlik box A, box B, ve box C şeklinde isimlendirilmiş korunmuş alt ünitelere sahip elementlerdir. Bakteriler arasında bütün bu alt üniteler arasında sadece box A-1 alt ünitesi oldukça korunmuştur. Tiplendirme amacıyla primerler DNA'yı çoğaltmak için REP ve ERIC'de tekrarlanan bölgelerin dışından, BOX'da ise box A alt ünitesinden başlayacak şekilde tasarlanabilirler. Bu primerlerin kullanımıyla REP, ERIC ve BOX elementlerinin arasında yerleşmiş ayırıcı bölgeler çoğaltılabilmekte ve REP-PZR, ERIC-PZR ve BOX-PZR genomik parmakizi olarak adlandırılmaktadır. Toplu halde bu yöntemler Rep-PZR genomik parmak izi tekniği olarak tanımlanmaktadır. Bu teknikte tekrarlanan elementler PZR ile

değişik boyutlarda DNA fragmentleri üretmek için çoğaltılmaktadır. PZR ürünleri daha sonra boyutlarına göre agaroz jel elektroforezinde ayrılmakta ve spesifik DNA parmak izi bantları oluşturulmaktadır. Daha sonra bu bantlar tanımlayıcı bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmektedir. Rep veya ERIC dizilerinden kaynaklanan primerlerle yapılan PZR kolay uygulanabilmesi, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi, ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeni ile en yaygın kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri arasındadır. Tekniğin uygulanması kolaydır ayrıca hem çok sayıda hem de az sayıda örneğe uygulanabilir. Yöntemin en önemli dezavantajı söz konusu serilerdeki yüksek değişimdir. Bu nedenle çoğu durumda tür ayırımında kullanılamaz. Daha fazla türe uygulanabilirlik göstermekte olan Rep-PZR, PFGE ile karşılaştırıldığında daha düşük ancak plazmid profil analizleri veya genomik parmakizleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek ayırım gücüne sahiptir (Olive and Bean, 1999; Georghiou et al., 1995).

#### **2.9.2.7. 16S-23S İç Transkribe Edilen Ayırıcı Bölge PZR (16S- 23S ITS)**

Prokaryotlarda rRNA'yı kodlayan 16S, 23S ve 5S olmak üzere 3 gen bölgesi bulunmaktadır. Bunlar ara bölgelerle ayrılmakta ve sekansta, hem genus hem tür seviyesinde uzunluk açısından çeşitlilik göstermektedir. 16S ve 23S rRNA bölgeleri yüksek derecede korunmuş dizileri içeren bölgelerdir. Bu bölgelere özgü primerler kullanılarak PZR işlemi gerçekleştirilerek sekanslama işlemi neticesinde sonuca gidilebilir. 16-23S rRNA arasındaki bölgesinin çoğaltılması genellikle ITS-PZR olarak tanımlanmaktadır. ITS-PZR; 16S-23S rRNA'nın intergenik transkripsiyon bölgesi içindeki polimorfizmleri ortaya çıkarmakta ve bakteriyal türlerin karakterizasyonunda kullanılabilir. Bu yüzden filogenetik analizler için önemli bir araç olarak görev yapabilir. rRNA genleri arasındaki ara bölge hedef bölge olduğu için yöntem aynı zamanda PZR-ribotiplendirme olarak da adlandırılmaktadır. Agaroz jelde ayrılan çoğaltılan bölgeler karşılaştırılmaktadır. Çoğaltılmış bölgenin restriksiyon analizi veya sekansı, yöntemin ayırım gücünü yükseltmektedir. Bununla beraber çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması, dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi bazı güçlükler de mevcuttur (Kıran ve Osmanoglu, 2011).

### **2.9.2.8. MLST (Multi-Locus Sequence Typing)**

Bakterilerin mutasyona uğramayan genlerinde görülen farklı yapıların listelenmesi yaklaşımı MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis, Çoklu-Lokus Enzim Elektroforezi) yöntemiyle saptanmıştır. Nükleotit diziliminin avantajı, sonuçlarının kolayca onaylanabilmesi, saklanabilmesi ve elektronik olarak paylaşılabilmesidir. MLST analizine verilmiş olan lokus için tüm benzersiz dizilimler keşif sıralarına göre bir allele atanır. Bu MLEE'deki elektromorfların tasarımına karşılık gelmektedir. Eldeki izolatın her bir MLST lokusunda var olan alleller, allelik profili oluşturur ve dizilim tiplendirilmesi tasarlanır ki, bu da MLEE'deki elektroforetik tiplendirme tasarımına karşılık gelir. MLST'de, MLEE'ye göre daha az lokus incelenerek benzer düzeyde ayırım yapılabilmektedir. Bu durum, MLST'nin nükleotit dizilimlerini ayırma gücünün daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. İzolatlar arasındaki ilişkiler allelik profillerin karşılaştırılması ile belirginleşir. Yakın ilişkili izolatlar özdeş dizilim tiplendirmelerine veya birkaç lokusta farklılık gösteren dizilim tiplendirmelerine sahiptirler (Çetinkaya ve Ayhan., 2014).

MLST tekniği housekeeping genlerindeki DNA dizi varyasyonlarını direk olarak ölçen ve strainleri unik alel profillerine göre karakterize eden bir yöntemdir. MLST tekniği basit olup DNA dizilenmesinden sonra PCR çoğaltılmasını içerir. MLST'nin akış şeması: veri toplanması, veri analizi ve multilokus dizi analizinden oluşmaktadır. İlk bölümde varyasyonun kesin tanımı gen fragmentlerinin nükleotid dizi tanılamasıyla elde edilmektedir. Veri analizlerinde tüm unik dizilerin alel sayıları belirlenir ve alelik profille birleştirilerek sekans tipi belirlenir (ST). Eğer yeni alleller ve STs'ler elde edilirse doğrulamadan sonra databazda saklanır. Final kısımda ise izolatların ilişkileri/akrabalıkları alelik profillerin kıyaslanmasıyla yapılır (Spratt 1999; Spratt and Maiden., 1999).

### **2.9.2.9. Çoğaltılmış rDNA Geni Restriksiyon Analizi (ARDRA)**

Temeli 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanan PZR-RFLP esaslı bir yöntem olan ARDRA'da 16S rDNA genleri evrensel primerler veya türe

spesifik primerler kullanılarak 16S rDNA bölgesi çoğaltılmaktadır. Daha sonra yine spesifik restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile amplifiye edilen bölgeler kesilmektedir. Restriksiyon enzimlerinin seçimi, çoğaltılmış bölgenin nükleotit kompozisyonuna göre yapılır, bu seçim ayrıca geniş sayıda türün net bir ayrımı için gereklidir. Sonuçta oluşan fragmentler agaroz jelde görüntülenerek karşılaştırmalı olarak sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır. 16S rDNA bölgesi korunmuş ve türler arası değişken dizilere sahip olduğundan dolayı mikroorganizmaların sınıflandırılmasında önemli belirteçler olarak kullanılmaktadır. Bazı yakın türler arasında ayırım elde edebilmek için birden fazla restriksiyon profilinin karşılaştırılması önemlidir (Soto et al., 2010; Temmerman et al., 2004; Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

#### **2.9.2.10. DNA sekans analizi**

Bir DNA molekülünün nükleotid kompozisyonunun belirlenmesidir. DNA tiplendirme yöntemleri, bakteriyel DNA'daki farklılıkların ayrımı üstüne kurulmuştur. İzolatların ayrımı için DNA sekanslamasının kullanılması en ideal yol olarak görülmesine rağmen, her izolatin tüm genomunun sekanslanması pratik değildir. 16S rRNA sekanslarının veri bankaları oluşturulmuştur ve bu sekansların karşılaştırılması tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. Aslında 16S rRNA sekansları bakterilerin taksonomik çalışmaları için oldukça kullanışlıdır. Bu sekanslara göre evrimsel ağaçlar kurulmuş olup bakteriyel türlerin filogenetik ilişkileri belirlenmektedir. DNA sekanslaması için en popüler yöntem dideoksi veya "Sanger" yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli gen sekanslarına ait DNA dizi analizi bir identifikasyon/typendirme yöntemi olarak umut vericidir. Birçok laboratuvar için bu teknik şu an için uygulanabilir olmadığı için daha ucuz DNA sekans araçlarının uygulanabilirliği bu tekniği gelecekte daha ulaşılabilir hale getirebilir. PZR teknolojisi ile 16S rRNA genlerinin direk sekansı bilinmeyen bir suşun tek bir basamak ile tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Bununla beraber bazı güçlükler de mevcuttur, örneğin, çok net olarak farklı olan bazı türlerin aynı 16S rDNA sekansına sahip olması dolayısıyla veri tabanında yer alan bazı sekansların güvenilirliğinin şüpheli olması gibi (Kıran ve Osmanoğlu, 2011).

## 2.10. Türkiye’de Probiyotik Laktik Asit Bakterileriyle İlgili Gerçekleştirilen Çalışmalar

Türkiye’de farklı gıdalardan ya da kaynaklardan laktik asit bakteri izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgili çalışmalar mevcut olup araştırmamıza göre tatlı su balıklarından probiyotik potansiyele sahip laktik asit bakterilerinin izolasyonu, moleküler identifikasyonu ve alabalıklarda potansiyel probiyotik olarak kullanılmasıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yetiştiricilikle ilgili olarak ise birkaç çalışma mevcut olup bu çalışmalar aşağıda verilmiştir. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında yürütülen bu tez çalışması hem probiyotik potansiyele sahip laktik asit bakterilerinin tatlı su balıklarından izole edilmesi hem de balıkların kendi floralarından elde edilen bakterilerin bu balıklara karşı probiyotik potansiyellerinin değerlendirilmesi açısından bir orijinallığe sahiptir. Çünkü yürütülen yetiştiricilik çalışmalarında balıklarda ticari probiyotikler kullanılmıştır.

Can (2001) yürüttüğü “Probiotik Ürünlerin Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) Larvalarının Gelişimine Etkisi” adlı yüksek lisans tez çalışmasında yoğun (intensif) balık üretimi yapılan kuluçkahanelerde, balıkların ilk üretim safhalarında ortaya çıkan geniş populasyonlardaki patojen mikroorganizmalarla doğal metotlarla mücadele olanakları araştırmak, probiotik bakteriler ve nütrientlerden oluşan ürünlerin üretim kalitesine, miktarına ve larval gelişime etkisinin incelenmesini amaçlamıştır. Sonuçta, deneme süresince herhangi bir patojen mikroorganizmaya rastlamamıştır. Balıkların gelişimiyle ilgili olarak da; deney tanklarında, kontrol tanklarına oranla % 12’lik fark olduğunu rapor etmiştir.

Öztürk (2007) “Levrek Balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) Probiyotik Olarak *Lactobacillus rhamnosus* Kullanılmasının Performans Üzerine Etkisi” adlı doktora tez çalışmasında levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103)’un deformasyon oranı, canlı ağırlık artışı (S.G.R), yem değerlendirme oranları (F.C.R) ve yaşama oranı üzerine etkisi araştırılmıştır. Öztürk (2007), larval yaşama oranını deneme gruplarında % 27,4 ve kontrol grubunda % 18,9 olarak saptamış olup aradaki

farkın önemli olduğunu rapor etmiştir ( $P < 0,001$ ). Probiyotik uygulamasının larva, yavru ve yetişkin dönemdeki balıkların aylık ağırlık artışları (S.G.R.) ve yem değerlendirme oranları (F.C.R) üzerinde” etkisinin olmadığını belirtmiştir ( $P > 0,05$ ).

Kaya (2009) “Probiyotik Bakteri İzolasyonu ve Kültürü Yapılan Balık Türlerinin Bağışıklık Sistemleri Üzerindeki Etkisinin Tespiti Üzerine Bir Çalışma” adlı yüksek lisans tez çalışmasında Çipura (*Sparus aurata*) ve Deniz Levreği'nin (*Dicentrarchus labrax*) bağışıklık sistemlerini güçlendirecek probiyotik bakteri izolasyonu amaçlamıştır. *Vibrio anguillarum*'a karşı antagonistik etkisi test edilecek 22 suş izole edilmiştir. Ayrıca deneme sonundaki balık ağırlıkları da tespit ederek probiyotik bakterinin ağırlık artışına etkisini de incelemiştir; fakat bu farkın istatistiki olarak önemsiz olduğunu rapor etmiştir.

Dulluç (2010) gerçekleştirdiği “Probiyotik İlaveli Beslemenin Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) ve Aynalı Sazan (*Cyprinus Carpio* L. 1758) Yavrularının Büyüme ve Yem Değerlendirmesine Etkileri” adlı doktora tez çalışmasında, %39 ham protein ve 3500 kcal/kg sindirilebilir enerji içerecek şekilde temel yem hazırlayıp bu yeme  $1,0 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$ ,  $1,0 \times 10^7$  kob/g yem oranlarında olacak şekilde Bactocell® (*Pediococcus acidilactici* içeren) ilave edip hazırladığı izonitrojenik ve izokalorik deneme yemlerini uygulamada hangi koşullarda ne kadar süreyle kullanılabileceğini belirlemek ve hazırlanan bu yemlerle tilapia (*O. niloticus*) ile aynalı sazan (*C. carpio*) yavrularının beslemeyi amaçlamıştır. Sonuçta tilapia (*O. niloticus*) ve aynalı sazan (*C. carpio*) yemlerine  $1,0 \times 10^7$  kob/g *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M (Bactocell®) probiyotik bakterisi ilave edilerek beslemenin yem değerlendirme ve besin maddelerinin sindirilebilirliği açısından olumlu yönde etkisinin olduğunu bildirmiştir.

Türkiye’de probiyotiklerin su ürünlerinde kullanımıyla ilgili çalışmalar yaygın olmayıp Arıç ve arkadaşları (2013) çalışmalarında çipura larva yetiştiriciliğinde 40. güne kadar ticari bir ürün olan probiotik bakteri (*Bacillus* sp.) eklenmesinin larvalarda büyüme parametreleri ve sindirim enzimleri (alkalin ve asit proteaz) üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, probiotiklerin canlı yem kültürü ve tank ortamına eklenmesi alkalın ve asit proteaz aktivitesini



önemli oranda arttırdığını, bu yüzden probiotiklerin bu yöntemle uygulanmasının büyüme parametreleri ve besinsel durumları açısından daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Aytekin (2013), “Balık Yetiştiriciliğinde Kullanılacak Potansiyel Probiyotiklerin Büyüme Karakteristiklerinin Optimizasyonu” adlı tez çalışmasında, *E. faecium*'un biyokütle ve biyokütle verimliliğini arttırmak için kültürün büyütülme koşullarının optimizasyonunu amaçlamışlardır. Çalışmanın ilk kısmında, farklı bileşiklerden veya farklı oranlarda bileşiklerden oluşan ortamlar, sıcaklık ve pH değerleri denemişlerdir. İkinci kısımda ise, mikroorganizmayı, biyoreaktörde farklı fermentasyon yöntemleri deneyerek büyütmüşlerdir. Son aşamada ise, biyokütleyi fermentöre geri döndürmek üzere fermentöre entegre edilmiş membran filtrasyon sistemi denemişlerdir. Sonuçlara göre optimum sıcaklık olan 37°C ve 6.5 pH değerlerinde, en iyi büyüme gözlemlenmiştir. 37°C, 350 rpm ve 6.5 pH değerlerinde, en yüksek değer olan 6.3 g/L biyokütle, sürekli steril ve taze besi ortamının beslendiği ve biyokütlenin fermentöre geri döndürüldüğü membran filtrasyon sistemini içeren deneyde elde etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan örnekler

Bu çalışmada kullanılan 75 adet bakteri straini (Çizelge 4.1) Eğirdir Gölü'nde bulunan Sazan (*Cyprinus carpio*), Sudak (*Sander lucioperca*), Havuz balığı (*Carassius gibelio*), ve yerel işletmelerden ticari olarak satın alınan Gökkuşluğu alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*)'ndan izole edilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan besiyerleri

###### 3.1.2.1. de Man Ragosa and Sharpe (MRS) Agar

	g/litre
Pepton	10.0
Lab-Lemco meat extract	10.0
Yeast extract	5.0
D (-) Glucose	20.0
Tween 80	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
Sodium acetate	5.0
Triammonium citrate	2.0
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0.2
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0.05
Agar	15.0
Distile su	1000ml

Besiyeri içeriği distile suda çözünüp pH'sı 6.2-6.7'ye ayarlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Bu besiyeri *lactobacillus* türlerinin geliştirilmesi ve izolasyonu amacıyla kullanılmıştır (de Men et al., 1960).

### 3.1.2.2. MI7 AGAR

	g/litre
Polypepton	5.0
Phytone pepton	5.0
Maya ekstraktı	2.5
Et ekstraktı	2.5
Laktoz	5.0
Askorbik asit	0.5
B-disodium glycerophosphate	19.0
MgSO <sub>4</sub> (0.1M) 7 H <sub>2</sub> O	1.0
Agar	12.0
Distile su	1000ml

Besiyeri içeriği distile suda çözünüp pH'sı 7.2'ye ayarlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Bu besiyeri laktik streptokokların geliştirilmesi ve izolasyonu için kullanılmıştır (Terzaghi and Sandine, 1975).

### 3.1.2.3. Tryptic Soy Agar (TSA)

	g/litre
Kazein pepton	15
Soya pepton	5
Sodyum klorür	15
Agar	15
Distile su	1000ml

Besiyeri içeriği distile suda çözünüp pH'sı 7.2'ye ayarlanmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Bu besiyeri genel besiyeri olup nazlı olan ve nazlı olmayan mikroorganizmaların geliştirilmesi ve izolasyonu için kullanılmaktadır (Atlas, 2004).

#### 3.1.2.4. *Tryptic Soy Broth (TSB)*

	g/litre
Kazein	17
Soya	3
Sodyum klorür	5
Dipotasyum fosfat	2.5
Dekstroz	2.5
Distile su	1000ml

Besiyeri içeriği distile suda çözünüp pH'sı 7.2'e ayarlanıp otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Genel bir besiyeri olup standart mikrobiyolojik analizlerde kullanılmaktadır (Atlas, 2004).

#### 3.1.2.5. *Hugh and Leifson's OF bazal ortamı*

	g/litre
Pepton (tryptone)	2.0
Sodyum klorür	5.0
Glukoz (ya da diğer karbohidratlar)	10.0
Bromtimol mavisi	0.03
Agar	3.0
Dipotasyum fosfat	0.30
Distile su	1000ml

İçerik distile suda çözüldükten sonra pH 7.1'e ayarlanmıştır. Daha sonra 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Test edilecek karbon kaynağının sterilize edilmiş %10'luk çözeltisi besiyerine eklenerek son konsantrasyonunun %1 olması sağlanır. Bu besiyeri mikroorganizmaların oksidatif ve fermentatif karakterde olup olmadıklarını anlamak için kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

### 3.1.2.6. Trypton Broth

	g/litre
Trypton	3
Sodyum klorür	0.3
Distile su	100ml

pH 7-7,4'e ayarlanır ve 121°C'de 15dk sterilize edilir. Mikroorganizmaların indol üretimi testinde kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

### 3.1.2.7. Methyl-Red Voges-Proskauer Broth

Pepton	7
Glukoz	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5
Distile su	1000ml

Dehidre besiyeri, 17,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip, standart deney tüplerine 5'er mL olarak dağıtılır ve otoklavda 121°C 'de 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak, sarımsı-kahve renktedir ve 25°C'de pH'sı 6,9±0,2'dir (Collins and Lyne, 1976).

### 3.1.2.8. TSI (Triple Sugar Iron) Agar

	g/litre
Kazein pepton	15
Peptone from meat	5
Et ekstrakt	3
Maya ekstraktı	3
NaCl	5
Laktoz	10
Sukroz	10
D(+) glucose	1,0
Ammonium iron(III)citrate	0,5
Sodium thiosulfate	0,5

Phenol red	0,024
Agar-agar	12,0
Distile su	1000ml

Dehidre besiyeri, 65,0 g/litre olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak (kaynar su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak ya da mikrodalga fırın kullanılarak) tam olarak eritilir. Besiyeri henüz sıvı halde iken, standart 16 X 160 mm tüplere 7'şer mL olarak dağıtılıp, tüpler 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenir. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renklidir ve 25°C'de pH'sı 7,4±0,2'dir (Collins and Lyne, 1976).

### **3.1.2.9. Jelatin Hidroliz Test Ortamı**

	g/litre
Nutrient broth	0,8
Jelatin	4
Distile su	100ml

Jelatin ve nutrient broth distile suda eritilir. Daha sonra 95-100 °C'de 20 dk otoklavda sterilize edilir. Daha sonra tüplere dağıtılarak donması beklenir. Hazırlanan ortama aktif kültürlerden ekim yapılarak 22°C'de 48 saat veya daha fazla inkübe edilir ve tüplerin üzerine Amonyum sülfat çözeltisi dökülür. Jelatin hidrolize edilmişse ortamda sulanma görülür (Collins and Lyne, 1976).

### **3.1.3. Kullanılan çözelti, tampon ve bileşikler**

#### **3.1.3.1. Fenotipik tanılama için kullanılan çözeltiler**

##### **Nessler Reaktifi**

	g/litre
Potasyum iyodür	70
Civa iyodür	100

Potasyum hidroksit	100
Distile su	1000ml

Mikroorganizmaların arjininden amonyak oluşturma testinde ayraç olarak kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

**Kovaks cözeltisi**

Para-dimetil Aminobenzaldehit	5g
Butil alkol	75ml
%37'lik HCL	25ml

Mikroorganizmaların indol üretimi testinde ayraç olarak kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

**%40'lık KOH cözeltisi**

KOH	40g
Kreatin	0,3g
Distile su	100ml

Voges proskauer testinde kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

**Alfa Naftol Cözeltisi**

Naftol	5g
Etanol(%95)	100ml

Naftol etanolde cözünerek hazırlanır. Voges proskauer testinde kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

**Amonyum sülfat cözeltisi**

Amonyum sülfat	53.1 g
Distile su	100ml

Jelatin hidrolizinde kullanılmıştır (Collins and Lyne, 1976).

### **3.1.3.2. Moleküler tanılama çalışmalarında kullanılan materyaller**

#### **Lizis tamponu**

EDTA (Sigma) pH 8.0	60 mM
NaCl (Sigma)	150 mM
SDS (Sigma)	%1
Tris-HCl (Sigma) pH 8.0	400 mM

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu , 2000).

#### **Potasyum asetat tamponu**

5 M Potasyum-asetat (Sigma)	60 ml
Glisial asetik asit (Sigma)	11.5 ml
Distile Su	28.5 ml

Bu tampon, DNA izolasyonunda kullanılmıştır (Liu, 2000).

#### **Tris-borat-EDTA tamponu (TBE) (5x/L)**

Trisma base (Sigma)	54.0 g
Borik asit (Sigma)	27.5 g
0.5 M EDTA (Sigma) pH 8.0	20.0 ml

Bu tampon, agaroz jel elektroforezinde DNA ve PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır (Liu, 2000).

#### **İzopropil alkol (soğuk)**

#### **%70'lik etanol (soğuk)**

#### **Ultra saf su**

#### **Agaroz (Prona)**

#### **dNTP karışımı (100 mM, Fermentas)**

#### **GelRed (Nükleik asit jel boyası, Biotium)**

#### **Marker DNA (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)**

#### **MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)**

#### **PCR reaksiyon tamponu (Fermentas)**

#### **Restriksiyon Endonükleazlar (HaeIII, HinfI, MspI)**



*Safeview (Nükleik asit jel boyası, NBC Biologicals)*

*Taq DNA Polimeraz (500 U, Fermentas)*

*Lacto 16S-F (5'- GGA ATC TTC CAC AAT GGA CG -3')*

*Lacto 16S-R (5'- CGC TTT ACG CCC AAT AAA TCC GG -3')*

*27F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3')*

*1492R (5' -GGYTACCTTGTTACGACTT-3')*

*Proteinaz K (Sigma)*



### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Balıklardan Laktik Asit Bakterisi İzolasyonu

İzolasyon için Sanchez ve arkadaşları (2011) tarafından önerilen metot kullanılmıştır. Eğirdir Gölü Balıkçılık Kooperatifi'nden satın alınan ağırlıkları 400-700g olan sağlıklı ve canlı Gökkuşuğu alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*), Sudak (*Sander lucioperca*), Havuz balığı (*Carassius gibelio*) ve Sazan (*Cyprinus carpio*) balıkları laboratuvara getirilerek fenoksietanol (0,5ml/L) ile muamele edilip bayıldıktan sonra yüzeyleri %70'lik alkolle temizlenip aseptik koşullarda disekte edilmiş daha sonra bağırsakları alınarak kesilmiştir. Bağırsaklar tuzlu suda (NaCl %0,85) 3 kere yıkandıktan sonra bağırsaktan 1g tartılarak steril 9 ml peptonlu suya alınmış ve homojenize edilerek  $10^{-7}$ 'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-7}$ ) 0,1ml alınıp MRS agar, M17 agar ve TSA agara damlatmayla ekimler yapıp  $22^{\circ}\text{C}$ 'de 48-72 saat aerobik ve anaerobik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sayılabilir yoğunlukta olan petriyer ayrılmış ve birbirinden farklı görünümdeki koloniler tekrar MRS agar, TSA (Gonzales et al., 2000) ve M17 agarda pasajlanarak saflaştırılmaya çalışılmıştır. Bakteri izolatlarında öncelikle kolonilerin morfolojik özellikleri, mikroskopik görünümleri, gram reaksiyonları ve katalaz testine bakılmıştır.

#### 3.2.2. Laktik Asit Bakterileri İzolatlarının Fenotipik Tanılanması

##### 3.2.2.1. Gram boyama

İncelenecek materyal steril şartlarda temiz bir lam üzerine homojen bir şekilde yayılmış ve hava akımı ile kurutulmuştur. Alevden geçirilerek fikse edilen lam Kristal violet boyası ile 1 dakika muamele edilmiş, daha sonra lugol solüsyonu damlatılarak 1-2 dakika beklenmiştir. Su ile yıkanarak etanol ile 30 saniye dekolorize edilmiş ve üzerine sulu bazik fuksin damlatılarak 30 sn bekletilmiştir. Su ile tekrar yıkanan ve hava akımı yardımı ile kurutulan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak 1500X büyütme ışık mikroskopunda gözlenmiştir (William et al. 2001; Kıran, 2006).

### **3.2.2.2. Katalaz testi**

Katı agar besiyerinde 18–24 saat geliştirilen bakteri kolonileri üzerine %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi ilave edilerek kültürlerin yüzeyinde hava kabarcığının oluşup oluşmamasına göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Gaz çıkışının olmadığı izolatlar katalaz-negatif olarak değerlendirilmiştir (William et al., 2001; Kıran, 2006).

### **3.2.2.3. Oksidasyon/Fermentasyon testi**

Bu test mikroorganizmaların karbohidratları (özellikle glikozu) ayrıştırmada oksidatif veya fermentatif metabolik yolu kullanma durumlarını saptamada işe yarar ve ayrıca bakterilerin identifikasyonunda yararlanılır. Bazı mikroorganizmalar glikozu oksidatif olarak metabolize ederken bir kısım bakteriler de glikozu, oksijenin olmadığı durumlarda ayrıştırma yeteneklerine sahiptirler (fermentasyon). Bu reaksiyon anaerobik şartlarda gelişir. Bu test için tüpte hazırlanmış (4-5ml) Hugh ve Leifson besiyerinden 2 tane, teste tabi tutulacak mikroorganizmaların taze ve saf kültürleri ve steril parafin hazırlandıktan sonra taze kültüre batırılmış steril iğne her iki besiyerine dikine daldırılmak suretiyle ekilmiştir. Bir tanesine (fermentasyon) 1cm kalınlıkta olacak şekilde steril parafin ilave edilmiştir. Tüplerin ağzı iyice kapanarak 22°C'de 10 gün inkübasyonda tutularak her gün kontrol edilmiştir. Oksidatif karakterde glikozun ayrışması sadece parafinsiz tüpte görülmüştür ve besiyerinin orijinal rengi (mavi-yeşil) sarıya dönmüştür. Bu renk değişimi oksidasyon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Üstü kapalı tüpte bir değişiklik olmamıştır. Fermentatif olanlarda ise her iki tüpteki besiyerinin rengi sarıya dönmüştür. Her iki tüpte renk değişiminin olmaması ise glikozun metabolize olmadığını ifade etmektedir (Cowan and Steel, 1970; Askarian et al., 2008).

### **3.2.2.4. Glikozdan gaz oluşturma**

Glikozdan gaz oluşturma yeteneğinin belirlenmesinde durham tüpleri içeren TSB sıvı besiyeri kullanılmıştır (Arıcı ve ark., 2012). Steril besiyerine aseptik koşullarda taze kültürden %1 düzeyinde inokülasyon yapılmış ve 22°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda durham tüpleri içinde gaz oluşumu

incelenmiştir. Glikozdan gaz oluşturanlar heterofermentatif, oluşturmayanlar homofermentatif olarak sınıflandırılmıştır.

### **3.2.2.5. Argininden Amonyak Oluşturma**

Argininden amonyak oluşturma yeteneğinin saptanmasında Arjininli MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. MRS sıvı besiyerine %0.3 oranında L-arjinin monohidroklorit ilave edilmiş, 5'er ml besiyeri tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Arjinin MRS sıvı besiyerine aseptik koşullarda ilave edilmiş ve bu besiyerine aktif kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapıldıktan sonra 22°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda Nessler reaktifi kullanılarak renk değişimi incelenmiştir. Arjinin MRS sıvı besiyerinde geliştirilmiş olan 24 saatlik kültürlerden petri üzerine bir miktar (1 ml veya 1 öze dolusu) aktarılmıştır. Üzerine aynı miktar Nessler reaktifi ilave edilmiştir. Renk kırmızı turuncuya dönüşmüşse reaksiyon pozitif, renk limon sarısı olmuşsa reaksiyon negatif olarak değerlendirilmiştir (Harrigan and McCance, 1966; Başyigit, 2004).

### **3.2.2.6. Karbonhidrat Fermentasyon Testleri**

MRS sıvı besiyerinden D-glikoz ve et ekstraktı çıkarılarak temel besiyeri hazırlanmıştır. Besiyeri bileşimine sterilizasyondan önce %0,004 oranında klorfenolred indikatörü ilave edilmiş, besiyeri tüplere 5'er ml dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Testi yapılacak karbonhidratların %10 luk çözeltisi hazırlanmış, tinalizasyondan sonra son konsantrasyon %2 olacak şekilde besiyerine ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerine aktif kültürlerden %1 oranında inokülasyon yapılarak 22°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüplerdeki renk değişimi incelenmiştir (Harrigan ve McCance, 1966; Başyigit G, 2004).

### **3.2.2.7. 4°C, 10°C, 15°C ve 45°C' de gelişme**

Aktif kültürlerden steril MRS sıvı besiyerine %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 4°C, 10°C, 15°C ve 45°C' de 48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda MRS sıvı besiyerinde bulanıklık oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır.

Bulanıklık görülen tüpler (+), görülmeyenler ise (-) olarak değerlendirilmiştir (Harrigan ve McCance, 1966; Başıyigit G, 2004).

### **3.2.2.8. Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Gelişme**

Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi için %2, %4 ve %6,5 sodyum klorür ilave edilerek MRS broth besiyeri hazırlanmış, test edilecek izolat, bu besiyerini içeren tüplere inoküle edilerek 22°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatın üreme yeteneği, besiyerinde bulanıklık olup olmaması gözlenerek değerlendirilmiştir (Arıcı ve ark., 2012; Yıldız, 2011).

### **3.2.2.9. Voges Proskauer Testi**

Metil red reaksiyonu, glukozun fermentatif metabolize olması sonucu oluşan organik asitlerin ortamın pH'sını düşürdüğünü ortaya koyar. Metil red indikatörü pH 6'da sarı renk ve pH 4.4'ten aşağıda da kırmızı renk gösterir. VP broth (Voges Proskauer) içeren tüplere aktif kültürden ekim yapıp 22°C'de 48 saat inkübe edilir. 0,5ml alfa naftol çözeltisinden sonra 0,5ml %40'luk potasyum hidroksit çözeltisinden ilave edilerek çalkalanır ve 15 dk beklenir. Kırmızı renge doğru bir pembeleşme asetil metil karbinol'ün oluşumuna bağlı olarak pozitif bir sonuç gösterir (Reginensi et al., 2013).

### **3.2.2.10. Jelatin Hidrolizi**

Jelatin bir proteindir. Hidrolize edildiği zaman aminoasitler meydana gelir. Jelatin 30-35°C'de erir. Bu nedenle inkübasyon 20-25°C'de yapılmıştır. Mikroorganizmanın ürettiği proteolitik jelatinaz enzimi ile jelatin hidrolize olarak eski katı özelliğini kaybeder sıvı hale dönüşmektedir (Pundir et al., 2013).

### **3.2.2.11. İndol Üretimi**

İndol nitrogenli bir bileşik olup bazı bakteriler tarafından triptofan'ın enzimatik hidrolizasyonu sonucunda meydana getirilir, ancak her bakteri triptofandan indol oluşturmaz. TSA'daki 24 saatlik mikroorganizma kültürleri tripton broth'a ekilir. 22°C'de 48 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda

her tüpe 1ml kloroform konulup iyice çalkalanır, daha sonra her tübe birkaç damla kovaks çözeltisi damlatılır, hafifçe çalkalanır. Kırmızı renk oluşumu indol üretimi için (+) sonuçtur (Junren et al., 2011).

### **3.2.2.12. H<sub>2</sub>S Üretimi**

Bazı aminoasitler kükürt içerirler. Mikroorganizmalar aminoasitlerdeki bu kükürt atomlarını koparırlar ve substrattan koparılan H<sub>2</sub> iyonları ile H<sub>2</sub>S meydana getirirler. Bu durumda ortamda siyah renk oluşur. Siyah renk oluşumu pozitif sonucu gösterir. Bu test için Triple Sugar Iron Agar (TSI) ortamı kullanılmıştır (Junren et al., 2011).

## **3.3. Laktik asit bakterilerinin moleküler identifikasyonu**

Çalışmamızda fenotipik ve biyokimyasal testlere göre laktobasil olarak tanılanan 25 izolatın moleküler biyolojik identifikasyonu için önce DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş daha sonra genusa spesifik Lacto 16S-F (GGA ATC TTC CAC AAT GGA CG) ve Lacto 16S-R (CGC TTT ACG CCC AAT AAA TCC GG) primerleri kullanılarak 16 S rDNA'nın kısmi bir bölgesi (216bp) çoğaltılmıştır (Abdulmir et al., 2010). Geriye kalanların identifikasyonu için ise 16S rDNA'sı üniversal primerler olan 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') primerlerle çoğaltılması ve daha sonra sekanslanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi verileri GenBank database'indeki dizilerle BLAST algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır daha sonra accession numaralarını almak için NCBI (National Center for Biotechnology Information)'ya yollanmıştır.

### **3.3.1. DNA izolasyonu ve saflık kontrolü**

İzolatlarının genomik DNA izolasyonu, Liu ve arkadaşları (2000) tarafından genomik DNA izolasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir;

1. TSB'ye ekilen hücreler 37°C'de 1 gece inkübe edilir.
2. Sıvı besiyerinde bir gece büyütülen kültür steril bir eppendorf tüpüne 1,5ml aktarılır ve 8000 rpm'de 8 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürülür, daha sonra süpernatant dökülür.

3. Pellet üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edilir ve karışım homojen olana dek karıştırılır. Daha sonra örneklerin üzerine 10µl lizozim eklenerek 65°C'lik su banyosunda 10 dakika bekletilir.
4. Örneklerin üzerine 10µl proteinaz K koyularak 65°C'de 15 dk bekletilir ve sonra üzerine 150 µl potasyum asetat ilave edilir ve karışım homojen olana kadar karıştırılır.
5. Karışım 12000 rpm'de 4°C'de 5 dk santrifüjlenir ve süpernatant yeni steril bir eppendorf tüpüne aktarılır.
6. Yeni tüpe aktarılan sıvının üzerine eşit hacimde izopropil alkol ilave edilir ve homojen karışım sağlanana dek karıştırılır.
7. Karışım 12000rpm'de 4°C'de 2dk santrifüjlenir ve süpernatant atılır.
8. Daha sonra 300µl %70'lik soğuk etanol ilave edilir ve 12000 rpm'de 4°C'de 1dk santrifüjlenir ve etanol uçurulur.
9. Etanol uçtuktan sonra 50µl ultra saf suda tekrar süspanse edilir (Liu, 2000).

Elde edilen genomik DNA'lar bütünlükleri bakımından agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezi, 5 µl/100 ml SafeView ya da GelRed içeren %1 agaroz içeren mini jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanmasında ve elektroforezde TBE tamponu kullanılmış, 3 µl DNA solüsyonu, 1.5 µl yükleme solüsyonu ile karıştırılarak 90 voltta 75 dakika süreyle yürütülmüştür. Elektroforezde marker olarak GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) ve GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) (enzim kesimleri için) kullanılmıştır. Elektroforez sonucunda başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlıklı tek bir bant gözlenmesi, izole edilen DNA'ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1997). Agaroz jel elektroforezinin yanı sıra nükleik asitlerin saflık kontrolleri A260/A280 oranlarının Nanodrop ile ölçülmesi ile de kontrol edilmiştir.

### **3.3.2. Çoğaltılmış ribozomal DNA restriksiyon analizi ve dizileme, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)**

25 izolatın 16S rDNA'sı 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') universal primerleri kullanılarak

ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ile çoğaltıldıktan sonra, Msp I (Promega), Hae III (Promega), Hinf I (Promega) restriksiyon enzimleriyle kesilmiş ve elektroforezde oluşan fragmentler gruplandırılmıştır (Soto et al., 2010). Oluşan fragmentlere göre aynı restriksiyon paternlerini sergileyenlerden 3 grup oluşturulmuştur. Her grubu temsil edecek şekilde 3 strain seçilerek PCR ürünleri aynı primerlerle çoğaltılarak dizilemeye yollanmıştır. DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25µl'lik ve 50 µl'lik (ARDRA PCR) reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl ve 50 µl (ARDRA PCR) olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla 0.2 ml'lik ve 0.5 ml'lik ince cidarlı bir PCR tüpüne konulmuştur;

**PCR protokolü (Laktobasiller için)**

-10x buffer	2, 5µl
-MgCl <sub>2</sub>	1, 5 µl
-dNTP karışımı	0, 5 µl
-F primer	1, 65 µl
-R primer	1, 65 µl
-Taq polimeraz	0,125 µl
-Kalıp DNA	3 µl
-dH <sub>2</sub> O	14,075 µl

Amplifikasyon programlanabilir bir Thermal Cycler'da (Palm Cycler, Corbett) aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir;

- İlk denatürasyon 94°C'de 3 dakika
- 40 döngü, her döngüde;
  - I. 95°C'de 30 saniye
  - II. 57°C'de 30 saniye
  - III. 73°C'de 60 saniye
- Final uzama 73°C'de 5 dakika

Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C'de saklanmıştır. PCR ürünlerinin saflık kontrolleri, Bölüm 3.2.14.'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

**ARDRA için PCR protokolü**



-10xbuffer	10µ
-MgCl <sub>2</sub>	3 µl
-F primer	2 µl
-R primer	2 µl
-Taq polimeraz	0, 4 µl
-DNA	5µl
-dH <sub>2</sub> O	27.6 µl
- İlk denatürasyon 94°C'de 5 dakika	
- 30 döngü, her döngüde;	
I. 94°C'de	1 dakika
II. 55°C'de	1 dakika
III. 72°C'de	1 dakika
- Final uzama 72°C'de	7 dakika

Tüpler, reaksiyon bittikten sonra 4°C'de saklanmıştır. PCR ürünlerinin saflık kontrolleri, Bölüm 3.2.14.'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Enzim kesimi karışımlarının hazırlanmasında üreticinin verdiği bilgilerden yararlanılmıştır.

### **MSP 1 restriksiyon endonükleaz ile kesim**

-10x buffer	2µL
-BSA	0, 2 µL
-Restriksiyon enzimi	0,5 µL
-Kalıp DNA	8 µL
-Bidistile su	9,3 µL
Toplam hacim	20 µL

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C'lik bir etüvde inkübe edilir.

### **Hae III restriksiyon endonükleaz ile kesim**

-10x buffer	2µL
-BSA	0, 2 µL
-Restriksiyon enzimi	0, 5 µL
-Bidistile su	9, 3 µL
-Kalıp DNA	8 µL

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C'lik bir etüvde inkübe edilir.

### **HinfI restriksiyon endonükleaz ile kesim**

-10x buffer	2 µl
-BSA	0, 2 µl
-Restriksiyon enzimi	0, 5 µl
-Bidistile su	9, 3 µl
-Kalıp DNA	8 µl
Toplam hacim	20 µl

Karışım dikkatlice karıştırılır. 5 dakika 37°C'lik bir etüvde inkübe edilir.

Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonrasında elde edilen ürünler, %2 agaroz içeren agaroz jel elektroforezinde Bölüm 3.2.14'te bahsedildiği gibi 90 dakika süresince yürütülmüş ve Bio-Rad jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir.

## **3.4. İzolatların Potansiyel Probiyotik Özelliklerini Yansıtan Biyoteknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi**

### **3.4.1. Hidrofobisite**

Organizmaların hidrokarbonlara tutunmaları (hidrofobisite) bağırsak epitel hücrelerine tutunduklarının bir göstergesidir. Organizmaların bağırsak yüzeylerine tutunma kabiliyetlerinin ölçüsü olan hidrofobisite Perez ve arkadaşlarının (1998) bildirdikleri metoda göre belirlenmiştir. 22°C'de 48 saat inkübe edilen bakteri kültüründen 2ml 0,4 ml xylene ile birlikte 120 sn vortekslelendikten sonra üstte kalan faz uzaklaştırılmış, alttaki fazın (sulu faz) spektrofotometrede 600 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Sulu faz uzaklaştırılmadan önce ( $A_0$ ) ve sonraki ( $A$ ) absorbans değerleri arasındaki farktan hücre yüzeyi hidrofobisitesi aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

Hidrofobisite (%) =  $[(A_0 - A) / A_0] \times 100$   $A_0$  ve  $A$  değerleri xylene ile ekstraksiyondan önce ve sonraki absorbans değerleridir (Arıcı ve ark., 2011 Sanchez et al., 2011).

### 3.4.2. pH toleransı

Laktik asit bakteri izolatları MRS sıvı besiyerinde 22°C’de bir gece inkübe edildikten sonra pH’ları HCL ile 1 ve 3’e ayarlanmış 10 ml’lik taze besiyerine ekim yapılarak kültürel yöntemle başlangıç sayıları tespit edilmiştir. Hazırlanan bakteri kültürleri 22°C’de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon başında ve sonunda ph 1 ve 3’teki kültürlerden 1’er ml alınarak 9ml’lik steril fizyolojik tuzlu su ile 10<sup>-6</sup>’ya kadar seri dilüsyonlar hazırlanarak 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>,10<sup>-3</sup> dilüsyonlarından MRS besiyerine damlatma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Bu petrilere 22°C’de 48 saat inkübe edilerek inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmış ve başlangıç sayısına (0.saattteki gelişen koloniler) göre canlı kalma oranları tespit edilmiştir (Arıcı ve ark., 2011; Sanchez et al., 2011).

### 3.4.3. İzolatların Safra Tuzuna Toleransının Belirlenmesi

Bağırsaktaki safra konsantrasyonu % 0,3 (w/v) olup besinlerin ince bağırsakta kalma süreleri yaklaşık 4 saattir. Bakteri strainleri %0,15-0,3 safra tuzuyla –zenginleştirilmiş MRS broth ortamına inoküle edilerek 30 °C’de inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyon sırasında büyüme, broth kültürlerde 600 nm’de spektrofotometrede ölçülerek ve MRS agar ortamına aktarılarak oluşan koloniler sayılmıştır (Chemlal-Kherraz et al., 2012).

### 3.4.4. Antibiyotik Duyarlılığı

Antibiyotik duyarlılığı Mueller Hinton agarda disk difüzyon testiyle değerlendirilmiştir. Kullanılan antibiyotikler: Doxycycline (30 µg), enoxacine (10 µg), erythromycin (15µg), florfenicol (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), enrofloxacin (5µg), oxytetracycline (30µg), chloramphenicol (30 µg) vancomycin (30 µg) ve penicilin (10 µg) Hedef bakteriyi içeren petrilere yerleştirilen antibiyotik diskleri 22°C ‘de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda büyüme inhibisyon zonları ölçülerek (Sanchez et al., 2011) değerlendirmeler büyüme inhibisyonları ölçüldükten sonra değerlendirmeler klinik ve laboratuvar standartları enstitüsüne (CLSI –Clinical and Laboratory Standards Institute) göre yapılmıştır (CLSI, 2008).

### 3.4.5. In vitro antagonism

Seçilen laktik asit bakterilerinin *Salmonella typhimirium* (ATCC 14928), *Lactococcus garvieae* ATCC 49156, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia ruckeri* ve *Escherichia coli* O157H7 üzerindeki antimikrobiyal etkisi disk difüzyon tekniğiyle belirlenmiştir (*Yersinia ruckeri* Türkiye'deki alabalık çiftliklerine en fazla görülen patojen olduğundan diğer bakteriler ise daha fazla patojene toleransı tespit etmek için kullanılmıştır). Patojen bakteriler TSA agarda 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra inokülüm yoğunlukları 0,5 Mac Farland'a ayarlanmış ve genel besiyerine (50-100 µl) swabla ekimi yapılmıştır. Aynı zamanda laktik asit bakterileri MRS broth'da 24 saat inkübe edilerek taze kültürleri hazırlanmış ve kültür santrifüjlenerek (8000 rpm, 5 dakika, 4°C) hücresiz solüsyon elde edilmiştir. Elde edilen supernatant patojen bakterileri içeren petrilere yerleştirilmiş steril disklere emdirilerek petrilere 22°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları ölçülerek kaydedilmiştir (Allameh et al 2012; Kherraz et al 2012).

### 3.4.6. Patojenite Testi

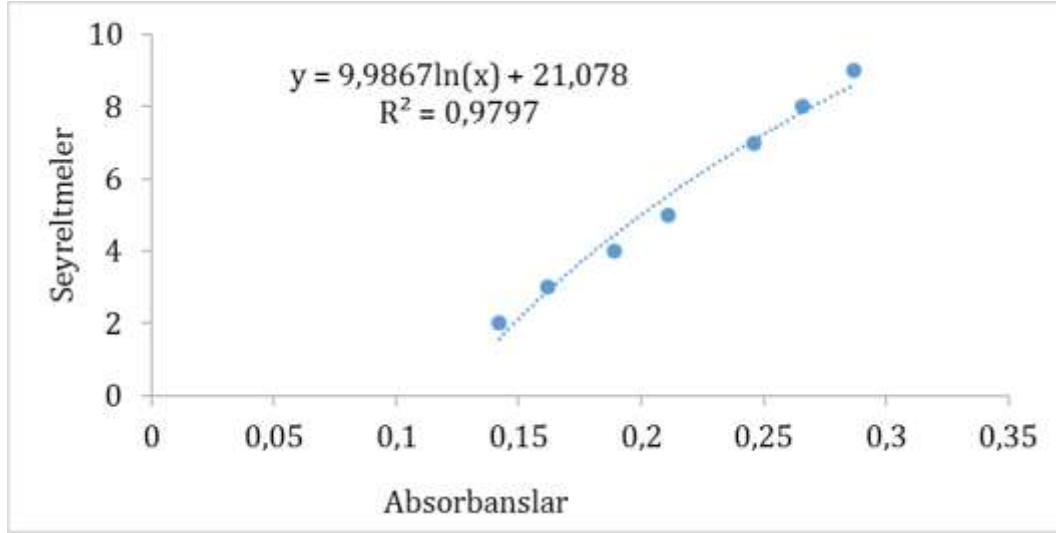
4 numaralı izolatın (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) taze saf kültürlerinden ml'sinde  $10^6$  canlı bakteri hücresi olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmıştır. 15 günlük adaptasyon süresi tamamlanmış balıklara intramüsküler olarak  $10^6$  (cfu/ml) bakteri hücresi ihtiva eden steril fosfat buffer salin (PBS) süspansiyonu enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna ise sadece saf PBS enjekte edilmiştir (Aydın vd., 1997; Bricknell et al., 1999). Enjeksiyonu takip eden 20 gün içinde balıkların davranışları, klinik belirtileri ile ölen balıkların nekropsisi sonunda klinik belirtileri kaydedilmiştir. Yapılan testler sonucu balıklar üzerinde patojen olmadıkları kesinleşen izolatlar balık yemine karıştırılarak probiyotik etkileri araştırılmıştır.

### 3.4.7. Potansiyel probiyotiklerin balık beslemesinde kullanılması

Besleme çalışması için Irianto ve Austin (2002) tarafından önerilen metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Denemede Ø 150 cm ebatlı, 1150 L hacimli 6 adet CTP yuvarlak tanklar kullanılmıştır Deneme için ağırlıkları ortalama  $19 \pm 22$ g olan toplam 210 adet gökkuşağı alabalığı (*O.mykiss*) kullanılmış ve her tanka 35

adet balık yerleştirilmiştir. Tanklara düzenli ve sürekli su akışı sağlanmıştır. Günlük olarak; su sıcaklığı ve çözünmüş oksijen değerleri takip edilmiştir. Deneme 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş olup istatistiksel analizler için SPSS 15.00 paket programı kullanılmıştır. TSB (Tryptone soya broth)'de büyütülen probiyotikler santrifüj edilerek pellet PBS'de süspanse edilmiştir (ml'de yaklaşık 1010 hücre olacak şekilde). Bakteri süspanسیونları direk 100g ticari alabalık yemiyle karıştırılarak böylece 1g yemde yaklaşık  $10^6$ - $10^8$  (cfu/g) (Nikoskelainen et al., 2001) bakteri hücrelerinin olması sağlanmıştır. Bakteri sayımı için spektrofotometre (WTW) kullanılarak yapılan sayımlardan standart eğri oluşturularak yapılmıştır.

Deneme grubundaki gökkuşağı alabalıkları günde 3 kere deneysel yem ve ticari kontrol yemle 4 hafta boyunca beslenmiştir. Balıklardan denemenin 14. Gününde 10'ar tane alınıp karından 0.1ml ( $10^7$  cfu/ml) patojenle inkübe edilmiş ve balıklar üzerindeki etkisi ve balıkların hayatta kalma oranı 14 gün boyunca takip edilmiştir (Sharifuzzaman and Austin, 2009; Brunt et al., 2007). LD<sub>50</sub> dozunu belirlemek için toplam 120 adet balık kullanılmıştır. In-vivo enfeksiyon denemesi için 9 adet tank kullanılmış olup her tanka 10 ar balık konulmuş ve  $10^4$  ile  $10^7$  (cfu/ml) arasında değişen dozlarda patojen (*Y.ruckeri*) içeren süspanسیونlar balıkların karından 0,1ml oranında enjekte edilerek ölüm oranlarına bakılmıştır. Balıkların %50'sinden fazasını öldüren doz  $10^7$  cfu/ml olarak tespit edilmiş ve in vivo enfeksiyonda bu doz kullanılmıştır (Giri et al., 2012). Denemenin sonunda bütün balıkların ağırlıkları ve genel sağlık durumları incelenmiş ve balıklar fenoksietanolle muamele edilerek öldürülmüş ve bağırsakları alınarak izolasyonlar yapılmış ve oluşan koloniler saflaştırılarak API 20 strep testle tanılamaları yapılmıştır.



**Şekil 3.1** Spektrofotometrede yapılan bakteri sayımları sonucu oluşturulan standart eğri (Değişkenler arasında istatistiki olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) logaritmik bir ilişki bulunmaktadır).

#### **3.4.7.1. Büyüme parametrelerinin hesaplanması**

Araştırmada deneme başından itibaren 7 günlük periyotlarla balıkların canlı ağırlık ve boy olarak büyüme; mutlak, oransal ve spesifik büyümenin hesaplanmasıyla değerlendirilmiştir. Büyüme parametrelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır (El Sayed, 1990, Çetinkaya, 1995, Hoşsu vd., 2001).

$$\text{Boy kazancı (BK)} = L_t - L_{t-1}$$

$$\text{Canlı ağırlık kazancı (CAK)} = W_t - W_{t-1}$$

$$\text{Boyca oransal büyüme (OB)} = [(L_t - L_{t-1}) / L_{t-1}] \times 100$$

$$\text{Ağırlıkça oransal büyüme (OB)} = [(W_t - W_{t-1}) / W_{t-1}] \times 100$$

$L_t$ : t. periyottaki ortalama mutlak boy (cm)

$L_{t-1}$ : t-1. Periyottaki ortalama mutlak boy (cm)

$W_t$ : t. periyottaki ortalama mutlak ağırlık (g)

$W_{t-1}$ : t-1. Periyottaki ortalama mutlak ağırlık (g)

### **3.4.7.2. Yaşama oranının hesaplanması**

Her tank için yaşama oranı ayrı ayrı hesaplanmıştır. Yaşama oranının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır (Davis and Robinson, 1986; Claudia et al., 2004; Jacinto et al., 2005; Hammond et al., 2006). Yaşama oranı (YO), deneme sonunda akvaryumlarda kalan balık sayısının (Nt) deneme başındaki balık sayısına (Nt-1) oranlamasıyla hesaplanmıştır.

$$YO = (Nt / Nt-1) \times 100$$

YO = Yaşama Oranı

Nt = Deneme sonundaki balık sayısı (adet)

Nt-1 = Deneme başındaki balık sayısı (adet)

### **3.4.7.3. Deneme sonunda balıkların bağırsak florasının tespiti**

28 günlük deneme sonunda bağırsak florasının tespiti için kalan tüm balıklar fenoksietanolle muamele edilerek yüzeyleri %70'lik alkolle silinmiş ve bağırsak içerikleri alınarak küçük parçalara ayrılmış ve steril FTS'de seyreltilerek  $10^{-7}$ 'ye kadar seyreltilerek TSA ve M17 besiyerlerine ekimler yapılmış ve 22°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra saflaştırılan kolonilerin gram boyamaları ve katalaz testleri yapıldıktan sonra API 20 STREP testi ile tanılamaları yapılmıştır. Genus olarak tanımlanabilen izolatların tür düzeyinde belirlenebilmesi için; standardize edilmiş tanımlama sistemi olarak ifade edilen API (Analytical Profile Index) 20 strep test kitlerinden (BioMerieux) yararlanılmıştır. Bu test probiyotik denemesinin 28. Gününde kalan balıklardan izole edilen gr (+) katalaz (-) özellikteki bakterileri tanılamak için kullanılmıştır. API 20 strep testi, şekerlerin enzimatik aktivitesi ya da fermentasyonunun belirlenmesi için dehidre substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşmaktadır. Kitte bulunan kullanıma hazır 2 ml'lik ortama bakteri yoğunluğu McFarland 4'ü geçecek şekilde süspansiyon edilmiş ve inokülasyon yapılmıştır. Daha sonra ilgili kuyucukların üzeri mineral yağla kaplanarak 36°C±2°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Okumalar gerekli reaktifler eklendikten sonra ilk 4.saat ve 24.saat olmak üzere yapılmış ve sonuçlar "API Identification Software (API Lab Plus Program, bioMerieux)" programına aktarılmış ve izolatlar içinde seçilen örnekler bu bilgisayar programına göre tür hatta alttür düzeyinde tanımlanmıştır.

#### **3.4.7.4. Verilerin değerlendirilmesi**

Denemelerden elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15.00 paket programı kullanılmıştır. Bütün verilere varyans homojenlik testleri uygulandıktan sonra varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve grup ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Önem seviyesi olarak, biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan önem seviyesi ( $p=0,05$ ) seçilmiştir.





## 4. BULGULAR

### 4.1. Fenotipik Tanılama

Sazan (*C. carpio*), Sudak (*S. lucioperca*), Havuz Balığı (*Carassius gibelio*) ve Gökkuşuğu Alabalığı (*O. mykiss*) balıklarından izole edilen 75 adet bakteri izolatının, kültürel ve fizyolojik özellikleri konvansiyonel metotlara göre yapılmıştır. İzolasyon kaynakları, kültürel ve fizyolojik özellikleri gösteren çizelge (Çizelge 4.1- Çizelge 4.5) ve şekiller (Şekil 4.1- Şekil 4.5) aşağıda verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Laktik asit bakteri izolatlarının izolasyon kaynakları ve inkübasyon koşulları

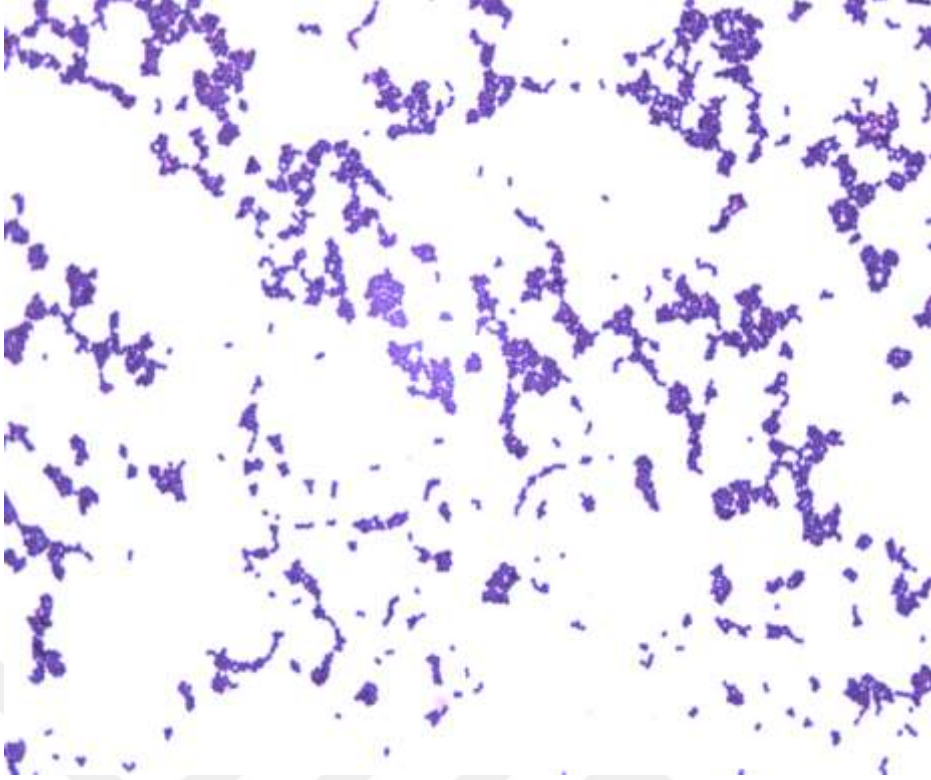
Strain No	Balık	Organ	Besiyeri	Sıcaklık	İnkübasyon Süresi
2	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
4	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
6	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
7	Sudak	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
8	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
9	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
10	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
30	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
33	Sudak	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
37	Alabalık	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
38	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
39	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
40	Sudak	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
48	Havuz Balığı	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
53	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
54	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
66	Sudak	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
68	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
69	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
75	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
36	Sazan	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
70	Alabalık	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
71	Alabalık	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
72		Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
51	Havuz Balığı	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
34	Alabalık	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
19	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
57	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
25	Sudak	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
35	Alabalık	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
61	Sazan	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
56	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
73	Havuz Balığı	Bağırsak	MRS	22°C	48 Saat
24	Sazan	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat

Çizelge 4.1 (Devam)

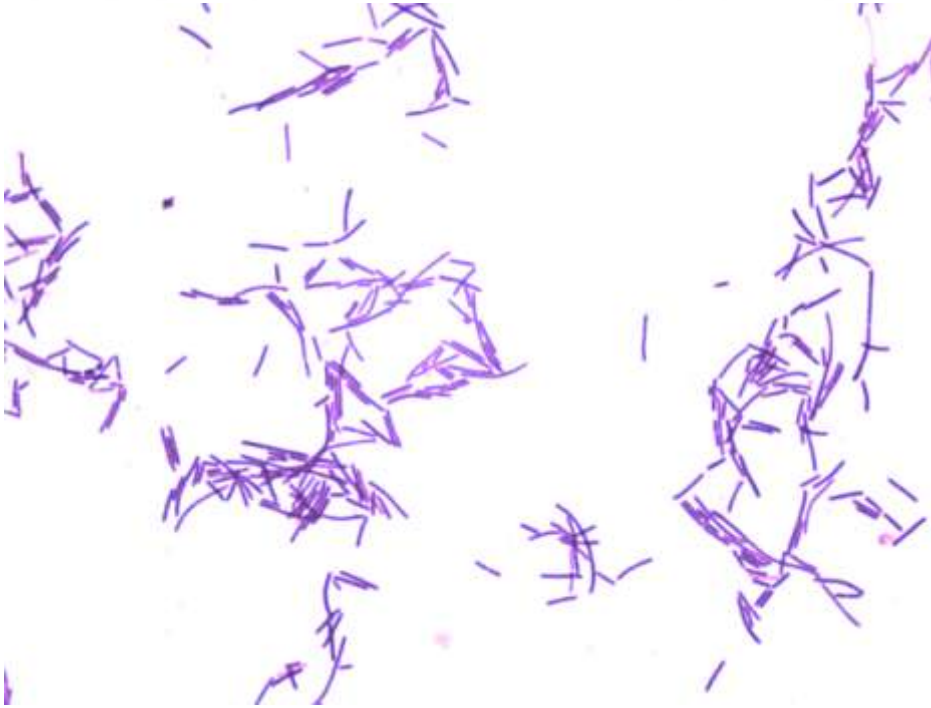
Strain No	Balık	Organ	Besiyeri	Sıcaklık	İnkübasyon Süresi
42	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
49	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
28	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
60	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
23	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
52	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
41	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
46	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
43	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
64	Sudak	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
31	Sudak	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
50	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
26	Sudak	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
22	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
58	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
55	Havuz Balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
62	Sazan	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
59	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
47	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
32	Sudak	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
29	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
18	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 Saat
45	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
44	Havuz Balığı	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
63	Sazan	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
65	Sudak	Bağırsak	M17	22°C	48 Saat
27	Sudak	Bağırsak	M17	22°C	48 saat
15	Havuz balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
21	Sudak	Solungaç	TSA	22°C	48 saat
20	Sazan	Bağırsak	MRS	22°C	48 saat
11	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
16	Havuz balığı	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
5	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
1	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
3	Sazan	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
13	Alabalık	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
26	Sudak	Bağırsak	M17	22°C	48 saat
12	Alabalık	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat
14	Sudak	Bağırsak	TSA	22°C	48 saat



Şekil 4.1 MRS'de 22°C'de 48 saat inkübe edilen 4 numaralı izolatın çizgi ekim görünümü.



**Şekil 4.2** 22°C’de 48 saat inkübe edilen 4 numaralı izolatın gram boyama görüntüsü (1000X).



**Şekil 4.3** 22°C’de 48 saat inkübe edilen 70 numaralı izolatın gram boyama görüntüsü (1000X).

Çizelge 4.2 Bakteri izolatlarının bazı fenotipik özellikleri.

İzolat no	Gram boyama	Hareketlilik	OF	Oksidaz	Katalaz	H <sub>2</sub> S üretimi	Jelatinaz	Arginin hidrolizi
1	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	F	-	-	-	-	+
3	+	-	F	-	-	-	-	+
4	+	-	F	-	-	-	-	+
5	+	-	F	-	-	-	-	+
6	+	-	F	-	-	-	-	+
7	+	-	F	-	-	-	-	+
8	+	-	F	-	-	-	-	+
9	+	-	F	-	-	-	-	+
10	+	-	F	-	-	-	-	+
11	+	-	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	F	-	-	-	-	+
15	+	-	F	-	-	-	-	+
16	+	-	F	-	-	-	-	+
17	+	-	-	-	-	-	+	-
18	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	F	-	-	-	-	+
21	+	-	F	-	-	+	-	-
22	+	-	F	-	-	+	-	-
23	+	-	F	-	-	+	-	-
24	+	-	F	-	-	-	+	+
25	+	-	-	-	-	-	-	+
26	+	-	-	-	-	-	-	+
27	+	-	-	-	-	-	-	+
28	+	-	-	-	-	-	-	+

Çizelge 4.2 (Devam)

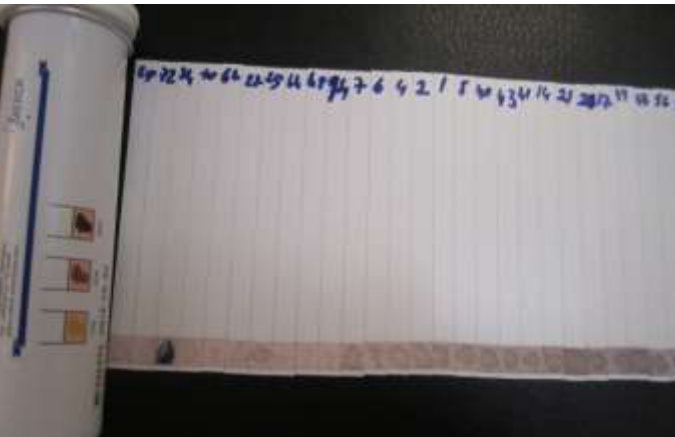
İzolasyon no	Gram boyama	Hareketlilik	OF	Oksidaz	Katalaz	H <sub>2</sub> S üretimi	Jelatinaz	Arginin hidrolizi
29	+	-	F	-	-	-	-	+
30	+	-	F	-	-	-	-	+
31	+	-	F	-	-	-	-	+
32	+	-	F	-	-	-	-	+
33	+	-	-	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	-	+
35	+	-	-	-	-	-	-	+
36	+	-	F	+	-	-	-	-
37	+	-	F	-	-	-	-	+
38	+	-	F	-	-	-	-	+
39	+	-	F	-	-	-	-	+
40	+	-	F	-	-	-	-	+
41	+	-	-	-	-	-	-	+
42	+	-	-	-	-	-	-	+
43	+	-	-	-	-	-	-	+
44	+	-	-	-	-	-	-	+
45	+	-	-	-	-	-	-	+
46	+	-	-	-	-	-	-	+
47	+	-	-	-	-	-	-	-
48	+	-	-	-	-	-	-	-
49	+	-	F	-	-	-	-	-
50	+	-	F	-	-	-	-	+
51	+	-	-	-	-	-	-	-
52	+	-	-	-	-	-	-	-
53	+	-	F	-	-	-	-	+
54	+	-	F	-	-	-	-	+
55	+	-	-	-	-	-	-	-
56	+	-	-	-	-	-	-	-
57	+	-	-	-	-	-	-	-
58	+	-	-	-	-	-	-	-
59	+	-	F	-	-	-	-	+
60	+	-	F	-	-	-	-	+
61	+	-	F	-	-	-	-	-
62	+	-	F	-	-	-	-	-
63	+	-	F	-	-	-	-	-
64	+	-	-	-	-	-	-	+
65	+	-	-	-	-	-	-	-
66	+	-	F	-	-	-	-	+
67	+	-	F	-	-	-	-	+
68	+	-	F	-	-	-	-	+
69	+	-	F	-	-	-	-	+
70	+	-	F	-	-	-	-	+
71	+	-	F	-	-	-	-	+
72	+	-	-	+	-	-	-	+
73	+	-	-	-	-	-	-	+
74	+	-	F	-	-	-	-	+
75	+	-	F	-	-	-	-	+



Şekil 4.4 Bakteri izolatlarının oksidasyon/fermentasyon (O/F) testi



Şekil 4.5 Bakteri izolatlarının arjinin hidroliz testi



Şekil 4.6 Bakteri izolatlarının oksidaz testi (mor renk olanlar oksidaz (+), sarı renkli olanlar oksidaz (-)).

Şekil 4.7 Bakteri izolatlarının H<sub>2</sub>S üretimi

Çizelge 4.3 Bakteri izolatlarının bazı fenotipik özellikleri

İzolat no	Glukozdan gaz üretim	İndol	4°C'de gelişme	10°C'de gelişme	15°C'de gelişme	45°C'de gelişme	%2 Tuzda gelişme	%4 Tuzda gelişme	%6,5 Tuzda gelişme
1	-	-	Z*	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+	+	+	-
3	-	-	-	+	+	+	+	+	-
4	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	+	+	+	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	+	+	+	-
8	-	-	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	+	Z	+	+	+
11	-	-	-	Z	+	+	+	+	-
12	-	-	Z	Z	+	Z	+	+	-
13	-	-	-	Z	+	Z	+	+	-
14	-	-	Z	+	+	+	+	+	+
15	-	-	Z	+	+	+	+	+	+
16	-	-	Z	+	+	+	+	+	+
17	-	-	+	Z	+	+	+	+	+
18	-	-	+	Z	+	+	+	+	+
19	-	-	+	Z	+	+	+	+	+
20	-	-	+	+	+	+	+	+	+
21	+	-	+	Z	+	+	+	+	-
22	+	-	+	Z	+	+	+	+	-
23	+	-	+	Z	+	-	+	+	-
24	+	-	+	+	+	+	+	+	-
25	-	-	Z	+	+	Z	+	+	+
26	-	-	Z	+	+	Z	+	+	+
27	-	-	Z	+	+	Z	+	+	-
28	-	-	Z	+	+	Z	+	+	-
29	-	-	+	+	+	+	+	+	+
30	-	-	+	+	+	+	+	+	+
31	-	-	Z	+	+	Z	+	+	+
32	-	-	Z	+	+	+	+	+	+

Çizelge 4.3 (Devam)

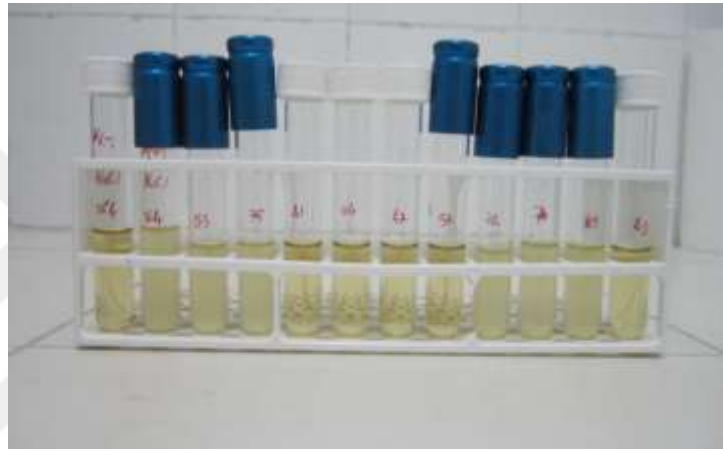
33	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	-
34	-	-	-	+	+	+	+	+	-
35	-	-	-	+	+	<b>Z</b>	+	+	-
36	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	+
37	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	+
38	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	-
39	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	-
40	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	+
41	-	-	+	+	+	+	+	+	+
42	-	-	+	+	+	<b>Z</b>	+	+	+
43	-	-	+	+	+	<b>Z</b>	+	+	+
44	-	-	+	+	+	+	+	+	+
45	-	-	+	+	+	-	+	+	+
46	-	-	+	+	+	-	+	+	+
47	-	-	+	+	+	+	+	+	-
48	-	-	+	+	+	-	+	+	-
49	-	-	+	+	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+	+	+	+	+
51	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	-
52	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	-
53	-	-	-	+	+	<b>Z</b>	+	+	+
54	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	+
55	-	-	+	+	+	<b>Z</b>	+	+	-
56	-	-	+	+	+	<b>Z</b>	+	+	Z
57	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	Z
58	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	Z
59	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	Z
60	-	-	<b>Z</b>	+	+	<b>Z</b>	+	+	Z
61	-	-	+	+	+	+	+	+	Z
62	-	-	+	+	+	+	+	+	Z
63	-	-	+	+	+	+	+	+	Z
64	-	-	+	+	+	+	+	+	Z
65	-	-	+	+	+	+	+	+	Z
66	-	-	-	++	+	<b>Z</b>	+	+	-
67	-	-	-	+	+	<b>Z</b>	+	+	-
68	-	-	-	+	+	<b>Z</b>	+	+	+
69	-	-	-	+	+	<b>Z</b>	+	+	+
70	-	-	+	+	+	+	+	+	+
71	-	-	+	+	+	+	+	+	+
72	-	-	-	+	+	+	+	+	+
73	-	-	-	+	+	+	+	+	+
74	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	+
75	-	-	<b>Z</b>	+	+	+	+	+	+

(z: zayıf üreme)

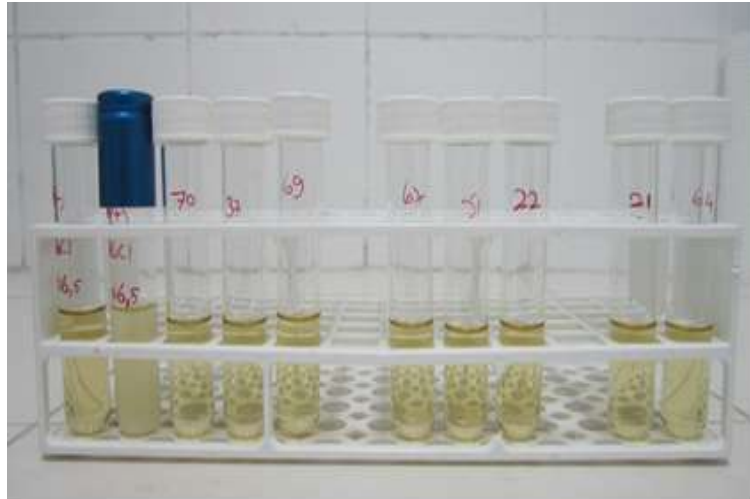




Şekil 4.8 TSB'de 22°C'de 24 saat inkübe edilen bakteri izolatlarının %2 tuza olan toleransları



Şekil 4.9. TSB'de 22°C'de 24 saat inkübe edilen bakteri izolatlarının %4 tuza toleransları



Şekil 4.10 TSB'de 22°C'de 24 saat inkübe edilen bakteri izolatlarının % 6,5 tuza olan toleranslar





Çizelge 4.4 (Devam)

	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gliserol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Larabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Adanitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DGalactose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Myoinositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mannitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorbitol	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arbutine	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
Esculin	+/-	+/-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	
Salicin	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Maltose	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
Sucrose	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Melesitose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
d-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Voges p	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Çizelge 4.5 Çalışmadan elde edilen bakteri strainlerinin konvansiyonel tanı sonuçları

İzolat numarası	Konvansiyonel Tanı Sonucu
1	<i>Streptococcus intermedius</i>
2	<i>Lactobacillus salivarius</i>
3	<i>Streptococcus intermedius</i>
4	<i>Lactococcus lactis</i>
5	<i>Enterococcus faecalis</i>
6	<i>Lactobacillus salivarius</i>
7	<i>Lactobacillus fermentum</i>
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
10	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
11	<i>Streptococcus intermedius</i>
12	<i>Streptococcus intermedius</i>
13	<i>Streptococcus intermedius</i>
14	<i>Lactococcus lactis</i>
15	<i>Lactobacillus salivarius</i>
16	<i>Lactobacillus salivarius</i>
17	<i>Lactobacillus lindneri</i>

Çizelge 4.5 (Devam)

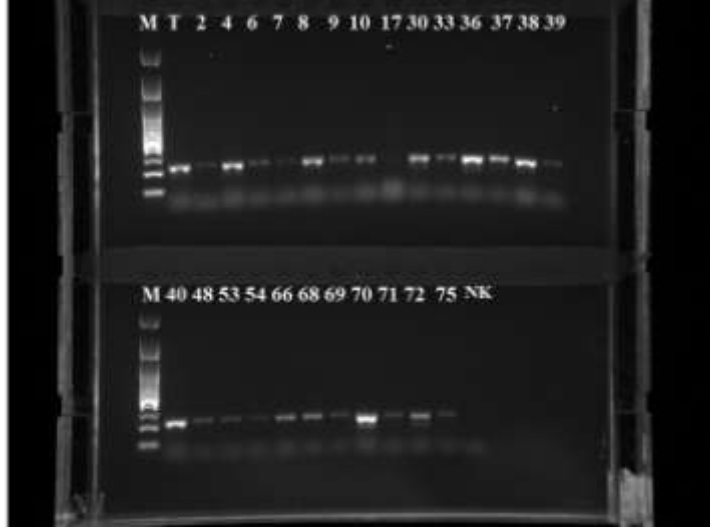
18	<i>Lactobacillus lindneri</i>
19	<i>Lactobacillus lindneri</i>
20	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
21	<i>Aerococcus viridans</i>
22	<i>Pediococcus damnosus</i>
23	<i>Pediococcus damnosus</i>
24	<i>Lactococcus lactis</i>
25	<i>Streptococcus constellatus</i>
26	<i>Lactococcus lactis</i>
27	<i>Lactococcus lactis</i>
28	<i>Lactococcus lactis</i>
29	<i>Lactococcus lactis</i>
30	<i>Lactococcus lactis</i>
31	<i>Lactococcus lactis</i>
32	<i>Lactococcus lactis</i>
33	<i>Lactobacillus helveticus</i>
34	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
35	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>
37	<i>Lactobacillus brevis</i>
38	<i>Lactobacillus fermentum</i>
39	<i>Lactobacillus fermentum</i>
40	<i>Lactobacillus curvatus</i>
41	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
42	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
43	<i>Lactococcus lactis</i>
44	<i>Lactococcus lactis</i>
45	<i>Lactococcus lactis</i>
46	<i>Lactococcus lactis</i>
47	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
48	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
50	<i>Streptococcus constellatus</i>
51	<i>Streptococcus constellatus</i>
52	<i>Streptococcus constellatus</i>
53	<i>Lactobacillus curvatus</i>
54	<i>Lactobacillus curvatus</i>
55	<i>Streptococcus constellatus</i>
56	<i>Streptococcus constellatus</i>
57	<i>Streptococcus constellatus</i>
58	<i>Streptococcus constellatus</i>
59	<i>Streptococcus constellatus</i>
60	<i>Streptococcus constellatus</i>
61	<i>Streptococcus constellatus</i>
62	<i>Streptococcus constellatus</i>
63	<i>Streptococcus constellatus</i>
64	<i>Streptococcus constellatus</i>
65	<i>Streptococcus constellatus</i>
66	<i>Lactobacillus curvatus</i>
67	<i>Lactobacillus curvatus</i>
68	<i>Lactobacillus curvatus</i>
69	<i>Lactobacillus curvatus</i>
70	<i>Lactobacillus curvatus</i>
71	<i>Lactobacillus curvatus</i>
72	<i>Lactobacillus curvatus</i>
73	<i>Streptococcus constellatus</i>
74	<i>Lactobacillus curvatus</i>
75	<i>Lactobacillus curvatus</i>

## 4.2. Moleküler Tanılama

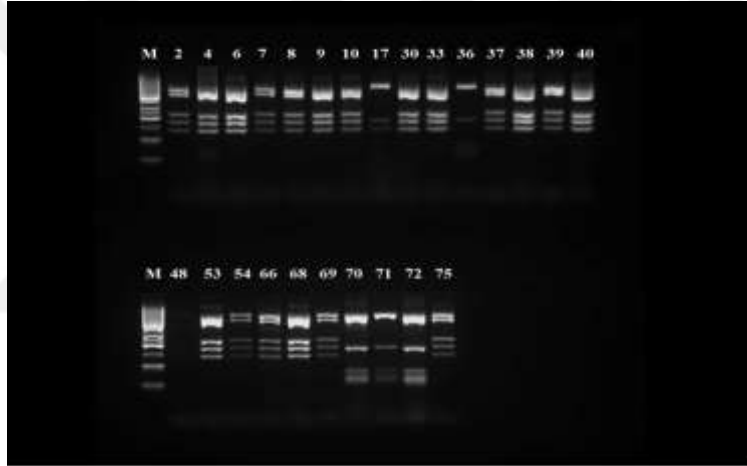
Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi tatlı su balıklardan izole edilen 75 adet bakteri straini moleküler tanılama çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu strainlerin genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen genomik DNA’ların saflıkları, hem agaroz jel elektroforezi hem de Nanodrop cihazında A260/A280 oranlarının ölçülmesi ile kontrol edilmiştir.

### 4.2.1. 16S rDNA bölgesinin PCR ve ARDRA PCR ile analizi

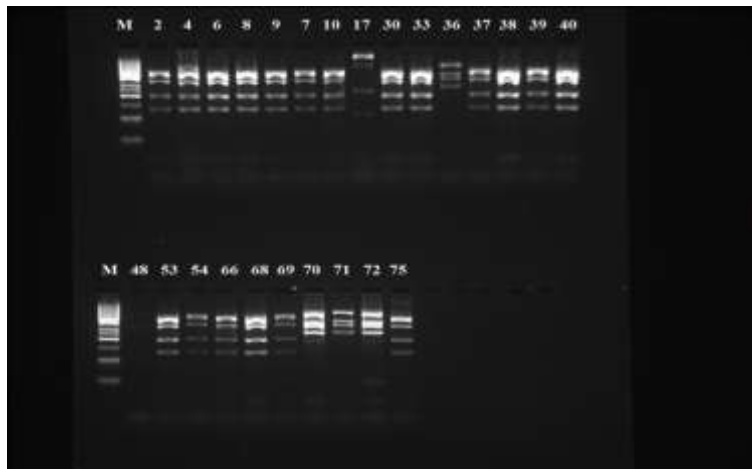
Gram boyamada morfolojileri laktobasile benzeyen 25 bakteri izolatından (2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 30, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 48, 53, 54, 66, 68, 69, 70, 71, 72 ve 75) elde edilen genomik DNA’lardan Lacto 16S-F ve Lacto 16S-R primerleri kullanılarak Bölüm 3.3.2’de belirtildiği gibi PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 16S rDNA’nın 216 bp’lik kısmı PCR ile çoğaltılmış olup elde edilen fragmentler Şekil 4.11’de verilmiştir. Daha sonra 27F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') primerleri kullanılarak izolatların 16S rDNA’sı ARDRA PCR ile çoğaltılarak Bölüm 3.3.2’de belirtildiği gibi Msp I (Promega), Hae III (Promega) ve Hinf I (Promega) enzimleriyle kesilerek elde edilen fragmentler jel elektroforezde görüntülenerek gruplandırılmıştır. Elde edilen grupların görüntüleri Şekil 4.12- 4.14’te verilmiştir. Geriye kalanların genomik DNA’ları (18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 73, 11, 1, 3, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21) 27F ve 1492R primerleri kullanılarak Bölüm 3.2.15’te belirtildiği gibi PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen fragmentler Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da görülmektedir.



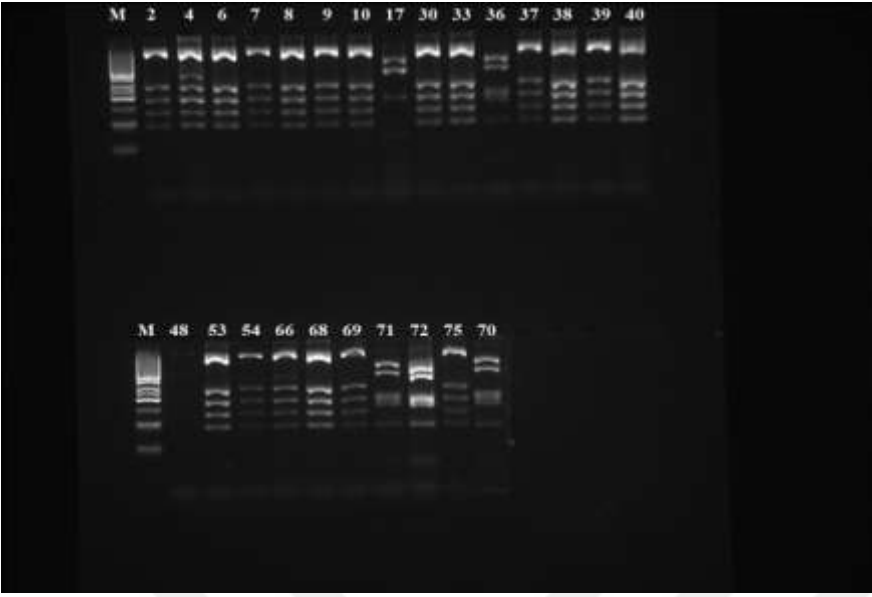
Şekil 4.11 16Sr DNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu oluşan band uzunlukları [M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)].



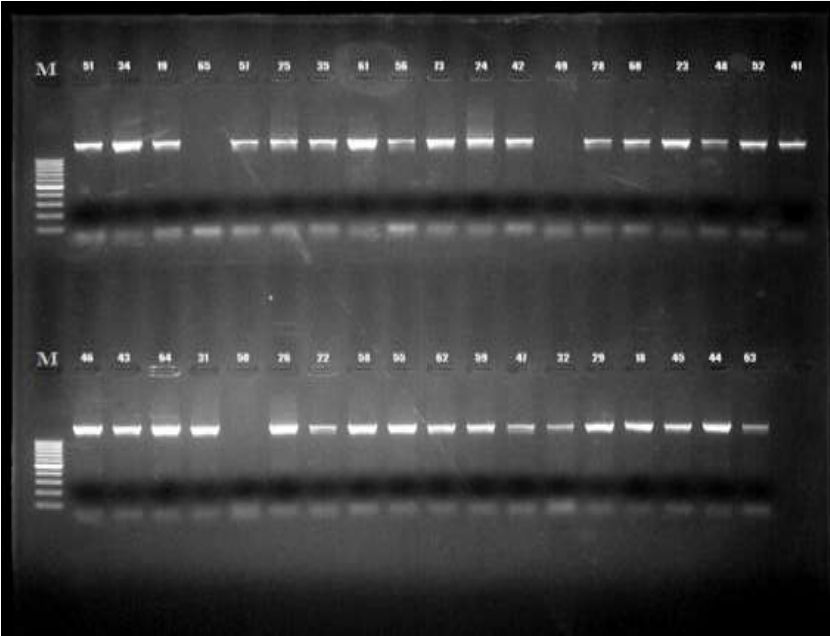
Şekil 4.12 2-75: LAB izolatlarının Msp I ile kesim sonucu oluşan fragmentler (M: Marker (50bp'lik)).



Şekil 4.13 2-75: LAB izolatlarının Hae III ile kesim sonucu oluşan fragmentler (M: Marker (50bp'lik)).

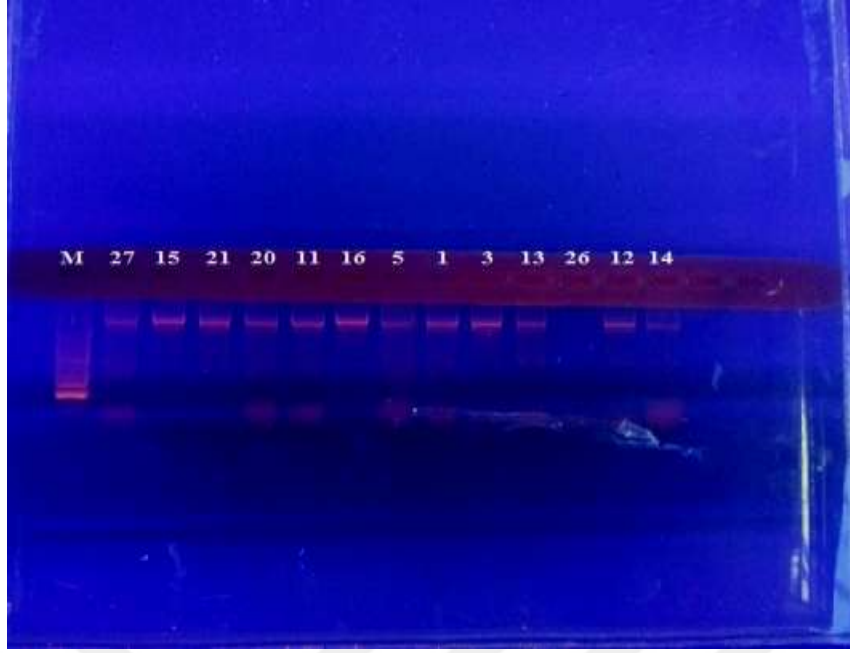


**Şekil 4.14** 2-75: LAB izolatlarının Hinf I enzimiyle kesim sonucu oluşan fragmentler (M: Marker (50bp'lik)).



**Şekil 4.15** 16S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu oluşan bant uzunlukları [M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)].





**Şekil 4.16** 16S rDNA bölgesinin PCR amplifikasyonu sonucu oluşan bant uzunlukları [M; marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)].

**Çizelge 4.6** 16S rDNA sekans analizi sonucunda elde edilen tanımlama sonuçları

Strain No	Sekans Sonucu	GenBank Accession No.
F1	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137352
F2	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	KM017400
F3	<i>Enterococcus sp.</i>	KP137353
F4	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	KM017401
F5	<i>Enterococcus faecalis</i>	KP137354
F6	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	
F7	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	
F8	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	
F9	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	
F10	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>	
F11	<i>Lactococcus lactis</i>	KP137351
F12	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137355
F13	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137356
F14	<i>Lactococcus lactis</i>	KP137357
F15	<i>Lactococcus garviae</i>	KP137358
F16	<i>Lactococcus garviae</i>	KP137359
F17	Tanımlanamadı	
F18	<i>Lactococcus garviae</i>	KP137317
F19	<i>Lactococcus garviae</i>	KP137318
F20	<i>Lactococcus lactis</i>	KP137360
F21	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137361
F22	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137319
F23	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137320
F24	<i>Vagococcus sp.</i>	KP137321
F25	<i>Vagococcus sp</i>	KP137322
F26	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137323
F27	Tanımlanamadı	

Çizelge 4.6 (Devam)

F28	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137324
F29	<i>Lactococcus lactis</i> sp <i>lactis</i>	KP137325
F30	<i>Lactococcus lactis</i> sp <i>lactis</i>	
F31	<i>Lactococcus lactis</i> sb. <i>lactis</i>	KP137326
F32	<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	KP137327
F33	<i>Lactococcus lactis</i> sp <i>lactis</i>	
F34	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137328
F35	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137329
F36	<i>Carnobacterium maltoramaticum</i>	KM017406
F37	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
F38	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
F39	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
F40	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	F17402
F41	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137330
F42	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137331
F43	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137332
F44	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137333
F45	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137334
F46	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137335
F47	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137336
F48	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137337
F49	Tanımlanamadı	
F50	Tanımlanamadı	
F51	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137338
F52	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137339
F53	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	F17403
F54	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
F55	<i>Lactococcus lactis</i> strain	KP137340
F56	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137341
F57	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137342
F58	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137343
F59	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137344
F60	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KP137345
F61	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137346
F62	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137347
F63	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137348
F64	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137349
F65	Tanımlanamadı	
F66	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	F17404
F67	Tanımlanamadı	
F68	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
F69	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	F17405
F70	<i>Carnobacterium maltoramaticum</i>	KM017407
F71	<i>Carnobacterium maltoramaticum</i>	
F72	<i>Carnobacterium maltoramaticum</i>	
F73	<i>Streptococcus parauberis</i>	KP137350
F74	Tanımlanamadı	

### 4.3. Tanılanan Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Potansiyellerinin Belirlenmesi

#### 4.3.1. LAB izolatlarının antibakteriyel (antagonistik) aktiviteleri

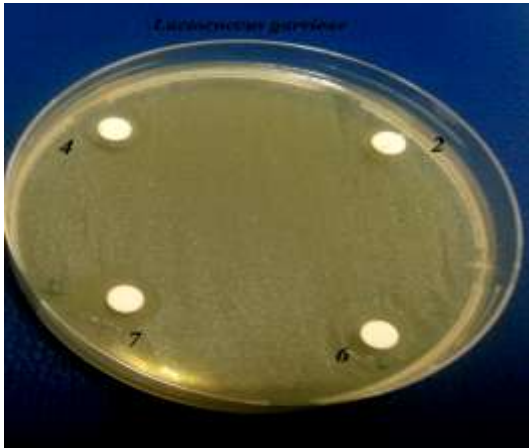
Laktik asit bakterilerinin *Salmonella typhimirium* (ATCC 14028), *Lactococcus garvieae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia ruckeri* ve *Escherichia coli* O157H7 patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkisi Bölüm 3.4.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. 75 bakteri izolatının belirtilen patojenlere karşı antagonistik etkileri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Bu strainlerden test edilen bakterielere karşı en yüksek antagonistik etkiye sahip olanlar F2, F4, F6, F7, F8, F9 ve F38 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.7 LAB İzolatlarının Antibakteriyel (Antagonizm) Aktiviteleri

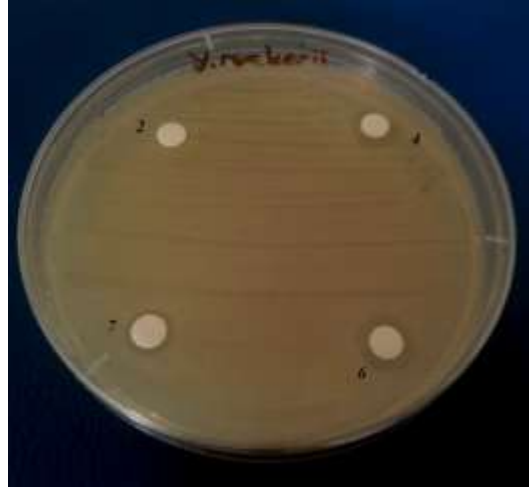
İzolat no	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Lactococcus garvieae</i> ATCC49156	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella typhimirium</i> ATCC14928
1	12	-	-	-	-
2	14mm	-	10	9	12
4	14mm	12	14	12	10
6	10	12	16	11	9
7	4	6	18	11	11
8	10	8	2	8	11
9	11	10	8	10	10
10	11	4	6	13	9
17	-	-	6	8	7
30	10	-	-	14	11
33	-	-	-	11	10
36	-	-	-	8	4
37	-	6	16	6	8
38	12	10	18	10	10
39	11	10	10	0	8
40	10	-	-	0	6
47	6	-	-	-	9
48	12	-	-	0	8
53	12	4	-	4	13
54	16	4	4	4	12
66	8	-	-	0	8
69	8	12	6	8	-
70	10	4	6	-	-
71	-	-	-	4	9
72	-	-	-	6	4
75	10	10	6	8	9
43	-	10	-	-	-
65	4	-	-	4	6
55	14	14	8	-	-
29	10	12	4	-	-
73	-	10	10	-	-
44	-	10	6	-	-

Çizelge 4.7 (Devam)

60	12			-	-
61	6	-	-	-	-
62	10	-	-	-	-
26	-	4	6	10	7
31	-	10	4	-	-
3	8	11	-	4	10
5	4			-	-
12	-	4	-	-	-
11	8	4	-	-	-
13	-			-	-
14	12	10	14	10	0
16	8	12	12	-	-
18	12	12	-	-	4
19	6	-	-	-	4
15	12	12	-	-	8
27	-	-	-	8	-
51	-	8	-	-	-
28	8	-	-	-	-
20	10	10	-	7	6
21	10	6	-	-	-
22	-	-	-	-	-
34	-	-	-	8	-
58	4	-	-	10	11
59	-			-	-
23	-			-	-
24	-			8	7
25	-			-	-
35	8	-	-	-	-
32	6	8	-	4	10
63	6	4	-	-	-
64	4	6	-	4	8
52	-	6	-	-	4
74	10	8	-	-	4
56	10	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	8
68	8	10	-	4	6



Şekil. 4.17 TSA' da 22°C'de 24 saat inkübe edilen LAB izolatlarının *L. garvieae* 'ya karşı antibakteriyel aktiviteleri.



**Şekil 4.18** TSA 'da 22°C'de 24 saat inkübe edilen LAB izolatlarının *Y. ruckeri*'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri



**Şekil 4.19** TSA' da 22°C'de 24 saat inkübe edilen LAB izolatlarının *Salmonella typhimurium*'a karşı antibakteriyel aktiviteleri.

#### 4.3.2. pH toleransı

İzolatların pH1 ve pH3'e olan toleransları Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. İzolatların pH'ya olan toleransları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. pH 1'e en yüksek toleransı F4, F36, F37, F38, F39, F40, F48, F68, F69 numaralı izolatlar gösterirken pH 3'te F72, F33 ve F17 izolatları hariç diğer izolatların hepsi tolerans göstermiştir.

Çizelge 4.8 İzolatların pH 1 ve pH 3'e olan toleransları

İzolat numaraları	pH 1			pH 3		
	0. h	3.h	%canlı sayısı	0. h	3. h	%canlı sayısı
F2	1.3x10 <sup>9</sup>	0	0	1.3x10 <sup>9</sup>	1.0x10 <sup>9</sup>	82
F4	1.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>5</sup>	4.1	1.0x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>6</sup>	50
F7	1.0x10 <sup>8</sup>	0	0	1.0x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>7</sup>	15
F8	1.3x10 <sup>9</sup>	0	0	1.3x10 <sup>9</sup>	5.3x10 <sup>8</sup>	40
F9	8.1x10 <sup>7</sup>	0	0	8.1x10 <sup>7</sup>	6.1x10 <sup>7</sup>	74
F10	2.4x10 <sup>8</sup>	0	0	2.4x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>	61
F17	2.1x10 <sup>9</sup>	0	0	2.1x10 <sup>9</sup>	0	0
F30	2.7x10 <sup>7</sup>	0	0	3.0x10 <sup>7</sup>	5.2x10 <sup>5</sup>	1.2
F33	3.6x10 <sup>8</sup>	0	0	3.6x10 <sup>9</sup>	0	0
F36	8.1x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>6</sup>	1.7	9.1x10 <sup>8</sup>	6.7x10 <sup>8</sup>	29
F37	9.0x10 <sup>8</sup>	4.4x10 <sup>6</sup>	1.9	9.0x10 <sup>8</sup>	6.7x10 <sup>7</sup>	7.4
F38	1.8x10 <sup>7</sup>	3.4x10 <sup>4</sup>	0.2	1.8x10 <sup>7</sup>	8.2x10 <sup>5</sup>	4.4
F39	2.1x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>	0.5	2.1x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>7</sup>	7.3
F40	2.5x10 <sup>9</sup>	3.6x10 <sup>7</sup>	1.4	2.5x10 <sup>9</sup>	5.8x10 <sup>8</sup>	22
F48	8.4x10 <sup>8</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>	28	8.4x10 <sup>8</sup>	8.4x10 <sup>8</sup>	48
F53	2.6x10 <sup>9</sup>	0	0	2.6x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	51
F54	3.2x10 <sup>9</sup>	0	0	3.2x10 <sup>9</sup>	2.1x10 <sup>9</sup>	46
F66	3.9x10 <sup>9</sup>	5.2x10 <sup>3</sup>	0	3.8x10 <sup>9</sup>	8.5x10 <sup>8</sup>	21
F68	3.8x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>2</sup>	0.42	3.8x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	39
F69	3.8x10 <sup>9</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	0.4	3.8x10 <sup>9</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>	65
F70	1.5x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>3</sup>	0	1.5x10 <sup>8</sup>	5.8x10 <sup>7</sup>	37
F71	3.4x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>6</sup>	0	3.4x10 <sup>9</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	40
F72	2.1x10 <sup>8</sup>	0	0	2.1x10 <sup>8</sup>	0	0
F75	7.6x10 <sup>9</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	0	7.6x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	28

#### 4.3.3. Safra Toleransı

Bakteri strainlerinin %0,15-0,3 safraya olan toleransları Bölüm 3.3.3'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. İzolatların safraya olan toleransları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Safraya en yüksek tolerans gösteren izolatlar F4, F9, F10, F14, F16, F18, F19, F22, F25, F39, F44, F48, F54, F55, F56, F66, F70 ve F75'tir. Genel olarak izolatların %0.15 safraya olan toleransı %0.3 'ten daha düşük bulunmuştur.

**Çizelge 4.9** İzolatların safraya olan toleransları (600nm’de okunan konsantrasyonlar)

izolat no	0.15_0	0.15_I	0.15_II	0.15_III	0.15_IV	0.30_0	0.30_I	0.30_II	0.30_III	0.30_IV
1	0.081	0.079	0.077	0.070	0.064	0.089	0,089	0,087	0,088	0,088
2	0.076	0.075	0.074	0.076	0.077	0.093	0.091	0.091	0,088	0.086
4	0.86	0.74	0.77	0.76	0.076	0.225	0.0220	0.220	0.198	0.198
6	0.066	0.087	0.070	0.072	0.075	0.091	0.087	0.085	0.080	0.074
7	0.105	0.104	0.100	0.89	0.77	0.097	0.097	0.096	0.095	0.095
8	0.063	0.062	0.065	0.070	0.078	0.101	0.98	0.97	0.96	0.90
9	0.156	0,133	0,111	0,104	0,108	0.166	0,146	0,121	0,11	0,108
10	0.165	0,129	0,107	0,095	0,093	0.175	0,152	0,122	0,123	0,113
11	0.084	0,077	0,099	0,078	0,079	0.086	0,086	0,086	0,083	0,081
12	0.102	0,099	0,088	0,091	0,093	0.103	0,101	0,098	0,095	0,096
13	0.078	0,077	0,078	0,074	0,076	0.087	0,082	0,078	0,08	0,081
14	0.190	0,164	0,149	0,147	0,147	0.174	0,151	0,138	0,14	0,14
15	0.101	0,095	0,084	0,089	0,091	0.109	0,102	0,09	0,095	0,102
16	0.158	0,157	0,157	0,15	0,152	0.182	0,168	0,143	0,151	0,147
18	0.163	0,169	0,163	0,153	0,147	0.164	0,148	0,142	0,137	0,132
19	0.158	0,224	0,214	0,199	0,214	0.168	0,152	0,15	0,144	0,139
20	0.181	0,147	0,124	0,117	0,121	0.162	0,139	0,123	0,113	0,115
21	0,103	0,097	0,099	0,095	0,094	0.095	0,088	0,092	0,089	0,086
22	0,096	0,099	0,096	0,098	0,09	0.103	0,095	0,102	0,093	0,099
23	0.134	0,124	0,125	0,125	0,118	0.121	0,131	0,115	0,112	0,111
24	0.086	0,09	0,089	0,091	0,089	0.071	0,073	0,073	0,071	0,069
25	0.185	0,166	0,163	0,154	0,148	0.189	0,177	0,174	0,174	0,118
26	0,176	0.175	0.174	0.172	0.170	0.085	0,174	0,183	0,165	0,15
27	0.099	0,095	0,091	0,101	0,083	0.100	0,097	0,096	0,094	0,094
28	0.090	0,097	0,082	0,088	0,091	0.080	0,085	0,084	0,079	0,083
29	0.173	0,138	0,124	0,123	0,119	0.163	0,131	0,114	0,114	0,115
30	0.202	0,163	0,151	0,152	0,138	0.184	0,157	0,145	0,143	0,126
31	0.090	0,082	0,081	0,075	0,078	0.086	0,091	0,084	0,08	0,083
32	0.087	0,087	0,081	0,083	0,083	0.088	0,088	0,086	0,084	0,085
33	0.105	0,102	0,105	0,105	0,102	0.090	0,09	0,089	0,092	0,087
34	0.163	0,151	0,145	0,145	0,133	0.181	0,168	0,161	0,17	0,158
35	0.167	0,149	0,152	0,142	0,14	0.176	0,162	0,158	0,156	0,151
36	0.086	0,089	0,085	0,086	0,083	0.088	0,082	0,098	0,082	0,083
37	0.158	0,147	0,146	0,144	0,137	0.167	0,16	0,158	0,156	0,153
38	0,192	0.192	0.191	0.189	0.185	0.162	0,162	0,142	0,142	0,13
39	0,161	0.162	0.163	0.164	0.166	0.146	0,144	0,127	0,119	0,117
40	0,151	0.150	0.150	0.146	0.145	0.132	0,131	0,118	0,115	0,112
41	0.126	0,116	0,12	0,115	0,115	0.120	0,117	0,111	0,11	0,106
42	0.116	0,114	0,11	0,106	0,107	0.124	0,121	0,111	0,123	0,114
43	0.123	0,121	0,113	0,114	0,109	0.109	0,115	0,11	0,109	0,109

**Çizelge 4.9 (Devam)**

44	0,123	0,121	0,113	0,114	0,109	0,109	0,115	0,11	0,109	0,109
45	0,108	0,106	0,108	0,095	0,095	0,112	0,115	0,103	0,1	0,102
46	0,112	0,107	0,107	0,086	0,103	0,098	0,094	0,088	0,086	0,092
47	0,124	0,118	0,138	0,116	0,117	0,108	0,146	0,224	0,103	0,098
48	0,139	0,139	0,136	0,135	0,134	0,140	0,139	0,132	0,133	0,126
49	0,091	0,098	0,094	0,089	0,087	0,089	0,088	0,086	0,085	0,09
50	0,091	0,098	0,094	0,089	0,087	0,089	0,088	0,086	0,085	0,09
51	0,100	0,1	0,117	0,16	0,218	0,092	0,091	0,105	0,136	0,184
52	0,086	0,085	0,087	0,084	0,082	0,084	0,088	0,084	0,089	0,082
53	0,172	0,173	0,175	0,176	0,178	0,063	0,162	0,156	0,154	0,15
54	0,198	0,161	0,159	0,159	0,146	0,174	0,163	0,16	0,155	0,159
55	0,155	0,151	0,151	0,148	0,141	0,143	0,148	0,143	0,141	0,138
56	0,136	0,13	0,129	0,123	0,124	0,148	0,148	0,141	0,138	0,14
57	0,140	0,137	0,134	0,129	0,129	0,151	0,139	0,139	0,139	0,136
58	0,084	0,088	0,089	0,089	0,083	0,085	0,089	0,088	0,087	0,087
59	0,085	0,09	0,09	0,084	0,089	0,070	0,075	0,077	0,071	0,072
60	0,087	0,086	0,08	0,084	0,084	0,091	0,090	0,089	0,087	0,087
61	0,137	0,126	0,126	0,116	0,111	0,129	0,12	0,118	0,118	0,115
62	0,121	0,115	0,115	0,113	0,111	0,116	0,11	0,103	0,101	0,101
63	0,151	0,142	0,135	0,132	0,128	0,141	0,133	0,129	0,13	0,123
64	0,121	0,118	0,116	0,109	0,11	0,134	0,133	0,126	0,132	0,126
65	0,145	0,133	0,132	0,128	0,123	0,146	0,134	0,135	0,125	0,124
66	0,17	0,169	0,166	0,165	0,163	0,170	0,168	0,161	0,157	0,153
67	0,158	0,157	0,156	0,158	0,157	0,156	0,155	0,149	0,148	0,146
68	0,181	0,154	0,152	0,146	0,145	0,162	0,157	0,151	0,149	0,148
69	0,144	0,137	0,144	0,129	0,127	0,150	0,142	0,141	0,138	0,136
70	0,163	0,163	0,162	0,161	0,160	0,156	0,154	0,142	0,143	0,141
71	0,143	0,129	0,123	0,113	0,112	0,147	0,137	0,135	0,12	0,122
72	0,145	0,128	0,124	0,127	0,117	0,163	0,146	0,136	0,129	0,127
73	0,117	0,115	0,121	0,114	0,108	0,133	0,135	0,124	0,12	0,12
74	0,158	0,162	0,158	0,144	0,143	0,164	0,159	0,153	0,145	0,148
75	0,171	0,162	0,169	0,159	0,158	0,185	0,182	0,180	0,181	0,183

**4.3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi**

Laktik asit bakterilerinin doxycycline (30 µg), enoxacine (10 µg), erythromycin (15µg), florfenicol (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg), enrofloxacin (5µg), oxytetracycline (30µg), chloramphenicol (30

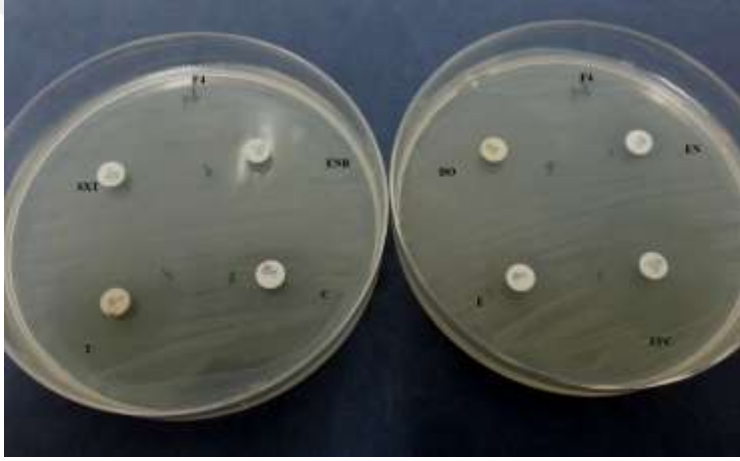




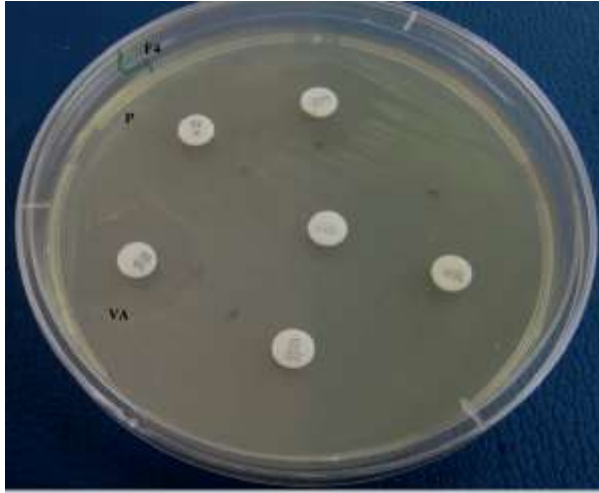
Çizelge 4.11 (Devam)

Izolât no	Do	En	E	F	STX	O	ENR	C	V	P
47	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
53	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
54	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
55	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
60	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
66	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
67	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
68	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S
69	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S
70	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
71	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
72	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
74	S	R	I	S	S	R	I	S	S	S
75*	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S

Do=Doxycycline, En=Enoxacin, E=Erithromycine, F= Florfenicol, STX: Trimethoprim, O: Oxytetracycline, Enr: Enrofloxacin, C: Chloramphenicol, V: Vancomycin, P: Penicilin (S:Duyarlı, R: Dirençli)



Şekil 4.20 22°C’de 48 saat inkübe *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (F4 numaralı izolat)’in antibiyotik duyarlılık testi.



Şekil 4.21 22°C’de 48 saat inkübe *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (F4 numaralı izolat)’in antibiyotik duyarlılık testi.

#### 4.3.5. Patojenite Testleri

Probiyotik potansiyele sahip olabilecek F4 numaralı izolatın (*Lactococcus lactis* subsp.*lactis* KM017401) taze saf kültürlerinden ml'sinde  $10^6$  canlı bakteri hücresi olacak şekilde süspansiyonları hazırlanmış olup 15 günlük adaptasyon süresi tamamlanmış balıklara intramüsküler olarak enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna ise sadece saf PBS enjekte edilmiştir (Aydın vd., 1997; Bricknell et al., 1999). Enjeksiyonu takip eden 20 gün içinde balıkların davranışları, klinik belirtileri ile ölen balıkların nekropsi sonunda klinik belirtileri kaydedilmiştir (Bölüm 3.3.6). Yapılan testler sonucunda F4 numaralı izolatın balıklar üzerinde herhangi bir patojenik bulgusuna rastlanmamıştır.

#### 4.3.6. Potansiyel probiyotikli yemle besleme denemesi

Denemede F4 numaralı *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* probiyotik adayı olarak kullanılmıştır. Çünkü bu tür probiyotik özellikleri yansıtan testlerin diğerlerine göre daha iyi sonuçlar vermesi ve aynı zamanda patojenite denemesinde balıklar üzerinde patojen olmamasından dolayı kullanılmıştır. Probiyotik denemesi Bölüm 3.4.7'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Deneme 28 gün olarak tasarlanmış olup 7 günde bir balıkların ağırlıkları ve boyları tespit edilmiştir (Şekil 4.22). Deneme sonunda ise kalan balıkların bağırsak florasındaki probiyotik bakteri varlığı için Bölüm 3.4.7.3'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir

(Şekil4.27).



**Şekil 4.22.** Besleme çalışması için kuluçkahaneye getirilen balıkların (a) boy ve kilo ölçümlerinin yapılması (b) ve tanklara yerleştirilmesi (c).

#### 4.3.7. Probiyotikli yemle beslenen balıklarda patojenle *in vivo* enfeksiyon

Probiyotikli yemle beslemenin 14. gününde kontrol grubu ve deneme grubundaki balıklar  $10^7$  (cfu/ml) oranında patojen içeren süspansiyonlarla enfekte edilmiştir. Lethal dozun belirlenmesi için kontrol ve deneme grubundaki balıklarda her gruptan 10 tane olacak şekilde  $10^4$  - $10^7$  (cfu/ml) oranında *Yersinia ruckeri* içeren 0,1ml süspansiyon ile enjekte edilmiştir deneme 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve minimal lethal doz  $10^7$  (cfu/ml) olarak belirlenmiştir (Giri et al.,2012). 20 günlük takip sonucunda ölen ve hayatta kalan balıkların yaşama oranları hesaplanarak hastalık açısından incelenmiştir (Çizelge 4.16).



**Şekil 4.23.** Besleme çalışmasının 14. gününde patojenle (*Y.ruckeri*) enfeksiyon denemesi

#### 4.3.8. Probiyotikli Yem Ve Kontrol Yemiyle Beslenen Balıklarda Büyüme

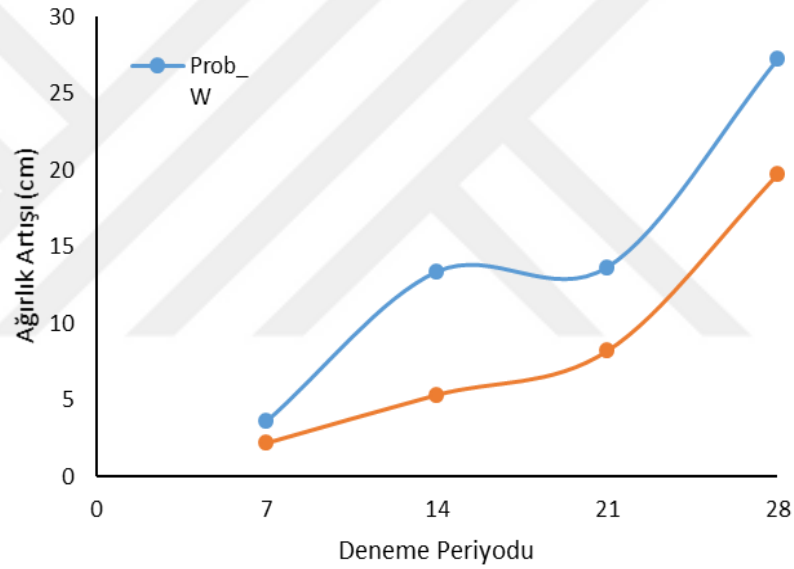
##### 4.3.8.1. Canlı ağırlık olarak büyüme

Bölüm 3.3.7’de anlatıldığı gibi yapılan besleme denemesinde kontrol ve probiyotik verilen gruplar günde 3 kez vücutlarının %3’ü oranında kontrol yem ve probiyotikli yemle beslenilmiştir. 7 günde bir ölçülen canlı ağırlık ortalamaları Çizelge 4.12 ve Şekil 4.24’de verilmiştir.

**Çizelge 4.12** Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlık ortalamaları

	Ağırlık kazancı (g)				
	Prob±SE	Cont.±SE	F	t	p
7. Gün	3.59±1.55	2.21±0.30	6.028	1.461	0.218
14. Gün	13.37±1.43	5.35±0.46	5.293	5.337	0.006
21. Gün	13.68±1.46	8.21±0.57	4.947	3.467	0.026
28. Gün	27.25±2.70	19.72±1.85	0.349	2.292	0.084

14. ve 21.günde farklılıklar istatistiksel olarak önemliyken ( $p<0,05$ ) 7. ve 28. günlerde farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.24** Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının canlı ağırlık olarak büyüme eğrisi

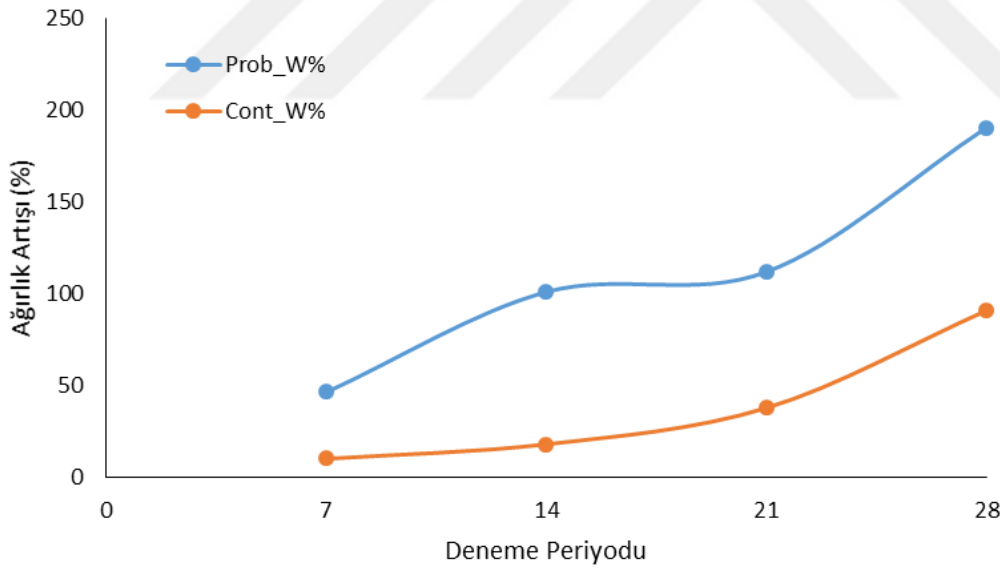
Başlangıç canlı ağırlık ortalamaları  $19\pm 22$  g olan balıklarda deneme sonunda en iyi büyüme probiyotik yemle beslenen grupta ( $27.25\pm 2.70$ ) olmuştur. Canlı ağırlık ortalamaları için yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre; 14. ve 21.günde probiyotikli yem ve kontrol yemiyle beslenen gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemliyken ( $p<0,05$ ) 7. ve 28. günlerde farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ( $p>0,05$ ).

#### 4.3.8.2. Canlı ağırlıkça oransal büyüme

Kontrol grubu ve kontrol grubu yemine farklı sayılarda probiyotik bakteri ilave edilen yemlerle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlıkça oransal büyüme değeri ve analiz sonuçları Çizelge 4.13 ve Şekil 4.25'te verilmiştir.

**Çizelge 4.13** Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlıkça oransal büyüme değeri (%)

	Oransal Ağırlık Artışı (%)				
	Prob±SE	Cont.±SE	F	t	p
7. Gün	46.56±10.48	10.28±1.45	5.967	3.425	0.027
14. Gün	101.15±2.60	18.16±5.12	2.857	14.435	0.000
21. Gün	112.03±12.67	37.97±1.84	9.758	5.784	0.004
28. Gün	190±13.02	91.01±6.40	2.243	6.862	0.002



**Şekil 4.25** Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre canlı ağırlıkça oransal büyüme eğrisi (%)

Canlı ağırlıkça oransal büyüme bakımından varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre; 7. 14. 21. ve 28. günlerde probiyotik yem ve kontrol yemiyle beslenen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,05$ ).

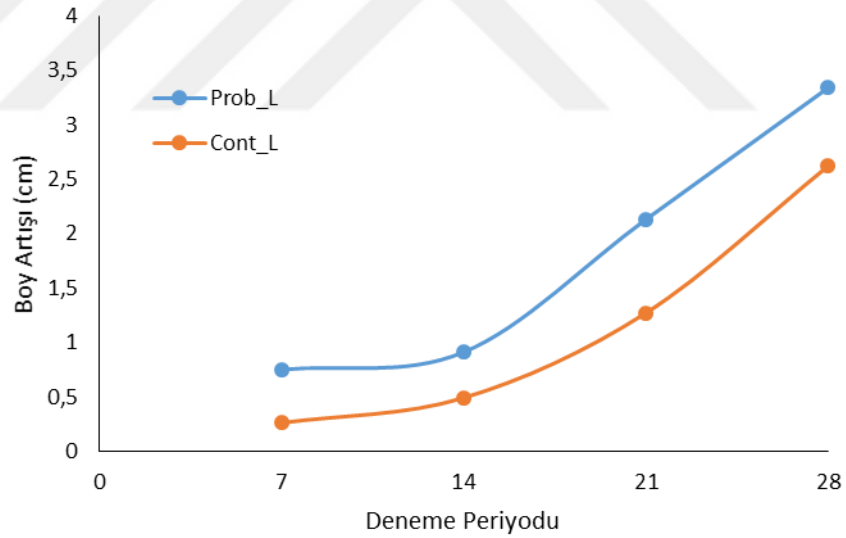
Deneme sonu itibariyle; canlı ağırlıkça oransal büyüme en yüksek 28.günde ( $190\pm 13.02$ ) olmuştur.

#### 4.3.8.3. Boyca büyüme

Kontrol grubu ve probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre total boy ortalamaları ve analiz sonuçları Çizelge 4.14 ve Şekil 4.26'te verilmiştir.

**Çizelge 4.14** Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle ve kontrol yemiyle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre total boy ortalamaları (cm)

	Boy kazancı (cm)				
	Prob $\pm$ SE	Cont. $\pm$ SE	F	t	p
7. Gün	0.75 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.04	1.064	10.808	0.000
14. Gün	0.91 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.10	3.716	3.841	0.018
21. Gün	2.13 $\pm$ 0.008	1.26 $\pm$ 0.04	8.113	17.372	0.000
28. Gün	3.33 $\pm$ 0.25	2.61 $\pm$ 0.17	1.040	2.356	0.078



**Şekil 4.26.** Probiyotik bakteri ilave edilmiş ve kontrol yemlerle beslenen alabalık gruplarının boyca büyüme eğrisi

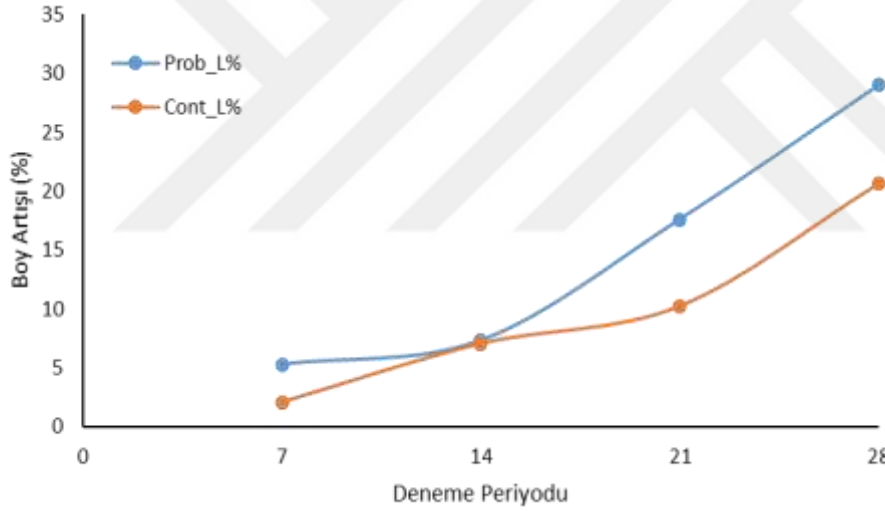
Total boy ortalamaları bakımından yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonucuna göre 7. gün, 14. gün 21. günde kontrol ve probiyotikli yemle beslenen gruplar arasındaki fark önemliyken ( $p < 0,05$ ); 28. günde istatistiksel farklılık önemsiz bulunmuştur ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3.8.4. Boyca oransal büyüme

Kontrol grubu ve probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre boyca oransal büyüme değerleri Çizelge 4.15 ve Şekil 4.27’te verilmiştir.

**Çizelge 4.15** Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen alabalık gruplarının dönemlere göre boyca oransal (OB)(%) değerleri

	Oransal Boy Artışı (%)				
	Prob±SE	Cont.±SE	F	t	p
7. Gün	5.29±0.91	2.06±0.29	5.443	3.366	0.028
14. Gün	7.33±0.13	0.49±0.10	0.115	40.395	0.000
21. Gün	17.60±0.46	10.23±0.09	9.812	15.428	0.000
28. Gün	29.00±2.58	20.63±1.19	0.911	2.933	0.043



**Şekil 4.27.** Probiyotik bakteri ilave edilmiş ve kontrol yemlerle beslenen alabalık gruplarının boyca oransal büyüme (%) eğrisi

Boyca oransal büyüme açısından yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre; 7. 14. 21. ve 28. günlerde boyca oransal artış kontrol grubu ve deneme grubu arasında önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur. Deneme sonu itibariyle boyca oransal karşılaştırıldığında en iyi büyüme 28. günde olmuştur.



#### 4.3.8.5. Yaşama oranı

Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle 14 gün boyunca beslenen ve 14. günde ml'sinde  $10^6$  bakteri hücresi (*Yersinia ruckeri*) olan süspansiyonlar intramüsküler olarak deneme grubuna 3 tekrarlı olacak şekilde verilmiştir ve 20 gün boyunca ölen ve hayatta kalan balıkların sağlık durumları takip edilmiştir. Alabalık gruplarında deneme süresince kontrol ve deneme grubu arasında istatistiksel olarak fark önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

**Çizelge 4.16**  $10^6$  oranında patojenle enfekte edilen kontrol ve deneme grupları arasındaki yaşama oranları

	Yaşama Oranları (%)				
	Prob±SE	Cont.±SE	F	t	p
20. Gün	50.00±5.57	53.33±3.33	0.400	-0.500	0.643



**Şekil 4.28** *Yersinia ruckeri* ile enjekte edilen deneme grubu balıkların genel sağlık görünümleri



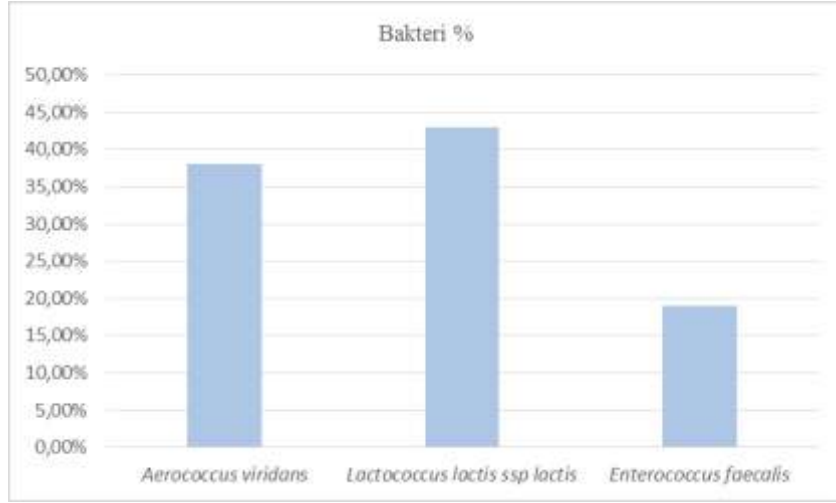
**Şekil 4.29** *Yersinia ruckeri* ile enjekte edilen kontrol grubu balıkların genel sağlık görünümleri



**Şekil 4.30** *Yersinia ruckeri* ile enjekte edilen kontrol grubu balığın genel sağlık görünümü

Deneme sonunda kontrol grubu ve probiyotikli yemle beslenen deneme grubunun balıklarındaki böbrek ve karaciğerden yapılan ekimlerde *Yersinia ruckeri* bakterisi izole edilmiştir fakat klinik bulgulara baktığımızda deneme grubu balıklarında deride kararma, hemoraji daha az görülürken kontrol grubu balıklarında genel hemoraji (böbrek, bağırsak, solungaç) karaciğerde solgunluk, bağırsakta sarı sıvı oluşumu ve deride kararma görülmüştür.

**4.3.8.6. Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemle besleme denemesi sonunda bağırsak florasının tespiti**



**Şekil 4.31** Deneme grubundaki alabalıkların bağırsak floraları

28 gün devam eden çalışmanın sonunda balıkların bağırsak floraları tespit edilmiştir. Bu tespitin amacı deneme grubuna verdiğimiz F4 numaralı izolatin varlığını tespit etmektir. Bunun için probiyotik ilave edilmiş yemle beslenen balıkların ve kontrol grubunun bağırsaklarından seçici besiyeri olan M17 ve genel besiyeri olan TSA'ya ekimler yapılmış olup toplamda 63 koloni seçilmiş ve saflaştırmaları yapıldıktan sonra gram boya, katalaz testi ve hücre morfolojilerine bakılarak API 20 STREP testle doğrulamaları yapılmıştır.

Yapılan ekimlerde deneme gruplarındaki balıkların bağırsağında probiyotik bakteri tespit edilmiş, ancak kontrol grubundaki balıklarda probiyotik bakteri görülmemiştir. Bunun sonucunda Şekil 4.27'de görüldüğü gibi bağırsak florasında baskın olarak *Lactococcus lactis ssp lactis* (% 42,9) olmak üzere *Aerococcus viridans* (% 38,1) ve *Enterococcus faecalis* (% 19) tespit edilmiştir.



**Şekil 4.32** Probiyotikli yemle beslenen balıktan izole edilen 4 numaralı izolatin API 20 STREP test sonucu

## 5. TARTIŞMA

Küreselleşme sürecinde, yenilebilen balıkların tüketiminin 2030 yılına kadar 165 milyon tona ulaşacağı projelerle ortaya konulmuştur. Bu yüzden alternatif balık türlerinin belirlenmesi ve balık beslemede kullanılan uygun yem içerikleri büyük önem arz etmektedir (Singh et al., 2008). Dünya nüfusunun artması ve gün geçtikçe doğal kaynakların azalması çağımız bilim adamlarını arayışlara itmiştir (Baylan ve ark., 2015). Artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacını karşılamak için yetiştiricilik üretimi arttırılmaktadır bu da beraberinde hastalık, uygun yem katkısının bulunamaması, besleme mekanizmaları ve hatta su kalitesinin kötüleşmesi gibi birçok olumsuzluğa sebep olmaktadır. Yetiştiricilikte kemoterapötik ajanların yüksek seviyede kullanılması hastalık kontrolünde alternatif güvenilir metotların aranmasına yol açmıştır. Antibiyotikler hayatta kalma oranını iyileştirse de bağırsak mikrobiyotasını değiştirmekte ve insan sağlığında tahmin edilemeyen uzun dönemli etkilere yol açabilecek dirençli bakteri popülasyonlarını indüklemektedir. Bu nedenlerden dolayı Avrupa Birliği antibiyotik kullanımını 2006 yılında yasaklamış ve bu yasak alternatif metotlara olan ihtiyacı daha da arttırmıştır. Bu noktada probiyotikler yetiştiricilikte birçok probleme (hastalık kontrolü, bağışıklık yanıtının arttırılması, konağın beslemesine yardımcı olması ve sindirim enzimi sağlaması) çözüm bulmak amacıyla geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Qi et al., 2009). Probiyotiklerin uygulama metodu açısından da çevre dostu oldukları düşünülmektedir. Dolayısıyla probiyotiklerin yoğun yetiştiricilikte sağlıklı bir bağırsak oluşturmak için balık yemi olarak kullanılması dünya çapında artmaktadır (Ige, 2013).

Bağırsak bakterilerinin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerine ilişkin kavram ilk kez Metchnikoff tarafından 1908 yılında ortaya konmuştur. Bu alanda yapılan çalışmalar, konsantre yararlı bakteri kültürleri ve bu kültürleri birçok canlının gıda maddesine ekleme çalışmaları, su ürünleri üretimi ve yetiştiriciliğinde kullanımı önem kazanmaktadır (Özdemir ve Tuna-Keleştemur, 2009). “Probiyotik”, Yunanca “önce (pro) –hayat (bios)” anlamına gelen bir sözcükten türemiştir (Lilly and Stillwell, 1965).

Bağırsak sisteminin kompleks mikrobiyal ekolojisi hem beslenmeyi hem de patojenlere karşı korunmayı sağlar ve bu kompleks çevreyle faydalı bağışıklık cevabının geliştirilmesi arasındaki ilişkileri modüle etmek için hayati önem taşır. Bu durum bağırsak mikrobiyotasının hayvan sağlığı üzerinde çok güçlü bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Probiyotikler de sağlıklı mikrobiyotanın üyeleridir bu yüzden antibiyotiklere ve diğer kimyasallara alternatif olarak kullanılabilirler (Balcazar et al., 2006c). Probiyotikler, bağırsağın mikrobiyal dengesini koruyarak konakçı hayvanda yararlı etkiler oluşturan, sindirim kanalındaki mikrofloranın ekolojik dengesini düzene koyan, konakçı mikroflora içerisindeki potansiyel patojen mikroorganizmaların üreyerek zararlı hale gelmelerini önleyen ve akuatik organizmaların yemden yararlanma oranını artırmak amacıyla yem rasyonlarına katılan bir grup canlı bakteri, maya kültürleri veya bu kültürlerin içerdiği biyolojik ürünlerdir. Sağlıklı bütün hayvanlar gibi balıkların bağırsak kanalındaki mikroorganizmalarda sabit ve denge halinde bulunmaktadır. Yararlı olan bu mikroorganizma türleri besin maddelerinin sindirim ve emilimine yardım ederek, enfeksiyonlara karşı vücudun direncini arttırmaktadırlar (Özdemir ve Tuna-Keleştemur, 2009).

Balıklarda ilk denenen probiyotikler karasal hayvanlar için hazırlanmış ürünlerdi (Gatesoupe, 1999). Fakat probiyotik verilmeden önce onun sucul ortamda yaşayıp yaşamayacağı konusu belirlenmelidir. Bunun için su ürünleri için kullanılacak probiyotikler sucul çevrelerden izole edilmelidir. Bu mikroplar *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Enteromonas*, laktik asit bakterileri özellikle *Bacillus* spp. ve mayalardır (Gatesoupe, 1999). Probiyotikler yeme canlı mikroorganizma olarak eklenerek sindirim sisteminde dengeli bir mikrofloral topluluk oluşturmak için de kullanılabilirler (Rengpipat, 2005). Probiyotikler aynı zamanda terapötik ajan olarak bazı çiftçiler tarafından antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaktadır (Fuller, 1989).

Yetiştiricilik üretimi tüm dünyada birçok balık türünün üretimi ile genişlerken, alabalık birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de balık üretimine önemli katkılar sağlamaktadır. Gökkuşluğu alabalığı denizden uzak iç kısımlarda yetiştiriciliğinin yapılabilmesi sayesinde önem kazanmaktadır. Toplam küresel salmonids türleri üretiminin 2007 yılında 2,2 milyon tona ulaştığı bildirilmektedir

(Can ve ark., 2011). Bu kadar yoğun üretimi yapılan bir tür olan gökkuşuğu alabalığında hastalıkların oluşması da kaçınılmazdır. Hastalıkları önlemek için günümüzde uygulanabilecek en sağlıklı ve ekonomik yöntem ise probiyotik uygulamasıdır. Araştırmamızda yukarıda bahsedilen önemlerinden dolayı tatlı su balıklarından laktik asit bakterisi izole edilip fenotipik ve moleküler olarak tanımlanmasının gerçekleştirilmesi, probiyotik potansiyellerinin araştırılması ve daha sonra da Türkiye’de yetiştiriciliği en çok yapılan gökkuşuğu alabalıklarına karşı potansiyel probiyotik olarak kullanılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak tatlı su balıklarından laktik asit bakterisi izole edilmeye çalışılmıştır. Bunun için laktobasiller için seçici besiyeri olan MRS agar (Arıcı ve ark., 2011; Perez- Sanchez et al., 2011; Ashraf and Shah, 2011), izolasyon şansını arttırmak için TSA (Gonzales et al.,2000; Perez-Sanchez et al.,2011), Streptokok ve laktokokların izolasyonu için M17 agar (Ashraf and Shah, 2011; Bulut, 2003) kullanılmıştır. Çalışmamızda laktik asit bakterilerinin tanımlanması öncelikle fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre yapılmıştır. Bunun için gram boyama, katalaz testi, oksidaz testi, glukozdan gaz oluşumu, farklı sıcaklıklarda büyüme, farklı NaCl konsantrasyonlarına tolerans, arginin hidrolizi, jelatin hidrolizi, indol üretimi, metil red, voges proskauer ve karbohidrat fermentasyon testleri gerçekleştirilmiştir (William et al., 2001; Kıran, 2006; William et al., 2001; Kıran, 2006; Cowan and Steel, 1970; Askarian et al., 2008; Arıcı ve ark., 2012; Harrigan and McCance, 1966; Başıyigit, 2004; Yıldız, 2011; Reginensi et al., 2013; Pundir et al., 2013; Junren et al., 2011). İzolatların fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre tanımlamaları Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (2009) ve Collins ve Lyne (1976)’ya göre yapılmıştır.

Çalışmamızda balıklardan izole edilen toplam 82 izolattan 7 tanesi gram (-) olup elenmiştir. Geriye kalan gram (+), katalaz negatif, oksidaz negatif olan 75 izolattan 4 tanesinin glukozdan gaz ürettiği (Çizelge 4.3), geriye kalanların ise üretmediği belirlenmiştir. Sıcaklık denemelerinde 4 °C sıcaklıkta 1, 12, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 51, 52, 54, 57, 58, 59, 60, 74 ve 75 numaralı izolatlarda çok az üreme olurken diğer izolatlarda üreme görülmüştür (Çizelge 4.3). 10°C sıcaklıkta 11, 12, 13, 17, 18, 19, 21, 22, 23 numaralı izolatlarda zayıf üreme olurken diğer izolatlarda üreme görülmüştür. 15°C sıcaklıkta tüm izolatlarda üreme görülmüştür. 45°C’de ise 10, 12, 13, 25, 26, 27,

28, 31, 33, 35, 42, 43, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 66, 67, 68, 69 numaralı izolatlarda zayıf üreme görülürken diğer izolatlarda üreme gözlenmiştir. Yapılan fenotipik testlere göre 1, 3, 11, 12 ve 13 numaralı izolatlar *Streptococcus intermedius*; 2, 6, 15 ve 16 *Lactobacillus salivarius*; 1, 14, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 43, 44, 45, 46 numaralı izolatlar *Lactococcus lactis*; 5 numaralı izolat *Enterococcus faecalis*; 7, 38 ve 39 numaralı izolat *Lactobacillus fermentum*; 17, 18 ve 19 numaralı izolatlar *L.lindneri*; 20 numaralı izolat *L.acidophilus*; 21 numaralı izolat *Aerococcus viridans*; 23 numaralı izolat *Pediococcus damnosus*; 33 numaralı izolat *Lactobacillus helveticus*; 34 ve 35 numaralı izolatlar *Lactococcus lactis cremoris*; 37 numaralı izolat *Lactobacillus brevis*; 40, 53, 54, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 74 ve 75 numaralı izolatlar *Lb.curvatus* ; 41, 42, 47 ve 48 *Lb.delbrueckii*; 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 ve 73 numaralı izolatlar ise *Streptococcus constellatus* olarak tanılanmıştır (Çizelge 4.5). Fakat daha sonra yapılan genotipik tanılamada geleneksel yöntemlerle moleküler yöntemlerin çoğunlukla uyuşmadığı görülmüştür (F4, F5, F14, F29, F30, F31, F32 hariç). F56 ve F59 arasındaki strainler ile F61 ve F64 arasındaki strainler genus düzeyinde tutarlı sonuç vermiştir.

Morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri belirlemeye yönelik olan klasik fenotiplendirme testleri her ne kadar halen kullanışlı ve vazgeçilemez yöntemler olsa da bir suşun karakteristik özelliklerini tam olarak yansıtamamakla beraber bu geleneksel kriterler oldukça zaman alıcı ve aynı zamanda ayırım gücü ve hassasiyetleri bakımından da şüphe uyandırıcıdır. Bununla beraber LAB'ların büyüme koşulları hücre morfolojisini etkileyebilmekte ve bazı durumlarda cins düzeyinde dahi tanılama işlemlerinde zorluk yaratmaktadırlar. Bu kriterler kaba bir tanımlama amacı için yeterli olsalar da net ve kesin bir identifikasyon amacına yönelik değildir. API 50CHL sistemi çok geniş aralığa sahip birçok LAB türlerinde hızlı bir şekilde fermentasyon profili sergilemektedir fakat tekrarlanabilir sonuçların olmaması sorun teşkil etmektedir. Standardize edilmiş bu klasik tanımlama metodu, halen rutin olarak kullanılmakla birlikte pahalı bir sistemdir. Bununla birlikte özellikle fazla sayıda bakteri izolatu tanımlanabilirken bu bakterilerin taksonomisine ilişkin bir sonuca gidilememektedir (Stiles et al. 1997).

Yaygın olarak kullanılan fizyolojik ve biyokimyasal testler bu bakteriler için pratikte ve uygulamada önemlidir, fakat şeker fermentasyonu gibi farklılık içeren ve stabil olmayan sonuçlar nedeniyle daha az tercih edilir olmuşlardır. Genellikle fizyolojik olarak birbiri ile ilgisi gözlenmeyen yakın akraba türlerin sayısındaki artış ile birlikte, bunların tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında moleküler teknikler ayırt edici yöntemler olarak tercih edilmeye başlanmıştır (Schleifer et al., 1995). Bundan dolayıdır ki, son yıllardaki çalışmalar LAB'ların mikrobiyal identifikasyonları için temeli genetik özelliklerin belirlenmesine dayalı olan moleküler metotların kullanımı yönündedir. İdentifikasyonda olumsuz sonuçlardan kurtulabilmek ve kesin tanımlama yapabilmek için moleküler identifikasyon teknikleri, fenotipik testlere alternatif olarak geliştirilmektedir. Ayrıca laktik asit bakteri suşları arasında ürüne ve üretime uygun olanların seçiminde bu moleküler biyolojik yöntemlerin gittikçe artan bir öneme sahip olacağı şüphesizdir. Fermentasyon değerleri, karbonhidrat kullanımları, laktik asit üretimi, peptidoglikan analizi gibi fizyolojik ve kemotaksonomik veriler içeren geleneksel yöntemler; birbirine akraba olan yakın türler arasında taksonomik açıdan kullanışsız yöntemlerdir. Fenotipik metotlar ile yapılan taksonomik çalışmalarda belirsiz sonuçların varlığı çalışmaları DNA-DNA hibridizasyonu, dizi analizi, gen problemlerinin kullanımı ve PCR gibi moleküler karakteristik metotlara yöneltmiştir. Gerçekçi, yüksek kapasiteli ve ayırım gücü güçlü sonuçların varlığı ile türler arası farklar tesbit edilebilmektedir. PCR'a dayalı metotlardaki gelişimler laktik asit bakterilerinin hızlı ve doğru şekilde tanımlanmasında yeni alternatifler oluşturmuştur. Moleküler biyoloji metotlarının kullanımı ile 16S rRNA'yı kodlayan sekansların karşılaştırılması taksonomik düzenlemelerde önemli yer tutmuştur (Stiles and Holzaphel., 1997).

Çoğaltılmış 16S rRNA'nın restriksiyon analizi (PCR-ARDRA) farklı mikroorganizmaların ayırımında kullanılmıştır. Bu yöntem ilk kez Vaneedhoutte (1992) tarafından *Comamonadaceae*'lerin tanımlanmasında kullanılmıştır. ARDRA ile PCR parmakizi hızlı özellikli, basit ve duyarlı bir metottur. Bu metot farklı habitatlardaki LAB'larda türler arasında çok detaylı bir tanımlama olanağı sağlamaktadır (Dicks et al., 1995). 16S rDNA geni dizilerinin kıyaslanması bakteri türlerinin tanımlanması ve sınıflandırılması için çok güvenli bir metottur. Çünkü bu genler her bakteri türünde çok sayıda kopyada bulunup yüksek oranda



KUmuştur. Dolayısıyla son yıllarda moleküler hedef olarak kullanımları artmıştır. ARDRA metodu gram pozitif spor oluşturmeyen bakterilerin basit ve hızlı tanımlanmasında yüksek bir ayırt edici güce sahiptir. Birçok yazar bu metodun *Lactobacillus* türlerinin ve probiyotik olarak kullanılacak laktik asit bakterilerinin tanımlanmasında kullanmıştır (Roy et al., 2001; Soto et al., 2010; Temmerman et al., 2004; Chen et al., 2005; Kopermsub and Yunchalard, 2010).

Örneğin Soto ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada buzağuların bağırsak mikrobiyal ekosistemindeki baskın Laktobasiller analiz edilmiştir. 42 laktik asit bakterisi HaeIII, MspI ve Hinf I restriksiyon enzimleri ve 16S r DNA gen dizisi kullanılarak ARDRA tekniği ile analiz edilmiştir. ARDRA taraması ile 42 izolat arasından 9 tane unik model saptanmıştır. 29 izolatın hepsinde aynı model görülmüştür. Sonuçta ARDRA tekniğinin kompleks ekosistemlerden izole edilen bakteri türlerinin ve yakın grupların tanılmasında sağlıklı bir metot olduğu belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada, Michel ve arkadaşları (2007), balıkların doğasını ve farklı balıklarda bulunan LAB gruplarına ait bakterileri tanılamak için farklı orijinlerden gelen 57 izolatı çalışmış ve amplifiye rRNA gen restriksiyon analizini (ARDRA) kullanılarak 22 tip strainle kıyaslama yapmışlardır. Araştırmacılar CfoI, Sau3A, HaeIII, HpaII, MboII, DraI, SmaI enzimlerini kullanarak oluşturdukları ARDRA profillerine bakıp 12 ayrı grup tasarlamış ve bunları *sodA* ve 16S rRNA gen dizilemesiyle doğrulamıştır. Oluşturulan bu gruplar: *Lactococcus raffinolactis*, *L.garvieae*, *Lactococcus lactis*, *S.iniae*, *S.dysgalactiae*, *S.parauberis*, *S.agalactiae*, *Carnobacterium* spp. *Vagococcus fluvialis* ya da yeni tanımlanan *V.carniphilus*, *V.salmoninarum*, ve *Aerococcus* spp'yi temsil edip ayırt edilemeyen *Enterococcus* benzeri *Enterococcus faecium* grubunu kapsamaktadır. *L.lactis* ve *L.raffinolactis* kümelerinin birçok balığın kommensali olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bir diğer çalışmada Balcazar ve arkadaşları (2006a), 16S rRNA geninin değişken bölgelerinin PCR amplifikasyonunu kullanarak laktik asit bakterilerini izole etmişlerdir. Bu çalışmada sağlıklı alabalıkların bağırsak mikrobiyotasından 13 tane laktik asit bakterisi izole edilmiştir. 16S r RNA geninin 500bp'lik kısmı amplifiye edilip V1 ve V2 değişken bölgelerini içeren 272 bp'lik bölgelerin dizi analizi yapılmıştır. İzole edilen laktik asit bakterileri *Carnobacterium maltoramaticum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* olarak

tanılanmıştır. Bu metod laktik asit bakterilerinin tanılanması için basit, hızlı, spesifik ve düşük maliyetli olarak tanılanmıştır.

Yukarıda belirtilen sebeplerle araştırmamızda moleküler identifikasyon için ilk aşamada fenotipik testlere göre laktobasil olarak tanılanan 25 izolatın (F2, F4, F6, F7, F8, F9, F10, F17, F30, F33, F37, F38, F39, F40, F48, F53, F54, F66, F68, F69, F75, F36, F70, F71 ve F72) kesin tanısı için bu izolatlardan elde edilen genomik DNA'lerden laktobasiller için türe spesifik Lacto 16S -F ve Lacto 16S -R primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta 216 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.11). Kesin teşhis için bu 25 izolatın 16S rRNA'sı 27 -F ve 1492 -R üniversal primerleriyle çoğaltılarak restriksiyon enzimler olan HaeIII, Msp 1 ve Hinf 1 ile kesilerek oluşan fragmentler incelenmiştir (Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14). Bu fragmentlerden benzer profillere sahip olanlar seçilerek gruplandırılmıştır. 3 enzim kesimi sonucunda 3 tane grup oluşturulmuştur. Bu gruplardan **1.de** F2, F4, F6, F7, F8, F9, F10, F30, F33, F37, F38, F39, F40, F48, F53, F54, F66, F68, F69 ve F75, **2.de** F17, **3.de** F36, F70, F71 ve F72 numaralı izolatlar olmak üzere oluşturulmuştur. Bu 3 grup arasında görsel olarak bakıldığında çok küçük farklılıklar olduğundan, bu gruplardan temsili olarak F2, F4, F36, F40, F53, F66, F69, F70 ve F17 her grubu temsil edecek şekilde sekans analizine gönderilmiştir. Bu strainlerin accession numaraları şöyledir: *Lactococcus lactis* strain F2, KM017400; *Lactococcus lactis* strain F4, KM017401; *Lactococcus lactis* strain F40, F17402; *Lactococcus lactis* strain F53, F17403; *Lactococcus lactis* strain F66, 17404; *Lactococcus lactis* strain F69, 17405; *Carnobacterium maltoramicum* strain F36, KM017406; *Carnobacterium maltoramicum* strain F70, KM017407. Sekans analizi sonucunda bu 25 izolattan 1 tanesi (F17) tanımlanamamıştır. Tanımlanan 24 strainden 19 tanesi *Lactococcus lactis*, 4 tanesi *Carnobacterium maltoramicum* ve 1 tanesi de *Streptococcus parauberis* strainini içermektedir. Laktobasillere özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonuçları fenotipik test sonuçlarını desteklemiştir. Daha önce fenotipik testlere göre laktokok olarak tanımlanan 3 izolat da bu primerlerle laktobasil olarak tanımlanmıştır. Fakat ARDRA sonucu elde edilen sekansa gönderilen örnekler fenotipik test ve PCR sonuçlarını desteklememiştir. Bu sonuçlar seçilen primerlerin laktobasillere özgü olmadığını göstermektedir. Gerçekten de

NCBI'daki *Lactobacillus* and *Lactococcus* genuslarının 16S rDNA'sı için belirlenen bölgeler %84 oranında benzerlik göstermektedir dolayısıyla seçilen primerler *Lactococcus* genusundaki aynı bölgeyi çoğaltabilir. Geriye kalan strainlerin moleküler teşhisi için üniversal primerler olan 27-F ve 1492-R primerleri kullanılarak genomik DNA'ları amplifiye edilmiş ve PCR ürünleri sekansa gönderilerek tanılamaları gerçekleştirilmiştir. Genotipik tanılama sonucunda; F18 no'lu örnek *Lactococcus garvieae* (accession no KP137317), F19 *Lactococcus garvieae* (KP137318), F22 örnek *Streptococcus parauberis* (KP137319), F23 *Streptococcus parauberis* (KP137320), F24 *Vagococcus* sp. (KP137321), F25 *Vagococcus* sp (KP137322), F26 *Streptococcus parauberis* (KP137323), F28 *Streptococcus parauberis* (KP137324) F29 *Lactococcus lactis* sp. *lactis* (KP137325), F31 *Lactococcus lactis* sp.*lactis* (KP137326), F32 *Lactococcus lactis* subsp. (KP137327) F34 *Streptococcus parauberis* (KP137328), F35 *Streptococcus parauberis* (KP137329) F41 *Streptococcus parauberis* (KP137330), F42 *Streptococcus parauberis* (KP137331) F43 *Streptococcus parauberis* (KP137332), F44 *Streptococcus parauberis* (KP137333), F45 *Streptococcus parauberis* (KP137334), F46 *Streptococcus parauberis* (KP137335) F47 *Streptococcus parauberis* (KP137336), F48 *Streptococcus parauberis* (KP137337) F51 *Streptococcus parauberis* (KP137338), F52 *Streptococcus parauberis* (KP137339) F55 *Lactococcus lactis* (KP137340), F56 *Streptococcus parauberis* (KP137341) F57 *Streptococcus parauberis* (KP137342), F58 *Streptococcus parauberis* (KP137343) F59 *Streptococcus parauberis* (KP137344), F60 *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (KP137345) F61 *Streptococcus parauberis* (KP137346), F62 *Streptococcus parauberis* (KP137347) F63 *Streptococcus parauberis* (KP137348), F64 *Streptococcus parauberis* (KP137349) F73 *Streptococcus parauberis* (KP137350), F11 *Lactococcus lactis* (KP137351) F1 *Streptococcus parauberis* (KP137352), F3 *Enterococcus* sp. (KP137353) F5 *Enterococcus faecalis* (KP137354), F12 *Streptococcus parauberis* (KP137355) F13 *Streptococcus parauberis* (KP137356), F14 *Lactococcus lactis* (KP137357) F15 *Lactococcus garviae* (KP137358), F16 *Lactococcus garvieae* (KP137359) F20 *Lactococcus lactis* (KP137360), F21 *Streptococcus parauberis* (KP137361) olarak tanılanmışlardır. Dolayısıyla daha önce de ; Temmerman et al. (2004); Miljković-Selimović et al. (2009) ;U.Bush and H.Nitschko (1999); Kıran ve Osmanoğlu

(2011) tarafından belirtildiği gibi moleküler metotlar fenotipik metotlardan daha güvenilir olup daha kesin sonuçlar vermiştir.

Moleküler teşhisten sonra araştırmamızdaki bir diğer aşama olan tanımlanan laktik asit bakterilerinin probiyotik potansiyellerinin araştırılması gerçekleştirilmiştir. Laktik asit bakterilerinin potansiyel probiyotik olması için aranan ilk özelliklerden biri antagonistik aktiviteye sahip olmalarıdır (Chemlal-Kherraz et al., 2012; Balcazar et al., 2006b; Jini et al., 2011; Zapata and Lara-Flores, 2013) bunun için 75 LAB strainin *L. garvieae* ATCC 49156, *E. coli* 0157, *S. typhimirium*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *Yersinia ruckeri*'ye karşı antagonistik etkileri test edilmiştir. LAB strainlerinin antagonistik aktivitelerine baktığımızda; F7, F37 ve F38 numaralı strainler *L. garvieae* ATCC 49156'ya en yüksek antagonistik aktiviteyi göstermişlerdir. F4, F10, F30 ve F38 *E. coli* 0157: H7'ye, F2, F4, F7, F8, F9, F33, F38, F53 ve F54 *S. typhimirium*'a F2, F4, F6, F8, F9, F10, F30, F38, F39, F40, F48, F53, F54, F70 ve F75 *P. aeruginosa* ATCC 27853'ye ve F2, F6, F9, F38, F39, F68, F69 ve F75 *Yersinia ruckeri*'ye karşı antagonistik etki göstermişlerdir.

Antagonistik aktiviteyle ilgili birçok çalışma mevcut olup Balcazar ve arkadaşları (2006b) salmonidlerden izole edilip tanımlanan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei* ve *Carnobacterium maltaromaticum* strainlerinin *Aeromonas* türlerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla bu sonuçlardan bu strainlerin yetiştiricilikte biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabilirliklerini göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada G.Sica ve arkadaşları (2010) yürüttükleri çalışmada Doğu Arjantin körfezindeki nehirde ve balıklarında bulunan laktik asit bakterilerinin biyoçeşitliliğini analiz edip patojenlerine karşı antagonistik etkisine bakmışlardır. Toplamda 21 laktik asit bakterisi izole etmişlerdir. 16S rDNA analizlerine göre izolatlar *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Weissella* olarak tanımlanmışlardır. Antagonistik aktivite *Listeria monocytogenes*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ve *Lactococcus garvieae* patojenlerine karşı denenmiştir. Çalışmada 20 strainin *A.salmonicida*'ya karşı antagonistik etki gösterdiği belirtilmiştir. Antagonistik aktivite test sonuçları Çizelge 4.7'de

verilmiştir buna göre bu strainlerden test edilen bakterielere karşı en yüksek antagonistik etkiye sahip olanlar F2, F4, F6, F7, F8, F9 ve F38 olarak tespit edilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin potansiyel probiyotik olma özelliklerinden bir diğeri antibiyotik duyarlılık testidir. Laktik asit bakterilerindeki antibiyotik dirençliliği ya da duyarlılığı strain ve izolasyon kaynağına bağlı olarak çok değişkenlik göstermektedir (Salminen et al., 1998). Şimdiye kadar yürütülen çalışmalarda (Coppola et al., 2005; Kim and Austin, 2008; Chemlal-Kherraz et al., 2012; Allameh et al., 2012) balıklara antibiyotik verildiğinde yardımcı ve faydalı mikroorganizmalar olan antibiyotik dirençli probiyotiklerin bağırsak sisteminde uzun süre kalarak bağırsak sisteminin hızla iyileşmesine yardımcı olabildiklerini belirtmişlerdir; bu yüzden bu mikroorganizmaların dirençliliği avantaj olabilmektedir. Antibiyotik dirençliliğin bir diğeri anlamı antibiyotik tedavisi gerektiğinde probiyotiklerin tedavi amaçlı verilebilmesi anlamına gelmektedir (Chemlal-Kherraz et al., 2012; Balcazar et al., 2006; Jini et al., 2011; Zapata and Lara-Flores, 2013). Antibiyotik dirençlilik test sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir. Çalışılan örneklerden sadece F8, F48 ve F60’ın test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. En yüksek antibiyotik dirençliliği Enoxacin, Oxytetracycline ve Chloramphenicol’a karşı bulunmuştur. Tüm strainler Vancomycin’e duyarlı bulunmuştur. 70 ve 72 numaralı izolatlar hariç tüm strainler penisiline duyarlı bulunmuştur. Bulduğumuz bu sonuçlar Mourad ve Nour-Eddine,(2006); Kim and Austin (2008) tarafından yürütülen çalışmayla uyumlu bulunmuş olup Sanchez et al (2011) ile uyuşmamaktadır bunun nedeninin laktik asit bakteri türlerinin ve izolasyon kaynaklarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Laktik asit bakterilerinin potansiyel probiyotik olma özelliklerinden bir diğeri pH’ya olan toleranslarıdır. Probiyotik olarak kullanılacak bir mikroorganizmanın, sindirim sisteminden geçişi sırasında canlı kalabilmesi zorunludur. Bu nedenle lizozim başta olmak üzere, ağız boşluğunda bulunan enzimlere dayanıklı olması ve midenin gastrik ortamından (pH 1,5-3,0) büyük ölçüde etkilenmemesi gerekmektedir. Bu nedenle probiyotik mikroorganizma seçiminde ilk aranması gereken kriter suşların asit dirençleridir. Sindirim

borusuna geçmeden önce bakterilerin mide asiditesine dayanmaları gerekmektedir. Bu durum, bakterilerin konağın bağırsağında kolonize olmasının ve metabolik aktivitelerinin birincil koşuludur (Nguyen et al., 2007; Kim and Austin., 2008; Allameh et al., 2012). Bağırsak sistemine ulaşmadan önce probiyotik bakterilerin pH'nın 1,5-3'lere kadar düşen mide asiditesine dayanmaları gerekmektedir bu asiditeye tolerans probiyotik bakterilerin bağırsağa ulaşip orda kolonize olmasına ve bağırsak sisteminde dengeli bir bağırsak mikroflorası oluşturulmasına yardım etmesini sağlamaktadır (Tambekar ve Bhutada, 2010), Düşük pH bağırsak sistemine giren bakteriler için efektif bir bariyer sağlamaktadır (Holzapfel et al., 1998). Çalışmamızda mide asiditesi dikkate alınarak 1'den 3'e kadar değişen asiditeler denenmiştir. pH tolerans test sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. pH 1'de örneklerin çoğunda üreme gözlenmezken pH 3'te izolatların çoğunda üreme gözlenmiştir. pH 3'te en yüksek üreme F2, F4, F8, F9, F10, F48, F53 ve F69 numaralı izolatlarda görülmüştür (Çizelge 4.8). Yapılan test sonuçları Allameh ve arkadaşları (2012); Tambekar ve Bhutada (2010); Perez ve arkadaşları (2011); Arıcı ve arkadaşları (2011) taafından yürütlen çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Laktik asit bakterilerinin probiyotik etkileri gram negatif patojen bakterileri inhibe eden safra tuzları gibi deterjanlarla kombine halde bulunan mikroçevrelerde üretilen laktik asitle alakalı olabilmektedir (Stiles and Holzapfel, 1997). Safra tuzu laktik asit bakterilerinin bağırsak sistemindeki canlılığını dolayısıyla konağın sağlığını etkileyen önemli bir faktördür. Safra tuzları konağın ince bağırsağındaki bakterilerin kolonizasyonu ve metabolik aktivitesi için gereklidir. Bu laktik asit bakterilerinin ince bağırsağa ulaşip kolonize olmasını ve bağırsak mikroflorasının dengede kalmasını sağlar. (Tambekar and Bhutada, 2010). Bakterilerin safra tuzuna dirençliliği onların safra tuzu hidrolazları (enzim) üretmesiyle ilgili olabilir. Safra tuzu enzimi safra tuzları asitlerini ayırarak bu enzimi üreten bakterileri konjuge safra tuzlarının toksisitesinden korur. Dekonjuge safra tuzları benzer konjugeleriyle kıyaslandığında çözünürlüğü düşürüp deterjan aktivitesini azaltarak bağırsaktaki bakteriler üzerinde daha az toksik olmasını sağlar. İnce bağırsakta salgılanan safra hücre membranındaki yağ asitlerinin ve lipidlerin önemli bileşenlerini yıkarak bakterilerin hayatta kalma oranını azaltır. Bu modifikasyon sadece hücre geçirgenliği ya da yaşama gücünü değil aynı

zamanda membranla çevresi arasındaki etkileşimi de etkileyebilir. Safra tuzuna direnç probiyotik strainlerin belirlenmesinde önemli bir kriterdir (Boke et al., 2010). İzolatların farklı konsantrasyonlardaki (%0.3 ve 0.15) safra tuzu bulunan besiyerinde gelişmeleriyle ilgili sonuçlar Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. İzolatlar genel olarak %0.3'e daha fazla tolerans gösterirken, %0.15'lik safra tuzu varlığında daha az gelişme göstermişlerdir. Fuller (1992) safra tuzlarının düşük konsantrasyonlarda bile (in vitro) mikroorganizmaları inhibe ettiğini bildirmektedir. Aynı şekilde Gilliland ve arkadaşları (1984) da safra tuzlarının %0,3'lük konsantrasyonunu mikroorganizmaların bu tuzlara karşı direncinin belirlenmesinde kritik konsantrasyon olarak kabul etmektedir.

Yetiştiricilikte probiyotik kullanımı, kuluçka performansının geliştirilmesi, büyüme performansı, bağışıklık yanıtının uyarılması ve hastalıklara direncin artırılması ve hatta kuluçkadan birkaç gün sonra larvanın hayatta kalması üzerinde etkili olabilir. Yapılan çalışmalarda *Enterococcus faecium*'un ticari preparasyonunun İsrail sazanının ve atbalığının büyüme ve verimini geliştirdiği görülmüştür (Ringo, 2004). Yine çipura bağırsağından izole edilen *Lactobacillus fructivorans*'ın bağırsak kolonizasyonunu etkileyip larva ve yavrunun ölüm oranını azalttığı ve kronik pH stresine toleransı geliştirdiği gözlemlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada, sazanların laktik asit bakteri karışımıyla beslendiğinde (*Streptococcus faecium* M74, *E.faecium* PDFM ve *E.faecium* SF68) 14 gün sonra ortamdaki *E.coli* bakterisini azalttıkları ve *Clostridium* genusunu ise tamamiyle elemine ettikleri gözlenmiştir (Ringo 2004). Yeme laktik asit bakteri ilavesinin aynı zamanda alabalıklardaki yüksek immünoglobulin seviyesini indüklediği görülmüştür. İmmünoglobülün ise insan ve hayvanlardaki hastalıklara karşı korunmayı sağlamaktadır (Tukmechi et al., 2007). Probiyotiklerin bu etkilerinin bağırsak mikrobiyal dengesinin düzeltilmesi ve gıda alımını hızlanmasını sağlayan patojen floranın azaltılmasıyla sağlandığı düşünülmektedir. Balık ölüm oranının azalması Vendrell et al. (2008) tarafından da bildirilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* CLFP196 ve *Lactobacillus plantarum* CLFP 238 alabalıklara  $10^7$ cfu g<sup>-1</sup> oranında 30 gün boyunca oral yolla verildiğinde *Lactococcus garviae*'yle mücadele ettirildiğinde mortaliteyi %78'den %46-54'lere düşürdüğü gözlemlenmiştir. Gökkuşuğu alabalıklarında *Carnobacterium maltaromaticum* strain B26 ve *C.divergens* strain B33 14 gün boyunca  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>

oranında verildiğinde ve *A.salmonicida* ve *Y.ruckeri*'yle mücadele ettirildikten sonra bu türlere karşı koruma sağladığı gözlenmiştir.

Taoka ve arkadaşları (2006) canlı probiyotiklerin *Oreochromis niloticus* tilapyasına verdiklerinde nonspesifik bağışıklık yanıtını lizozim aktivitesi, nötrofil göçü ve *Edwardsiella tarda* enfeksiyonuna karşı dirençliliği sağlayan bakterisidal aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir. Fuller (1989), balık yemine probiyotik eklemenin yemdeki antibiyotik ve sentetik kimyasalların kullanımını azaltacağını belirtmektedir. Bu da probiyotiklerin balık çiftliklerindeki kullanımını yaygınlaştırmaktadır. Probiyotiklerin büyümeyi arttırmadaki rolünün besin sindiriminin arttırmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmalar mideden geçtikten sonra bağırsakta kolonize olarak büyüme için şekerlerin büyük bir kısmını kullanırlar ve amilaz, proteaz ve lipaz gibi sindirim enzimleri üreterek büyüme ve sindirim proseslerinde öncül olarak rol alırlar.

Faydalı bakterilerin patojenlerle rekabet yoluyla yer değiştirmesi antibiyotiklere alternatif olarak yetiştiricilik endüstrisinde kabul görmüştür (Moriarty, 1990; Nikoskelainen et al., 2003). Probiyotikler sindirim sistemindeki potansiyel patojenlerin oluşumunu genelde antibiyozis, besin ya da yer için rekabet hatta mikrobiyal metabolizma seçilimi ve konak bağışıklığının uyarılmasıyla yaparlar (El-Haroun et al., 2006).

Probiyotiklerin sucul organizmalar ve çevre üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar mevcuttur. Sakai ve arkadaşları (1995) *Clostridium butyricum* bakterisinin gökkuşağı alabalığına oral yolla verildiğinde vibriosise direnci lökositlerin fagositik aktivitesini arttırarak sağladığı bildirilmişlerdir. Yang ve arkadaşları (2010) yürüttükleri çalışmada çubuk şekilli laktik asit bakterilerinin (MM1 ve MM4 strainleri) hidrojen peroksit ve bakteriosin benzeri bileşenler sentezleyerek gram negatif patojenler *Vibrio metschnikovii*, *V. harveyi* ve gram pozitif patojen olan *Staphylococcus aureus*'a karşı çok güçlü bir inhibitör etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Mocanu ve arkadaşları (2013), probiyotiklerin alabalıklar üzerindeki etkisine büyüme performansı ve hemotolojik profillerine bakarak incelemişlerdir.



*B. licheniformis* ve *B. subtilis* karışımından ( $V1:22.4 \times 10^9$ ,  $V2:38.4 \times 10^9$  ve  $V3:70.4 \times 10^9$  cfu  $g^{-1}$ ) oluşan yemleri balıklara vermişlerdir. Ağırlıkları  $101.96 \pm 2.26g$  olan balıkları günde 3 kez vücut ağırlıklarının %3'ü ile 4 hafta boyunca beslemişlerdir. Besleme sonunda büyüme performansı, yem kullanımı ve genel sağlık durumları incelediklerinde, en iyi büyümenin  $22.4 \times 10^9$  konsantrasyonunda bakteri içeren gruplarda olduğunu belirtmişlerdir. Hemotolojik göstergelerden hemoglobin, kırmızı kan hücresi ve hematokritlere bakıldığında farklılıklar görülmüştür fakat büyüme ve fizyolojik parametreler açısından bu farklılığın yüksek sayıda probiyotikle ilişkili olmadığını bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Noveirian ve Nasrollahzadeh (2012), biyojen probiyotiklerin *Cyprinus carpio*'nun büyüme performansı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bunun için ( $65 \pm 3.5g$ ) ağırlığında 72 adet sazan yavrusu kullanmışlardır. 60 günlük besleme denemesinde probiyotik yem alan balıkların kontrol grubuyla kıyaslandığında canlı ağırlık kazanımı, spesifik büyüme oranı, protein dönüşüm oranı, yem dönüşüm oranı ve hayatta kalma oranları arasında önemli bir fark olduğunu tespit etmişlerdir. Deneme sonunda yem verimi ve büyüme performansı açısından en iyi verim % 0.3 Biogen probiyotikle beslenen gruplarda tespit etmişlerdir.

Diğer bir çalışmada, Heo ve arkadaşları (2013) probiyotik *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2'nin pisi balığının bağışıklık ve büyüme üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Pisi balığının bağırsağından izole edilen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, 5 haftalık besleme denemesinde  $10^8$  cfu/gr olarak pisi balıklarına ağızdan verilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında probiyotik yemle beslenen balıkların ağırlıklarında artış olup lizozim, antiproteaz, serum peroksidaz gibi non-spesifik bağışıklık parametrelerini arttırmıştır. Ayrıca 9 günlük probiyotik yemle beslemeden sonra *S. iniae* ile çelinc edildiğinde kontrol yemiyle beslenenlerde %90 ölüm oranı gözlenirken probiyotik yemle beslenenlerde ölüm gözlenmemişlerdir. Yine bir diğer çalışmada, Beck et al., (2015) Bezelye filizlerinden izole edilen *Lactococcus* (Lc.) *lactis* BFE920 ve pisi balığından (*Paralichthys olivaceus*) izole edilen *Lactobacillus* (Lb.) *plantarum* FGL0001'dan oluşan probiyotik karışımını, *Lc. lactis* BFE920'nin pisi balığı üzerindeki probiyotik etkisini arttırmak için çalışılmışlardır. 30 günlük denemede pisi balıklarının bağışıklık, hastalığa direnç ve ağırlık kazanımlarında önemli değişiklikler görmüşlerdir. Probiyotik karışımla beslenen balıkların lizozim

aktivitesi, fagositik aktivitesinde düzelme, ayrıca nötrofil aktivitesi, IL-6, IL-8, ve TNF-a ifadelerinde de kontrolle kıyaslandığında önemli fark tespit etmişlerdir. Probiyotik karışımı, *Lc. lactis* BFE920 ve *Lb. plantarum* FGL0001 ile beslenen deneme grubu ve kontrol yemle beslenen gruplar *Streptococcus iniae* (log<sub>10</sub> 6.0 CFU/balık) ile enfekte edildiklerinde yaşama oranlarının sırasıyla 55%, 45%, 35%, ve 20% olduğunu; ayrıca probiyotikle beslenen balıklardaki ağırlık kazancı kontrol yemiyle beslenenlerle kıyaslandığında ise % 38.1 ± 2.8 daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Dulluç (2010) yürüttüğü tez çalışmasında, %39 ham protein ve 3500 kcal/kg sindirilebilir enerji içerecek şekilde temel yem hazırlayıp bu yeme 1,0x10<sup>5</sup>, 1,0x10<sup>6</sup>, 1,0x10<sup>7</sup> kob/g yem oranlarında olacak şekilde Bactocell® (*Pediococcus acidilactici* içeren) ilave edip deneme sonunda canlı ağırlık kazancı ve canlı ağırlıkça oransal büyümede; kontrol grubunu deneme grubundan daha yüksek, deneme sonunda ise gruplar arasındaki farkı önemsiz bulmuştur; boyca büyüme ve boy kazancında ise gruplar arasındaki farkı önemsiz bulduğunu bildirmiştir (p>0,05).

Yukarıda bahsedildiği gibi probiyotiklerin balıklar üzerindeki etkisinin gözlemlenmek için, çalışmamızda ortalama canlı ağırlıkları 19±22 g olan 210 alabalık yavrusunda, 28 gün boyunca probiyotik potansiyele sahip (gramda 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> hücre) *Lactococcus lactis* ssp *lactis*'le yapılan besleme sonucunda kontrol grubu ile deneme grubu arasında canlı ağırlık kazancı, ağırlıkça oransal büyüme, boyca büyüme ve boyca oransal büyüme açısından değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelere baktığımızda; ağırlıkça büyüme açısından deneme sonunda en iyi büyüme probiyotik yemle beslenen grupta (27.25±2.70) olmuştur (Çizelge 4.12, Şekil 4.24). Canlı ağırlık ortalamaları için yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre; 14. ve 21. günde probiyotikli yem ve kontrol yemiyle beslenen gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemliyken (p<0,05) 7. ve 28. günlerde farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Total boy ortalamaları bakımından yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonucuna göre 7. gün, 14. gün ve 21. günde kontrol ve probiyotikli yemle beslenen gruplar arasındaki fark önemliyken (p<0,05); 28. günde istatistiksel

farklılık önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.14, Şekil 4.26). Boyca oransal büyüme açısından yapılan varyans analizi ve Duncan testi sonuçlarına göre; 7. 14. 21. ve 28. günlerde boyca oransal artış kontrol grubu ve deneme grubu arasında önemli ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Deneme sonu itibariyle boyca oransal büyüme karşılaştırıldığında en iyi büyüme 28. günde olmuştur (Çizelge 4.15, Şekil 4.27).

Araştırma sonunda kontrol grubu ile probiyotik ilaveli gruplar arasında canlı ağırlık artışı bakımından önemli bir fark tespit edilmemesi çeşitli literatür sonuçlarını desteklemektedir. Elde edilen bulgular Byun ve arkadaşları (1997)'nin pisi balıkları, Shelby ve ark. (2006)'ın tilapia balıkları, Merrifield ve ark. (2010b)'in gökkuşuğu alabalıklarıyla yaptıkları çalışmalarla paralellik göstermektedir. Byun ve ark. (1997), pisi balıklarının yemlerine probiyotik olarak *Lactobacillus* sp. DS-12 ilave edilmesinin balıkların canlı ağırlık artışını istatistiksel olarak önemli şekilde etkilemediğini bildirmişlerdir. Shelby ve ark. (2006), Nil tilapiası yavrularıyla farklı probiyotik ilave edilmiş yemlerle 39 ve 63 günlük besleme denemelerinde ağırlık kazancının gruplar arasında istatistiksel farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. Merrifield ve ark. (2010b) yürüttükleri çalışmada, kontrol yemine log 7,79 cfu/g BioPlus 2B® (*B. licheniformis* + *B. subtilis*), log 8,36 cfu/g *E. faecium* ve log 8,05 + log 8,23 cfu/g BioPlus 2B + *E. faecium* ilave edilerek yapılan 10 haftalık besleme denemesinden sonra deneme sonu canlı ağırlık artışı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. Bagheri ve ark. (2008), 2 ay süreyle yaptıkları besleme denemesinde gökkuşuğu alabalığı yemlerine 5 farklı seviyede ( $4,8 \times 10^8$  cfu/g,  $1,2 \times 10^9$  cfu/g,  $2,01 \times 10^9$  cfu/g,  $3,8 \times 10^9$  cfu/g,  $6,1 \times 10^9$  cfu/g) ticari probiyotik BioPlus® eklemişler ve probiyotik etkisini probiyotik içermeyen kontrol yemiyle beslenen grupla karşılaştırmışlardır. Deneme sonunda en yüksek ağırlık artışı gözlenen  $3,8 \times 10^9$  cfu/g probiyotik eklenmiş deneme grubu hariç diğer gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gözlememişlerdir ( $p>0,05$ ). Bunun tam tersi olarak probiyotik ilave edilmiş yemlerle beslemenin canlı ağırlık artışı sağladığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. El-Haroun ve ark. (2006), Nil tilapialarının yemlerine farklı oranlarda (%0,5, %1,0, %1,5, %2,0) ticari probiyotik Biogen® eklemişler ve deneme sonunda probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle beslenen gruplarda daha fazla ağırlık kazancı sağlandığını bildirmişlerdir.

Hastalıkların ortaya çıkması yetiştiriciliğin geliştirilmesinin önündeki önemli bir engel olup bir çok ülkede ekonomik kayıplara neden olmaktadır. *Y.ruckeri* özellikle alabalık yetiştiriciliğinde Enterik kırmızı ağız hastalığı (yersiniozis)'na sebep olup (Kumar et al., 2015) Türkiye'deki alabalık çiftliklerinde de önemli bir sorunu teşkil etmektedir. Hastalık ismini subkutenöz hemorajiden almıştır. Yersiniozis akut ve kronik septisemi ile seyreden enfeksiyöz bir hastalıktır. Akut vakalarda hasta balıklarda durgunluk ve yem almama dikkati çeker. Balıkların derisinde kararma, ağız etrafında ve boşluğunda, boğazda, gözde, solungaçlarda ve yüzgeç tabanlarında subkutan kanamalar, bilateral ekzoftalmus, karında ascites, anüste prolapsus ve kızarıklık görülür. Gözde kanama ve ödemler genellikle göz yırtılması sonucu körlükle sonlanmaktadır. Kronik vakalarda ise kanamalı lezyonlar pek görülmez. Kronik hasta balıklarda renkte kararma, zayıflama ve tek yada çift taraflı ekzoftalmus vardır. Hastalığa en duyarlı balık türü ülkemizde de kültürü yaygın olarak yapılan gökkuşaağı alabalığıdır. Yukarıda bahsettiğimiz bu nedenlerden dolayı çalışmamızda *Y. ruckeri*'yi in vivo olarak probiyotiklerin etkisini araştırmak için kullandık. Probiyotik bakteri ilave edilmiş yemlerle 14 gün boyunca beslenen ve 14. günde ml'sinde  $10^6$  (Enstitümüzde daha önce yürütülen proje çalışmalarında bu oranın %50'den daha fazla bakterinin ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir) bakteri hücreleri (*Y. ruckeri*) olan süspansiyonlar intramüsküler olarak deneme grubuna 3 tekrarlı olacak şekilde verilmiştir ve 20 gün boyunca ölen ve hayatta kalan balıkların sağlık durumları takip edilmiştir. Alabalık gruplarında deneme süresince hayatta kalma açısından kontrol ve deneme grubu arasında istatistiksel olarak fark önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlar Taoka ve arkadaşları (2006), Sharifuzzaman ve Austin (2009), Vendrell ve arkadaşları (2008) tarafından yürütülen çalışmalarla uyuşmamaktadır. In-vivo deneme sonunda deneme grubu ve kontrol gruplarında hayatta kalan balıkların morfolojik incelemesi yapıldıktan sonra iç organları gözlenmiştir. Yapılan gözlemlerde kontrol grubu balıklarında renkte kararma ve iç organlarda hemoraji görülürken deneme grubu balıklarında böyle bir etki gözlenmemiştir. Ayrıca hastalık etkeni olan *Y.ruckeri* için seçici besiyeri olan Shotts-Waltman (Gunasena et al., 2003) da karaciğer, dalak ve böbreklerden yapılan ekimlerde kontrol grubundaki balıkların tümünde *Y.ruckeri* izole edilmesine rağmen deneme grubundaki balıklardan yapılan izolasyonlarda balıklarda hastalık etkeni izole edilmemiştir. Elde edilen bu bulgular

Sharrifuzzaman ve Austin (2009) tarafından yürütülen çalışmayla uyuşmaktadır. Bu da probiyotikli yemle beslemenin hastalık etkenini baskıladığını göstermektedir. Probiyotikler genel anlamda yeterli miktarda konağa verildiğinde fayda sağlayan canlı mikroorganizmalardır. Bu tez çalışmasında balıkların kendi doğal ortamlarından izole edilen bakterilerin Türkiye’de yetiştiriciliği en çok yapılan alabalıklara karşı potansiyel probiyotik olma kapasiteleri değerlendirilmeye çalışılmıştır. Günümüzde en çok çalışılan probiyotikler *Basillus* ve *Laktobasillus* genus türleridir. Bu genusların dışındaki bakterilerin de probiyotik kapasiteleri araştırılmalıdır. Dolayısıyla bu çalışmamızda tatlı su bakterilerinden elde ettiğimiz *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (F4 nolu izolat)’in probiyotik potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu çalışma doğal ortamdan izole edilen bir bakterinin probiyotik potansiyelinin değerlendirilmesi ve yetiştiricilikte kullanılması bakımından Türkiye’de bir ilk olup bu açıdan özgündür. Yürütülen bu çalışma sonucunun *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* olarak tanılanan F4 numaralı strainin potansiyel probiyotik olarak kullanılabileceğini göstermiş ancak tam olarak ticari üretime geçebilmek için diğer in-vivo çalışmaların örneğin bağışıklık araştırmaları ve farklı patojenlere tolerans gibi denemelerle devam ettirilmesi gerekmektedir. Probiyotik bakterilerin patojenlere karşı hayatta kalma oranlarının ve diğer probiyotik karakteristiklerinin güçlendirilmesi çalışmalarına da ihtiyaç vardır fakat mikrobiyal metabolik mühendisliği araçları bu konuda yetersiz kalmaktadır (Nguyen et al., 2016). Bunun yanında temel mikrobiyoloji bakterilerin çevresel streslere adapte olduğunu kanıtlamıştır. Örneğin sub-lethal stresler mikroorganizmalara yeterli ve belli bir sıklıkta verildiğinde mikroorganizmalar bu streslere karşı giderek güçlenmektedir. Bilim adamları da mikroorganizmaların verdiği bu yanıtı taklit ederek probiyotikleri güçlendirmek için bu yönde çalışmalar yapmaktadır fakat bu denemeler henüz deneme aşamasındadır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Global gıda krizi ve üretim maliyetlerinin artması hükümetler ve uluslar arası topluluklar üzerinde büyüyen popülasyonların gıda ihtiyaçlarını karşılama anlamında baskı oluşturmuştur. Böylece yetiştiricilik tatlı su gıdası ve deniz ürünlerine olan ihtiyacı karşılamanın bir yolu olarak görülmektedir. Devam eden küreselleşmeyle ilgili zorluklara cevap vermek için yetiştiriciliğin yoğunlaşması ve çeşitliliği gıda üretimi için teknolojik yeniliklerin gelişmesine, ekolojik sistemlerde ve insan davranışlarında (biyoçeçitliliği koruma bilinci, halk sağlığı ve çevre) değişikliklere neden olur. Bu zorluklar yetiştiricilik uygulamalarının geliştirilmesine olan dikkatin artmasına ve avcılıktan kaynaklanan suçul ekosistemlerde modifikasyon ve aşırı tüketim için iyi bir alternatif olmasını sağlayacaktır. Mikrobiyal topluluklarla ilişkili yetiştiricilik sistemlerindeki mikrobiyal ekoloji çalışmalarının su kalitesi ve hayvan büyümesiyle güçlendirilmesi gerekmektedir. Dikkat edilmesi gereken bir diğer güvenlik kriteri de, antibiyotik direnç genlerini taşıyıp aktarabilen ve intestinal sistemde mukozal yapıya zarar veren suşların probiyotik olarak kullanılmamasıdır.

Probiyotik potansiyeli olan mikroorganizmaların faj dirençlilik, genetik stabilite gibi özelliklerinin iyi araştırılması yanında; büyük ölçekte üretime uygunluk, ürün tadında olumsuz etkisinin olmaması ve üründe canlı kalabilme yeteneği gibi teknolojik süreçlerdeki durumunun da belirlenmesi gerekmektedir. Probiyotik ürünler genellikle mikroorganizmaların canlılığını ve aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilecek santrifüj, liyofilizasyon gibi yöntemler uygulanarak toz veya granüler formda hazırlanmaktadır. Probiyotik ürün, hedeflenen yararlı etkiyi gösterebilmesi için bağırsak florasında yarışa girebilecek düzeyde canlı mikroorganizma sayısına sahip olmalıdır. Probiyotik ürünün içerdiği canlı bakteri sayısı; depolama süresi, nem, sıcaklık gibi koşullardan etkilenmektedir. Bu nedenle probiyotik suşların canlılığı ve stabilitesi üzerine teknolojik süreçlerin etkisinin incelenmesi, son kullanım tarihini belirlemek için zorunludur (Sanders ve Veld, 1999; Dunne v.d., 2001). Kullanılan probiyotiğin konsantrasyonu her durumda optimize edilmelidir. Verilme süresi çok önemli bir faktör olup 2-4 hafta optimum görünmektedir. Dünyada su ürünlerine sürekli artan bir talep olduğundan yeni ve daha iyi probiyotik formülasyonları ve faydalarının

arttırılması bu taleplerin karşılanmasına yardımcı olabilir. Böylece ucuz ve daha iyi üretim metotları, verme yolları ya da diğer terapötik ajanlarla kombinasyonları iyi olabilir.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelhamid, AM., Mehrim, AI., El.barbary, MI., Ibrahim, SM., Abd El-wahab, AI.,** 2009. Evaluation of a new Egyptian probiotic by African catfish fingerlings. *Journal of Environmental Science Technology*, 2(3):133-145.
- Abdulmir, A. S.,** (2010). Detection and quantification of probiotic bacteria using optimized DNA extraction, traditional and real-time PCR methods in complex microbial communities. *African Journal of Biotechnology*, 9 :1481-1492.
- Akayli, T.,** 2001. Diagnosis of vibriosis by elisa and methods in cultured Sea bream (*Sparus auratus*, 11758). Doktora Tezi, Istanbul University,
- Akrami, R., Hajimoradlo, A. M., Matinfar, A., Abadian, A.N., Alimohmmadi, S. A.,** 2008. The effect of Inulin probiotic on growth indices, feed efficiency, survival rate and body composition of juvenile Beluga (*Huso huso*). *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 55 – 64.
- Allameh, S.K., Daud, H., Mohammad Yusuf, F., Saad C.R., Ideris, A.,** 2012. Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* a new probiotic from intestine of sneakhead fish (*Channa striatus*). *African Journal of Biotechnology*, 11:3810-3816. doi: 10. 5897/AJB11.1871.
- Arıĝ, N., Suzer, C., Gökvardar, A., Başaran, F., oban, D., Yıldırım, ř., Kamacı, H. O., Fırat, K., Saka, ř.,** 2013. Effects of Probiotic (*Bacillus* sp.) Supplementation during Larval Development of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 407-414, doi: 10.4194/1303-2712-v13\_3\_03
- Ashraf, R., P. Shah, N.,** 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*, 149:194-208.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Askarian, F., A. Matinfar, A., Kousha, M., Bahmani, K., Khorshidi, A., Shenavar and E. Ringo.,** 2008. Diversity of lactic acid bacteria in the gastrointestinal tracts of reared beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*): A comparative study. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3: 302-311.
- Atlas, R.M.,** 2004, Handbook of Microbiological Media, 3<sup>th</sup> Ed., CRC Press, Boca Raton, 2051p.
- Aubin, J., Gatesoupe, F.J., Labbe, L., Lebrun, L.,** 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), *Aquaculture Research*, 36, 758-767
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.,** 1997, Short Protocols in Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> ed., John Wiley and Sons, New York, 1512p.
- Austin, B. and Austin, D.A.,** 2012. Bacterial fish pathogens; diseases of farmed and wild fish. Springer, New York, London
- Aydın, S., Çelebi, S. and Akyurt, İ.,** 1997. Clinical, haematological and pathological investigations of *Escherichia vulneris* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology*, 32: 29-34.
- Aydın, F., Köksal, G., Demir, N., Bekcan, S., Kırkağaç, M., Gözgözoğlu, E., Erbaş, S., Deniz, H., Maltaş, Ö., Arpa, H.,** 2005. Su ürünleri yetiştiriciliği ve politikalar, Ziraat Mühendisliği 6.Teknik Kongresi, Ankara, [www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tkO5/039/fikriaydin.pdf](http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tkO5/039/fikriaydin.pdf).
- Azizpour, Khalil., Tkmechi, A. and Agh, N.,** 2009. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Intestines of Common Carp of West Azarbaijn, Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. Vol 8(6) pp.1162-1164.
- Bahadır-Koca, S., Didinen, B.I., Ekici, S., Dulluç, A.,** 2011. Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik uygulamaları *Journal of Fisheries Sciences* 5(4): 326-335.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O., Muzquiz J. L.,** 2006a. Sequencing of variable regions of the 16S r RNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids, *Comparative Immunology, Microbiology*, 30:111-118.
- Balcazar, J. L.,** 2006b. Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids, *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18:61-63.
- Balcazar, J.L., Decamp, O., Vendrell, D., Ruiz-Zarzuela D.B. and I.,** 2006c. Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 18:65-70
- Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, M., Cunningham D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L.,** 2006d. The role of probiotics in aquaculture, *Veterinary Microbiology*, 114: 173-186, doi:10.1016/j.vetmic.2006.01.009.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girones, O., Muzquiz, J. L.,** 2007a. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens, *Veterinary Microbiology*, 122:373-380,doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.023
- Balcazar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Girones, O., Muzquiz, J.L.,** 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(1):185-193.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A.C., Márquez, I., Girones, O., Múzquiz, J.L.,** 2007c. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97, 522–527.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Balcazar, J. L., D. Vendrell, J. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J. L., Maquiz and, Girones.,** 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acidbacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278: 188-191.
- Başığit, G.,** 2004. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Probiyotik Olarak Kullanılma Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.
- Baran, I., Timur, M., Aydın, N., İstanbulluoğlu, E. ve Aydintuğ, M.K.,** 1980. Çifteler-Sakaryabaşı balıkçüretim ve araştırma istasyonunda, alabalıklarda (*Salmo gairdneri*) görülen bakteriyel hemorajik septisemi hastalığı üzerine incelemeler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 27(1): 467-473.
- Baylan, M., Mazı, G., Gündoğdu, S.,** 2015. Balık Beslemede Biyoteknolojik Uygulamalar, *Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*,3(3): 112-116.
- Beck B.R., Kim, D., Jeon, J., Lee, S.M, Kim, H. K, Kim O.J., Lee, J.I., Suh, B. S., Do, H.K., Lee, K. H., H. Holzapfel, W., Hwang, J.Y., Kwon, M. G., Song, S. K.,** 2015. The effects of combined dietary probiotics *Lactococcus lactis* BFE920 and *Lactobacillus plantarum* FGL0001 on innate immunity and disease resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Fish and Shellfish Immunology*, 42: 177-183.
- Boke H., Aslım B., Alp Gulcin.,** 2010. Bile Salts And Acid Tolerance Of Exopolysaccharides (Epps) Produced By Yogurt Starter Bacteria, *Archives of Biological Sciences*, 62 (2): 323-328.
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K. Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z. and Shariff, M.,** 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132: 249-272.
- Brunt, J., Austin, B.,** 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 28, 693–701.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A and Austin, B.,** 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, 30, 573–579.
- Bucio, A., Hartemink, R., W.Schrama, J., Verreth, J., Rombouts, F.M.,** 2005. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. *Food Microbiology*. 476-482.
- Bush, U. and Nitschko, H.,** 1999. Methods for differentiation of microorganisms, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722, 263-278.
- Buntin, N., Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T.,** 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30: 141-148.
- Bushell, C. and Burns, M.,** 2012. Feasibility Study into the Use of DNA Sequencing for the Identification of Probiotic Bacteria *Journal of the Association of Public Analysts*, 40 28-38.
- Bricknell, I.R., Bowden, T.J., Bruno, D.W., MacLachlan, P., Jonstone, R. and Ellis, A.E.,** 1999. Susceptibility of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) to infection with typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 175: 1-13.
- Brunt, J., Austin, B.,** 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*.
- Can, E.,** 2001. Probiotik ürünlerin levrek (*dicentrarchus labrax*, l. 1758) larvalarının gelişimine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, 76s.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Can E., Kurtoğlu, İ.Z, Kayım, M., Akhan, S., Kızak, V., Kocabaş, M., Köse, Ö., Demirtaş, N., Delihasan Sonay, F., Othan, A.,** 2011. Alabalıklarda Probiyotik Uygulamalarının Bugünü ve Geleceği, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 4(1): 45-52.
- Carnevali, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchin, G., Olivotto, I., Silvi.S and Cresci, A.,** 2006. Growth improvement by probiotic European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aqua*.
- Casalta, E., Montel, M.C.,** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126; 271-273.
- Chabrillon, M., Arijo, S., Daz-Rosales, P., Balebona, M. C., Morinigo, M. A.,** 2006. Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.), *Aquaculture Research*, 37:78-86.
- Chen, Y.S., Yanagida, F., Shinohara, T.,** 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure, *Letters in Applied Microbiology*, 40: 195–200.
- Claudia, C.O., Miguel, R.S., Angela, O.N.M., Yurrita, P.J.G.,** 2004. Effect of density and sex ratio on gonad development and spawning in the crayfish *P. llamasi*. *Aquaculture*, 236, 331 -339.
- Clements, K.D.,** 1997. Fermentation and gastrointestinal microorganisms in fishes. In: Mackie, R.I., Withe, B.A., Isaacson, R.E. (Eds)., *Gastrointestinal Microbiology, Vol. 1, Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Chapman & Hall Microbiology Series, International Thomson Publishing, New York, 156–198.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Cocconelli, P.S., Parisi, M.G., Senini, L., Cappa, F. and Bottazzi, V.,** 1997. Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of *Lactobacillus* population dynamics in natural whey culture, *Letters in Applied Microbiology*, 24, 8-12.
- Collins, C.H., Lyne, P.M.,** 1976. *Microbiological methods, Euston Road, London, 466p.*
- Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Fergus, S. and Jones, D.,** 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37, 310–316.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Williams, A.M.,** 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa, *Journal of Applied Bacteriology*. 67, 453–460.
- Collins, M.D., Jovita, M.R., Lawson, P.A., Falsen, E. and Foster, G.,** 1999. Characterization of a novel gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of *Eremococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1381–1385.
- Conway, P.L.,** 1996. Development of intestinal microbiota. In: Mackie RI, White BA, Isaacson RE (Eds) *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman and Hall. New York, 3-38.
- Cowan, S.T., Steel, K.J.,** 1970. *Manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge at University Press, 216p.
- Cruz, P.M., L.Ibanez, A., Hermesillo, O.A.M., Saad, H.C.R.,** 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. *International Scholarly Research Network*. 13 p doi: 10.5402/2012/916845
- Çakır, İ., Çakmakçı, M.L.,** 2004. Probiyotikler: Tanımı, etki mekanizması, seçim ve güvenilirlik kriterleri. *Gıda*, 29(6), 427-434.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Çetinkaya, O., 1995.** Balık besleme. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat fakültesi yayınları, 129s.
- Çetinkaya, E., Ayhan, K., 2014.** Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler, *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2 (1), 53-62.
- Davis, D.A. and Robinson, E.H., 1986.** Estimation of the Dietary Lipid Requirement Level of the White Crayfish *Procambarus acutus acutus*, World Aquaculture Society, 17, 37-43.
- Destan-Aytekin, Nihal., 2013.** Optimization of Growth Characteristics for The Potential Probiotics to be Used in Fish Aquaculturing, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 70 p.
- Dada, A.A., and Olugbemi, B.D., 2013.** Dietary effects on two commercial feed additives on growth performance and body composition of African catfish *Clarias gariepinus* fingerlings, *African Journal of Food Science*, 7(9) 325-328.
- Denev, S., Stykov, Y., Moutafchieva, R., Beev, G., 2009.** Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish. *International Aquatic Research*, 1: 1-29.
- De Man., J. C. Rogosa, M. E. Sharpe., 1960.** A medium for the cultivation of lacto- bacilli. *Journal of Applied Bacteriology.*, 23, 130-135
- Devaraj, K.V., Keshavappa, G.Y. and Manissery, J.K., 1986.** Growth of grass carp, *Ctenopharynogodon idella*. (val.) fed on two terrestrial fodder plants. *Aquaculture and fisheries Management*, 17: 123-128.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. and Collins, M.D., 1995.** Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 395–397.
- Doğan, K., 2003.,** Ülkemizin akuakültür potansiyeli. Deniz ve Balıkçılık, Aylık Sektörel İhtisas Dergisi, Sayı:3, 10-12 kısım I-II.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Doğan, P.** 2009. *Pediococcus acidilactici* PBF suşunda bakteriyosin üretiminden sorumlu genin aktarımı. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D., Yüksek Lisans Tezi, 115s.
- Doming K. J., Mayer H. K., Kneifel W.,** 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. phenoand genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 165-188.
- Dosta, M.D.C.M., Barrera, T.C., Perrino, F.J.F., Reyes, L.M., Gutierrez, H.H. and Suarez, S.C.,** 2012. Bacteria with Probiotic Capabilities Isolated from Digestive Tract of the Ornamental Fish *Pterophyllum scale open science*.
- Drinan, D.F., Tobin, S. and Cogan, T.M.** 1976. Citric acid metabolism in hetero and homofermantative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 481-86.
- Dulluç, A.,** 2010. Probiyotik İlaveli Beslemenin Tilapia(*Oreochromis niloticus* L.) ve Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio* L. 1758) Yavrularının Büyüme ve Yem Değerlendirmesine Etkileri, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 93s.
- Dyer, F.E.,** 1947. The microorganisms from Atlantic cod. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 7, 128–136.
- Eissa, N., El-Gheit, E.A., Shaheen, A.A.,** 2014. Protective effect of *Pseudomonas fluorescens* as a probiotic in controlling fish pathogens. *American Journal of BioScience*. 2(5): 175-181.
- El-Haroun, E.R., A.M.A.S.Goda and M.A.K. Chowdhury,** 2006. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 37:1473-1480.
- El Sayed, A.M.,** 1990. Long term evaluation cottenseed meal as protein source for Nil tilapia, *O. niloticus*. *Aquaculture*, 84, 315-320.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Emre, Y., Diler, İ., Sevgili, H., Oskay, D.A., Sayin, C.,** 2007. Akdeniz Bölgesi'ndeki alabalık işletmelerinin yapısal özelliklerinin incelenmesi (2000-2003), Ulusal Su Günleri, 16-18 Mayıs,476-489.
- Ewaschuk, J. B. and Dieleman, L. A.,** 2006. Probiotics and prebiotics in choronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, (12): 5941-5950.
- FAO.,** 2005. Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture (Ed.Serrano PH), FAO Fisheries Technical Paper 469, FAO, Rome, pp. 98.
- FAO.,** 2013. Food Outlook: Bi-Annual Report on Global Food Markets. Rome, Italy. 133 p.
- FAO.,** 2014. Fisheries and Aquaculture Department (erişim tarihi:04/02/2014).
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C., Diop, L., Sapin, C., Trugnan, G.,** 2003. Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell*, 95:503-506.
- Fugelsan, K.C., Edwards, C.G.,** 2007. Wine Microbiology, Practical Applications and Procedures, Springer, 394p.
- Fuller, R.,** 1989. Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Fuller, R.,** 1992. History and development of probiotics. In: Fuller, R. (Ed.), Probiotics: The Scientific Basis., Chapman & Hall, London, 232, 1-18.
- Gatesoupe, F.J.,** 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatillis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 335 – 342.
- Gatesoupe, F.J.,** 1999. The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture*,180: 147–165.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Georghiou, PR., Hamill, R.J., Wright, C.E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D.A., Lupski, J.R.,** 1995. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clinical Infectious Diseases*, 20(1):84–94.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringo, E.,** 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352, 279-285.
- Giri, S.S., Sen, S.S., Sukumaran, V.,** 2012. Effect of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* usf-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*, *Fish and Shellfish Immunology*, 1-6.
- Gobbetti M., Angelis M., Corsetti A., Cagno R.,** 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food and Science Technology*., 16, 1-13
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F.,** 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.
- Gomez, R., Geovanny, D., Balcazar, J.L., Shen, M.A.,** 2007. Probiotics as control agents in Aquaculture. *Journal of. Ocean University of China*. 6: 76-79.
- Gonzales, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez, M.L., Otero, A.,** 2000. Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes, *Food Microbiology*, 17,383-391.
- Gram, L., Melchiorson, J.,** 1996. Interactions between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. *Journal of Applied Bacteriology*, 80:589-595.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Giorgio, G., Nina, C., Yantiyati, W.,** 2010. Importance of *Lactobacilli* in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161: 480-487.
- Gismondo, M.R., Drago, L., Lombardi, A.,** 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 287-292.
- Gunasena, K.D., Komrover, J.R., Macintyre, S.,** 2003. The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Possesses a TTS System, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 529:105-7.
- Gümüş, E. ve Yılmaz, S.,** 2011. Antalya ili'nde su ürünleri yetiştiricilik sektörü ve pazarlama durumu, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3: 15-31.
- Hammes, W.P. and Vogel, R.F.,** 1995. The genus *Lactobacillus*. pp. 19-55. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol: 2. Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds). Blackie Academic Professional.
- Hammond, K.S., Hollows, J.W., Townsend, C.R., Lokman, M.,** 2006. Effects of temperature and water calcium concentration on growth, survival and moulting of freshwater crayfish, *Paraneohapsys zealandicus*. *Aquaculture*, 251, 271-279.
- Harzevili, A.R.S., VanDuffel, H., Dhert, P., Swings, J. and Sargeloos, P.,** 1998. Use of aquaculture potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Aquaculture Research*, 29, 411- 417.
- Heo, W.S, Kim, Y.R, Kim, E.Y, C. Bai, S, Kong, I.S.,** 2013. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 376-379.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Hessle, C., Hansson, L.A., Wold, A.E., 1999.** Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production, *Clinical and Experimental Immunology*, 116: 276-282.
- Hoşsu, B., Korkut, A., Y., Fırat, A., 2001.** Balık besleme ve yem teknolojisi I. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:50, Ders Kitabı Dizini No:19 Bornova, İzmir, 276 s.
- Ige-Badina, Abudurasak., 2013.** Probiotics use in intensive fish farming. *International Journal of Agricultural Research and Natural Resources* 1(1),001-011.
- Irianto, A., Austin, B., 2002.** Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25: 333–42.
- Jacinto, E.C., Colmenares, H.V., Suarez, L.E.C., Cerecedo, R.C., Soria, H.N., Llamas, A.H., 2005.** Effect of different dietary protein and lipid levels on growth and survival of juvenile Australian redclaw crayfish, *C. quadricarinatus* (von Martens). *Aquaculture Nutrition*, 11, 283-291.
- Joborn, A., Olsson, C., Westerdahl, A., Conway, P.L., Kjellberg, S., 1997a.** Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K. *Journal of Fish Diseases*, 20, 383–392.
- Joborn, A., Olsson, C., Westerdahl, A., Dorsch, M., Conway, P.L., Kjellberg, S., 1997b.** Characterization of a *Carnobacterium* sp. isolated from the intestine of Atlantic salmon *Salmo salar.*, producing a low molecular weight growth inhibitor active against bacterial fish pathogens. Manuscript in preparation.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Junren, Z., Rulan, W., Weili, H., Rong, Z.,** 2011. Study on Isolation and Identification of the Lactic Acid Bacteria in Airing Wuchang Fish and Production Performance of Strains. International Conference on Electronic & Mechanical Engineering and Information Technology, China, 497-501.
- Kanyılmaz, M., Yilayaz, A., Sevgili, H., Uysal, G.,** 2011. Fethiye bölgesindeki alabalık kuluçkahanelerinin teknik özellikleri, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4 (1): 135-140.
- Kaya-Özdoğan, D.,** 2011. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 Suşunun Probiyotik Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 71s.
- Kayis, S., Capkin, E., Fikri, B. and Altinok, I.,** 2009. Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey - a survey. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 61(4), 339-344.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.L.J., Gibson, L.,** 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanism of action and screening processes, *Aquaculture*, 274: 1-14.
- Kıran F.,** 2006. Hücre Duvarı Protein Profilleri ve Plazmid İçeriklerine Göre Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Tanısı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö.,** 2011. Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler, Erciyes university *Journal of the İnstitute of Science and Technology*, 27(1),62-74.
- Kırdar, S.,** 2000. Süt teknolojisinde *Lactobacillus acidophilus* Yeri ve Önemi (M. DEMİRCİ editör) VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı, Tekirdağ, s: 287-295.
- Kim, D.H., Austin, B.,** 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 513-524.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Kim, D.H., Austin, B.,** 2008. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine, *Issue Letters in Applied Microbiology*, 47 (3): 141–147.
- Kirkan, S., Goksoy, E.O. and Kaya, O.,** 2003. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. *Journal of Veterinary Medicine* 50(7):339-342.
- Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J.,** 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 45-57.
- Klose, V., Bayer, K., Bruckbeck, R., Schatzmayr, G., Loibner, A-P.,** 2010. Invitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine associated pathogens. *Veterinary Microbiology*, 144: 515-521.
- Kopermsub, Phikunthong., Yunchalard, Sirinda.,** 2010. Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaa-som, a traditional fermented fish product of Thailand, *International Journal of Food Microbiology*, 138:200-204.
- Korun, J. and Timur, G.,** 2001. Gökkuşığı alabalıklarında (*O. mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerine bir çalışma. *Istanbul University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12: 15-30.
- Kumar G., Menanteau-Ledouble S., Saleh M., El-Matbouli M.,** 2015. *Yersinia ruckeri* a causative agent of enteric red mouth disease in fish, *Veterinary Research*, 46:103.
- Kvasnikov, E.I., Kovalenko, N.K., Materinskaya, L.G.,** 1977. Lactic acid bacteria of freshwater fish. *Microbiology* 46, 619–624.
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzman- Mendez, B.E. and LopezMadrid, W.,** 2011. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Aquaculture*, 216: 193-201.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Lara-Flores, M.**, 2013. The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology*, 2(12):471-478.
- Lee, Y. K., Salminen, S.**, 2009. Handbook of Probiotic and prebiotic, Second Edition, published by John Wiley&Sons, inc., Hoboken, New Jersey.
- Leisner, J.J., Laursen, B.Gr., Hervé, P., Drider, D. and Dalgaard, P.**, 2008. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods, *FEMS Microbiology Review*, 31(5): 592–613.
- Lesel, R.**, 1990. Thermal effect on bacterial flora in the gut of rainbow trout and African catfish. In: Le'sel, R. Ed., *Microbiology in Poecilotherms*, 338p.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H.**, 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147,747-748.
- Liu, D.**, 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 471.
- Liu, Y., Zhou, Z., Yao, B., Shi, P., He, S., Benjamisen, H.L., Ringø, E.**, 2008. Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture Research*, 39: 635–646.
- Maeda M.**, 1999. *Microbial Processes in Aquaculture*. Society for the Biological Creation and Enhancement of the Aquatic Environment (Biocreate), Japan, 102 p.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M., Vesikari, T.**, 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, 20:333-338.
- Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J.**, 2010a. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment *Aquaculture Nutrition* 16(5): 496–503.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Merrifield, DL., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, SJ., Baker, RMT., Bogwald, J., Castex, M., Ringo, E.,** 2010b. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302:1-18.
- Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.Ga., Lautraite, A., Tailliez, P.,** 2007. Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Fish and the Fish Farm Environment, Established by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 2947-2955.
- Miljković-Selimović, Biljana., Kocić, Branislava., Babić, Tatjana., Ristić, Ljiljana.,** 2009. Bacterial typing methods, *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 26 (4): 225-233.
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O. and Yadav, H.,** 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, (9); 190-198.
- Moriarty, D.J.W.,** 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Le'sel, R. Ed. *Microbiology in Poecilotherms*, 217-222.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Aponte, M., Catzeddu, P., Villani, F., Deiana, P. and Coppola, S.,** 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains, *Journal of Applied Microbiology*, 85: 25-36.
- Mourad, K and Nour-Eddine, K.,** 2006. In Vitro Preselection Criteria For Probiotic Lactobacillus, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*,1 (1): 27-32.
- Nikoskelainen, S., A.C. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen and E. Lilius,** 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15:443-452.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Nomoto, K.**, 2005. Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6): 583-592.
- Nousiainen, J., Setälä, J.**, 1993. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In Salminen, S. and A. von Wright (eds), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York: 315-356.
- Noveirian, H.A., Nasrollahzadeh, A.**, 2012. The effects of different levels of biogen probiotic additives on growth indices and body composition of juvenile common carp (*Cyprinus carpio L.*) *Caspian journal of Environmental Sciences*, 10(1):115-121.
- Nguyen, TDT., Kang, J.H., Lee, M.S.**, 2007. Characterization Of *Lactobacillus Plantarum* Ph04, A Potential Probiotic Bacterium With Cholesterol-Lowering Effects, *Internationa journal of Microbiology*, 113:358-361.
- Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R.W.**, 2000. Characterization and Putrifaction of a Bacteriocin Produced by Potential Probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC, *Journal of Dairy Science*, 83: 2747-2752.
- Olive, D.M. and Bean, P.**, 1999. Principles and applications of methods for DNA-based **typing** of microbial organisms, *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1661-1969.
- Oral, B.**, 2010. laktik asit bakterilerinde tür içi ve türler arası ayırmada 16S-ARDRA tekniğinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, 223 s.
- Otutumi, L. K., Gois, M. B., Garcia, E. R. de M. and Loddi M.M.**, 2012. Variations on the Efficacy of Probiotics in Poultry, *Probiotic in Animal*, Rigobelo, E. C (Ed.), InTech, Brazil, 284p.
- Ouwehand, AC., Tolkkko, S., Kulmala, J., Salmine, S., Salmine, E.**, 2000. Adhesion of inactivated probiotic strains to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 31: 82-86.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Özdemir, Y., Tuna –Keleştemur, G.,** 2009. Balık beslemede yem katkı maddesi olarak probiyotik kullanımının avantajları, *New World Sciences Academy Ecological Life Sciences*, 4(1): 6-11.
- Öztürk, R. Ç. ve Altınok, İ.,** 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 275-297 doi: 10.4194/1303-2712-v14\_1\_30.
- Panigrahi, A., Azad, I.S.,** 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the indian scenario, *Fish Physiological Biochemistry*, 33:429-440, doi:10.1007/s10695-007-9160-7.
- Parker, R.B.,** 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health* 29, 4-8.
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J.L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Merrifield, D.L., Ruiz-Zarzuela, I.,** 2011. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*. 34(7):499–507.
- Pieters, N., Brunt, J., Austin, B., Lyndon, AR.,** 2008. Efficacy of in-feed probiotics against *Aeromonas bestiarum* and *Ichthyophthirius multifiliis* skin infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) *Journal of Applied Microbiology*. 105:723-732.
- Pilet, M.F., Dousset, X., Barr'e, R., Novel, G., Desmazeaud, M., Piard, J.C.,** 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 58, 256-262.
- Plumb, J.A. and Hanson, L.A.,** 2011. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fish. Third ed. Wiley-Blackwell, Iowa, USA. 244 pp doi: 10.1002/9780470958353.ch11.
- Pineiro, M. and Stanton, C.,** 2007. Probiotic bacteria: Legislative framework-requirements to evidence basis, *Journal of Nutrition*, 137:850–835.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K., Schleife, K-H.,** 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA targeted oligonucleotid probe hybridization, *Journal of General Microbiology*, 139: 513-517.
- P.Soto, Lorena., S.Frizzo, Laureano., Bertozzi, Ezequiel., Avataneo, Elizabeth., J.Sequeira, Gabriel., R.Rosmini, Marcelo.,** 2010. Molecular Microbial Analysis of *Lactobacillus* Strains Isolated from the Gut of Calves for Potential Probiotic Use, *Veterinary Medicine International*, doi: 10.4061/2010/274987.
- Pundir, R. K., Rana, S., Kashyap, N., Kaur, A.,** 2013. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: an in vitro study, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (3)-85.
- Qi, Z., Zhang, X.H., Boon, N., Bossier, P.,** 2009. Probiotics in aquaculture of China-Current state, problems and prospect. *Aquaculture*, 290: 15-21.
- Rajput-Imran, R., Li-Wei, F.,** 2011. Potential Role of Probiotics in Mechanism of Intestinal Immunity, *Pakistan Veterinary Journal*, 32(3):303-308.
- Reginensi, S.M., González, M.J., Bermúdez, J.,** 2013 Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 2, 427-430.
- Ringø, E., Bendiksen, H.R., Olsen, R.E.,** 1997. The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia Arctic charr, *Salvelinus alpinus* \_L. *Journal of Applied Microbiology*
- Ringo, E., Vadstein, O.,** 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology*. 84:227-233.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Ringø, E., Gatesoupe, F.J.,** 1998a. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* 160: 177–203.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J.,** 1998b. Lactic acid bacteria in fish: a review, *Aquaculture* 160, 177–203.
- Ringo, E.,** 2004. Lactic Acid Bacteria in Fish and Fish Farming. In: Lactic Acid Bacteria, Salminen, S., A. Ouwehand and A. Von Weight (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, USA, p:581-610.
- Ringo, E., Lovmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R.E., Mayhew, T.M.,** 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastro-intestine of fish: a review, *Aquaculture Research*, 41:451-467.
- Rollo, A., Sulpizio, R., Nardi, M., Silvi, S., Orpianesi, C., Caggiano, M., Cresci, A., Carnevali, O.,** 2006. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 32:167-177.
- Romero, J., Feijóo-Carmen G. and Navarrete, P.,** 2012. Antibiotics in Aquaculture –Use, Abuse and Alternatives, Chapter 6, Health and environment in aquaculture Edited by Edmir Daniel Carvalho, Gianmarco Silva David and Reinaldo J. Silva, Published by Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
- Roy, D., Sirois, S., Vincent, D.,** 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis, *Current Microbiology* 42(4):282-289.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Sandholm, T.M.,** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84; 197-215.
- Sahu, M.K., Swarnakumar, N.S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L.,** 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology* 48: 299–308.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Shuman, H.A.**, 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1625p.
- Sarıca, Ş.**, 1999. Kanatlı hayvan beslemede probiyotik kullanımı. *Hayvansal Üretim*, 39-40, 105-112.
- Savaş, H., Türe, M.**, 2007. Bölgemizde Doğal Ve Kültürü Yapılan Balıklarda Görülen Hastalıklar, *Yunus Araştırma Bülteni*.
- Schleifer, K.H.**, 1986. Gram-positive cocci. pp. 999–1103. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Schleifer, K.H.** 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 46, 201-203.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. and Amann, R.**, 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5: 1081-1094.
- Shah, N.P., Lankaputhra, W.E.V.**, 1997. Improving Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in Yoghurt. *International Dairy Journal* 7:349-356.
- Sharpe, M.E., Skinner, F.A., Lovelock, D.W.**, 1979. Identification of the lactic acid bacteria. 246–255. In *Identification Methods for Microbiologists*. 2nd Ed. Academic Press: London.
- Singh, S.D., Nayak. S.K., Sekar. M., Behera. B.K.**, 2008. Applications of nutritional biotechnology in aquaculture. *Res. & farming tech.*, 17-23. <http://library.enaca.org/AquacultureAsia/Articles/oct-dec-2008/singh-oct-08.pdf>. (01.07.14).

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Spratt-Brian, G.**, 1999. "Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet". *Current Opinion in Microbiology* **2** (3):312–316.
- Spratt, B.G., Maiden, M.C.**, 1999. "Bacterial population genetics, evolution and epidemiology". *Philosophical Transaction of the royal Society B: Biological Sciences*, 354 (1384): 701–710.
- Stackebrand, E., Teuber, M.**, 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70, 317-324.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H.**, 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36; 1-29.
- Subasinghe, R., Soto, D., Jia, J.**, 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1: 2-9.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C. and Lee, W.J.**, 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science*, 72, 310-21.
- Tanrikul, T.T. ve Çağırğan, H.**, 2001. Doğadaki kefal balıklarında görülen pasteurellosis salgını. *E.U. Su Ürünleri Dergisi*, 18 (3): 509-512.
- Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A.**, 2010. Acid And Bile Tolerance, Antibacterial Activity, Antibiotic Resistance And Bacteriocins Activity Of Probiotic *Lactobacillus* Species, *Recent Research in Science and Technology*, 2(4):94-98.
- Tanrikul, T.T.**, 2007. Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1737- 1737.
- TC Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü**, 2013, I. Balıkçılık Çalıştayı Sonuç Raporu, 4-6 Kasım Antalya.

**KAYNAKLAR DİZİNİ** (Devam)

- Tekinşen OC., Atasever M.,** 1994. Süt Ürünleri Üretiminde Starter Kültür, S.Ü. Vet. Fak. Yayın Ünitesi, Konya.
- Temmermann, R., Huys, G., Swings, J.,** 2004. Identification of lactic acid bacteria: Culture-dependent and cultureindependent methods, *Trends in Food Science & Technology*, 15: 348-359.
- Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E.,** 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6); 807-813.
- Timmermans, L.P.M.,** 1987. Early development and differentiation in fish. *Sarsia*,72, 331–339.
- Tuan, T.N., Duc, P.M., Hatai, K.,** 2013. Overview of the use of probiotics in aquaculture. *International Journal of Research In Fisheries and Aquaculture*, 3(3):89-97.
- Tukmechi, A., Morshedi, A., Delirezh, N.,** 2007. Changes in intestinal microflora and humoral immune response following probiotic administration rainbow trout *Oncorhyncus mykiss*. *Journal of Animal Veterinary Advances* 6(10):1183-1189.
- Ünlütürk, A., Turantaş, F.,** 1999. Gıda Mikrobiyolojisi 2.Baskı, Mengi Tan Basımevi, İzmir.
- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., Collins, M.D.,** 1990. 16 S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 224–230.
- Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M.,** 1990. Probiotics in animal nutrition: a review, *Archives of Animal Nutrition*, 40(7), 543-567.
- Vershuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W.,** 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 655-671.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de., Hornes, Miranda., Frijters, Adrie., Pot, Jerina., Peleman Johan., Kuiper Martin., Zabeau Marc.,** 1995. A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acid Research*, 23(21):4407-4414.
- Wang, Y.B., Zi-Qiang, T., Jiang T. and Wei-fen, L.,** 2008, Effect of probiotic, *Enterococcus faecium* on tilapia (*O. niloticus*) growth performance and immune response, *Aquaculture*, 277: 203-207.
- WHO.,** 2006. Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance: Seoul, Republic of Korea, 13-16.
- William, A.S., Rouse, H., Champe, P. and Harvey, A.R.,** 2001. Lippincott's Illustrated Reviews Microbiology. *Lippincott Williams&Wilkins.*
- Woese, C.R.,** 1987. Bacterial evolution, *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.
- Yaman- Öztürk, F.,** 2007. Levrek balıklarında (*dicentrarchus labrax*) probiyotik olarak *lactobacillus rhamnosus* kullanılması performans üzerine etkisi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 76s.
- Yang, H.L., Y.Z. Sun, R.L. Ma, K. Song, K. Wang and W.Y. Lin,** 2010. Antagonistic property of lactic acid bacteria mm1 and MM4 isolated from the intestine of grouper *Epinephelus coioides*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 41(4):544-548.
- Yanbo W., Zirong X.,** 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities *Animal Feed Science and Technology*, 127:283-292.
- Yaygın H., Kılıç S.,** 1993. Süt Endüstrisinde Saf Kültür, Altındağ Matba, İzmir.
- Yıldız, H.,** 2011. Turşu ve **zeytinlerden** laktik asit bakterileri ile mayaların izolasyonu, identifikasyonu ve elde edilen izolatların bazı özelliklerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, 134s.



**KAYNAKLAR DİZİNİ** (devam)

- Yörük, N.G. ve Güner, A.,2011.** Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve *Weissella* Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2): 163-176.
- Yun-Zhang, S., Hong-Ling, Y., Ru-Long, M., Wen-Yan, L.,** 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improves the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*, *Fish and Shellfish Immunology*, 29:803-809.
- Zhou, Xuxia. and Wang, Y.,** 2012. Probiotics in Aquaculture - Benefits to the Health Chapter 8, Technological Applications and Safety Agricultural and Biological Sciences » "Health and Environment in Aquaculture", book edited by Edmir Daniel Carvalho, Gianmarco Silva David and Reinaldo J. Silva, ISBN 978-953-51-0497-1, doi: 10.5772/29037.
- Zhou, X., Yanbo, W., Jiangtao, Yao. and Weifen, L.,** 2010. Inhibition ability of probiotic, *Lactococcus lactis*, against *A. hydrophila* and study of its immunostimulatory effect in tilapia (*Oreochromis niloticus*), *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(7) 73-80.

## ÖZGEÇMİŞ

### **KİŞİSEL BİLGİLER**

**Soyadı** : HANOL BEKTAŞ  
**Adı** : Zübeyde  
**E-mail** : zubeydehanol17@gmail.com  
**Doğum tarihi** : 18.03.1983  
**Doğum Yeri** : Merkez/ADİYAMAN

### **EĞİTİM**

**İlkokul** : 100.yıl İlköğretim Okulu (1989 – 1994)  
**Ortaokul** : Menderes İlköğretim Okulu (1994 – 1997)  
**Lise** : Menderes Lisesi (1997 – 2000)  
**Lisans** : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2000 – 2005)  
**Yüksek Lisans** : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2006 – 2009)  
**Doktora** : Ege Üni., Fen Fak., Biyoloji Böl., Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji A.B.D. (2010 – 2016)

### **Yüksek Lisans Tezi**

Çevresel Biyoteknolojide Uygulama Potansiyeline Sahip Metilotrofik Mayaların İzolasyon ve İdentifikasyonları

### **Doktora Tezi**

Tatlı Su Balıklarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Moleküler Biyolojik İdentifikasyonu ve Gökkuşacağı Alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*)’nda Probiyotik olarak kullanılabilme Potansiyellerinin Araştırılması