

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Sevkan ÖZÜTOK

**KUZEYDOĞU AKDENİZ’DE YETİŞTİRİCİLİK VE DOĞAL
KOŞULLAR ALTINDAKİ ÇİPURA (*Sparus aurata* LİNNAEUS
1758)’LARIN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDAN İZOLE
EDİLEN POTANSİYEL PROBİYOTİK BAKTERİLERİN
TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÖZ

DOKTORA TEZİ

KUZEYDOĞU AKDENİZ'DE YETİŞTİRİCİLİK VE DOĞAL KOŞULLAR ALTINDAKİ ÇİPURA (*Sparus aurata* LINNAEUS 1758)'LARIN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDAN İZOLE EDİLEN POTANSİYEL PROBİYOTİK BAKTERİLERİN TANIMLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sevkan ÖZÜTOK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİK ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Aysel ŞAHAN
: Yıl: 2020, Sayfa:126
Jüri : Prof. Dr. Aysel ŞAHAN
: Prof. Dr. Mahmut YANAR
: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Yasemin BİRCAN YILDIRIM
: Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN

Bu çalışmada, Kuzeydoğu Akdeniz'de doğa ve yetiştiricilik ortamında yer alan çipura (*Sparus aurata*) bağırsak mikrobiyotasından izole edilen potansiyel probiyotik bakteriler, moleküler olarak tanımlanmış ve probiyotik bakterilerde bulunması gereken *in vitro* kriterler belirlenerek, değerlendirilmiştir. Doğadan elde edilen çipuraların bağırsak toplam aerobik bakteri sayısının (10^5 - 10^9 kob/mL), yetiştiricilikten elde edilen çipuraların bağırsak toplam aerobik bakteri sayısından (10^3 - 10^7 kob/mL) oldukça yüksek olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Doğadan elde edilen hidrofobik karakter gösteren izolat sayısının (17 suş), yetiştiricilikten elde edilen izolat sayısı (4 suş)'ndan daha fazla olduğu belirlenmiştir. İzole edilen potansiyel probiyotik bakteriler; *Rothia dentocariosa* (293bç), *Kocuria rosea* (285bç), *Kocuria kristinae* (480bç), *Acinetobacter lwoffii* (400bç), *Pseudomonas flourecens* (351bç), *Streptococcus sanguis* (238bç), *Kocuria varians* (220bç) PZR ile genotipik olarak tanımlanmıştır. Doğada yaşayan çipuraların probiyotik bakteri çeşitliliğinin daha zengin olduğu görülmüştür. Bu doktora tezi kapsamında, önemli probiyotik özellik gösteren *Rothia dentocariosa*, *Acinetobacter lwoffii*, *Kocuria rosea* ve *Pseudomonas flourecens* türlerinin yem katkısı olarak kullanılabilecek etkin probiyotik karaktere sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çipura (*Sparus aurata*), Probiyotik, Genotipik Tanımlama, Probiyotik Karakterizasyon.

ABSTRACT

PhD THESIS

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POTENTIAL
PROBIOTIC BACTERIA ISOLATED FROM SEA BREEM (*Sparus aurata*
LINNAEUS 1758) INTESTINAL MICROBIOTA UNDER
AQUACULTURE AND WILD CONDITIONS IN NORTHEASTERN
MEDITERRANEAN**

Sevkan ÖZÜTOK

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES DEPARTMENT
OF AQUACULTURE**

Supervisor : Prof. Dr. Aysel ŞAHAN
: Year: 2020, Page:126
Jury : Prof. Dr. Aysel ŞAHAN
: Prof. Dr. Mahmut YANAR
: Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Prof. Dr. Yasemin BİRCAN YILDIRIM
: Assoc. Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN

In this study, potential probiotic isolated from intestinal microbiota of sea bream (*Sparus aurata*) obtained from wild and aquaculture in the Northeastern Mediterranean, was identified as molecularly and *in vitro* criteria that must be found in potential probiotic bacteria were determined and evaluated. Total aerobic intestinal bacterial count of sea bream captured from wild were found (10^5 - 10^9 cfu/mL) higher than, the total aerobic intestinal bacterial count (10^3 - 10^7 cfu/mL) of sea bream taken from aquaculture system ($p \leq 0,01$). It was determined that the number of isolates (17 strains) that show hydrophobic character obtained from wild is higher than the number of isolates (4 strains) obtained from aquaculture system. Isolated potential probiotic bacteria as *Rothia dentocariosa* (293bp), *Kocuria rosea* (285bp), *Kocuria kristinae* (480bp), *Acinetobacter lwoffii* (400bp), *Pseudomonas flourecens* (351bp), *Streptococcus sanguis* (238bp), *Kocuria varians* (220bp) were identified as genotypic by PCR. It has been observed that the probiotic bacteria diversity of sea bream captured in wild were richer. Within the scope of this doctoral thesis, it was concluded that the strains, *Rothia dentocariosa*, *Acinetobacter lwoffii*, *Kocuria rosea* and *Pseudomonas flourecens* showing important probiotic properties can be used as feed additives.

Key Words: Sea Bream (*Sparus aurata*), Probiotic, Genotypic Identification, Probiotic Characterization.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Kuzeydoğu Akdeniz’de doğa (Tuzla Milli Parkı lagünü) ve yetiştiricilik (kıyıdan uzak yüzen kafeslerde) ortamlarından toplam 50 adet çipura (*S. aurata*)’nın toplam bağırsak bakteri yükü, potansiyel probiyotik bakterilerin moleküler olarak tanımlanması ve *in vitro* olarak bakterilerin probiyotik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, aynı yıl içerisinde ve bahar mevsiminde örneklemeler yapılmıştır. Dolayısıyla, su analiz değerlerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Yetiştiricilik koşullarının sınırlı birim de gerçekleşmesi ve yemlemenin düzenli ve sık olması nedeniyle örneklenen balıkların ağırlıkları, doğadan elde edilen çipuralardan daha fazla bulunmuştur. Doğadan elde edilen çipuraların bağırsak toplam aerobik bakteriyel yükünün 10^5 - 10^9 kob/mL, yetiştiricilikten elde edilen çipuraların bağırsak toplam aerobik bakteriyel yükünden (10^3 - 10^7 kob/mL) oldukça fazla olduğu görülmüştür. Doğadan alınan balıkların genel mikrobiyota izolasyonunda toplam 95 adet izolat, yetiştiricilikten toplam 29 adet izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlara biyokimyasal testler uygulanıp, sınıflandırılmıştır.

Doğadan elde edilen hidrofobik karakter gösteren izolat sayısı (17 suş)’nın, yetiştiricilikten elde edilen izolat sayısı (4 suş)’ndan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen hidrofobik karaktere sahip bakterilere, fenotipik tür ve aileye tanımlaması yapılmıştır. Buna göre *Rothia dentocariosa* (293bç), *Kocuria rosea* (285bç), *Kocuria kristinae* (480bç), *Acinetobacter lwoffii* (400bç), *Pseudomonas fluorescens* (351bç), *Streptococcus sanguis* (238bç), *Kocuria varians* (220bç) suşlarının moleküler açıdan kanıtlanmasında, 16S rDNA üzerinde genotipik olarak tür tanımlaması yapılmıştır.

Doğa ve yetiştiricilikten izole edilen ve tanımlanan tüm potansiyel probiyotik bakteriler; 25°C, 37°C, 45°C sıcaklıklarda canlılığını korurken, 4 ve 15 °C’de canlılıklarını sürdürememişlerdir. Sadece doğadan elde edilen potansiyel

probiyotik bakterilerden, *K. rosea*'nın 2 suşu ve *A. lwoffii* suşları pH 1; 3; 7'de canlılığını sürdürebilmiş ve kuvvetli bir üreme potansiyeli sergilemiştir. Doğa ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *R. dentocariosa*'nın 4 suşu, *K. rosea*'nın 5 suşu, *P. flourecens*'e ait 2 suş pH 3 ve 7'de canlılığını sürdürebilmiştir. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *R. dentocariosa*'nın 2 suşu, *K. rosea*'nın 1 suşu, *A. lwoffii*'nin 2 suşu, *S. sanguis* ve *P. flourecens*; yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden *R. dentocariosa* ve *P. flourecens* suşları %0,6; 1; 1,5 safra oranlarında canlılıklarını korumuşlardır. Ancak doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *R. dentocariosa*'ya ait 2 suş ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *K. varians* hiçbir safra oranında yaşamını sürdürememiştir. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *K. rosea*'nın 6 suşu, *K. kristinae*'nin 2 suşu, *A. lwoffii*'nin 2 suşu ve *S. sanguis* suşları ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *K. rosea* ve *K. varians* suşları pepsinin pH 1,5 ve pH 3 asitlik değerlerinde canlılığını sürdürmüştür. Potansiyel probiyotik bakterilerden sadece yetiştiricilikten izole edilen *P. flourecens* suşu pepsin+pH 3'te varlığını sürdürememiştir. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *R. dentocariosa*'nın 4 suşu, *A. lwoffii*'nin 2 suşu, *P. flourecens* suşları; yetiştiricilikten izole edilen potansiyel probiyotik bakteriler *P. flourecens* ve *K. varians* suşları siderofor oluşturma yeteneğine sahiptir. Bakteriyosin üretimini doğadan elde ettiğimiz potansiyel probiyotik bakterilerden, sadece *R. dentocariosa*'ya ait 2 suş gerçekleştirmiştir. Doğadan izole edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *R. dentocariosa*'nın 4 suşu *K. rosea*'nın 3 suşu *A. lwoffii*'e ait 2 suş ve *P. flourecens* suşları *Vibrio fluvialis*'e karşı antagonizma geliştirmiştir. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerden *R. dentocariosa* ve *P. flourecens* suşları *V. fluvialis*'e karşı antagonizma göstermiştir. Doğadan elde ettiğimiz potansiyel probiyotik bakterilerden *K. rosea*'nın 2 suşu ve *K. kristinae*'nin 1 suşu ve *S. sanguis* suşları sadece eritromisine karşı direnç göstermiştir. Yetiştiricilikten izole edilen potansiyel probiyotik bakterilerden; *P. flourecens*'in eritromisine,

sulfametoksazol/trimetoprim ve amoksisillin/klavulanik asite; *K. varians*'ın ise eritromisin ve amoksisillin/klavulanik asite karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir.

Kültür balıkçılığı hastalıklarını ve doğada ki antibiyotik yükünü kontrol etmek için yeni ve etkin probiyotikleri arama çalışmaları ilgi odağı haline gelmiştir. Bağırsak bakteriyel florası, konağın bağışıklık sistemini geliştiren, koruyan ve geliştirmenin yanı sıra, konağa besinlerin sindiriminde kolaylık sağlayan kilit aktörlerdir. Memelilerden farklı olarak, balıkların bağırsak mikrobiyotasının, çoğunlukla onları çevreleyen sudan oluştuğu ve mikrobiyal bileşimlerin içinde bulunduğu habitatları tarafından zaman içinde şekillendiği bilimsel çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bağırsak mikrobiyotasının oluşumu, gelişimi ve oluşabilecek değişikliklerin kayıt altına alınması, balık fizyolojisi ve beslenmesini doğala en yakın hale getirme çabaları, gelecekte fayda sağlayacaktır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde saf probiyotik bakteri suşlarının seçimi, tanımlanması ve probiyotik karakterler ortaya konarak, deneysel verilerin laboratuvar dan endüstriye yönlendirilmesi gerekmektedir.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim sürecimde bilgi, tecrübe ve fikirlerinden faydalandığım, her konuda her zaman destek olan danışman hocam Prof. Dr. Aysel ŞAHAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezime katkılarından dolayı Prof. Dr. Mahmut YANAR, Prof. Dr.Zerrin ERGİNKAYA, Prof. Dr. Yasemin BİRCAN YILDIRIM ve Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN'ne çok teşekkür ederim.

Bilgi birikim ve deneyimlerini esirgemedi sunan Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a, analizlerimin her aşamasında yardımını esirgemeyen Dr. Melda MERAL ÖCAL'a, genetik araştırmalarda yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Sami SERİN'e, çalışmamın örnek toplama kısmında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Gökhan GÖKÇE'ye, değerlendirme aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mahmut Ali GÖKÇE'ye teşekkür ederim.

Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarındaki her türlü destek ve yardımları için Prof. Dr. Sadık DİNÇER ve Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında ki yardımları için Prof. Dr. Akgün YAMAN hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarına olan katkılarından dolayı ayrıca Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca beni bugünlere getiren ve her zaman yanımda olan annem Ayşe Lale MUĞLU ve babam Mehmet MUĞLU'ya, bana olan inancı ve desteği için eşim Onur ÖZÜTOK'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
2.1. Balıklarda Bakteriyel Flora.....	11
2.2. Denizel Türlerden Yapılan İzolasyonlar ve Kullanılan Probiyotikler	14
2.3. Tatlı Su Türlerinden Yapılan İzolasyonlar ve Kullanılan Probiyotikler	19
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Araştırma Alanları	25
3.1.2. Balık Materyali	27
3.1.3. Araştırma Alanlarındaki Su Analizleri	28
3.2. Metod	29
3.2.1. Mikrobiyolojik Uygulamalar Öncesi Ön Hazırlık	29
3.2.2. Toplam Mezofil Aerobik Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması	29
3.2.3. Toplam Aerobik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi	30
3.2.4. Aerobik Bakterilerin Hidrofobisite Özelliklerinin Belirlenmesi	31
3.2.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Tür Tanımlamaları.....	31
3.2.5.1. Potansiyel Probiyotik Baktelerin Fenotipik Tür Tanımlamaları	31

3.2.5.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Genotipik Tür	
Tanımlamaları	32
3.2.5.2.(1). Gram-pozitif Bakteriler için 16S rDNA	
Ekstraksiyonu.....	32
3.2.5.2.(2). Gram-negatif Bakteriler için 16S rDNA	
Ekstraksiyonu.....	32
3.2.5.2.(3). Amplifikasyon	33
3.2.5.2.(4). Elektroforez	34
3.2.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karakterizasyonu.....	36
3.2.6.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Sıcaklık Toleranslarının	
Belirlenmesi	36
3.2.6.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Asite Karşı Direnç	
Özelliklerinin Belirlenmesi	36
3.2.6.3. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzlarına Karşı	
Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	37
3.2.6.4. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Pepsine Karşı Direnç	
Özelliklerinin Belirlenmesi	37
3.2.6.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Siderofor Üretim	
Yeteneğinin Belirlenmesi.....	38
3.2.6.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin <i>Vibrio fluvialis</i> 'e Karşı	
Gösterdiği Antagonistik Etkinin Belirlenmesi	38
3.2.6.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık	
Düzeylerinin Belirlenmesi	39
3.2.7. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Bulgular.....	41
4.1.1. Araştırma Alanlarındaki Su Analizleri	41
4.1.2. Balıkların Boy ve Ağırlıkları	41
4.1.3. Toplam Aerobik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi	42

4.1.4. Kullanılan Besiyerlerine Göre Bakterilerin Dağılımı	44
4.1.5. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri.....	45
4.1.6. İzolatların Hidrofobisite Özelliklerinin Belirlenmesi	48
4.1.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Tür Tanımlamaları.....	49
4.1.7.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Tür Tanımlamaları	49
4.1.7.1.(1). Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Familya Düzeyinde Sınıflandırılması	51
4.1.7.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Genotipik Tür Tanımlamaları: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	53
4.1.8. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karakterizasyonu.....	56
4.1.8.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi.....	56
4.1.8.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Asite Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	57
4.1.8.3. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzlarına Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi.....	61
4.1.8.4. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Pepsine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	64
4.1.8.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Siderofor Üretim Yeteneğinin Belirlenmesi	67
4.1.8.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin <i>Vibrio fluvialis</i> 'e Karşı Gösterdiği Antagonistik Etkinin Belirlenmesi	70
4.1.8.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi.....	73
4.2. Tartışma	77
4.2.1. Araştırma Alanlarındaki Su Analizleri	77
4.2.2. Balıkların Boy ve Ağırlıkları	78
4.2.3. Toplam Aerobik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi	79

4.2.4. Kullanılan Besiyerlerine Göre Bakterilerin Dağılımı ve İzolatların	
Biyokimyasal Özellikleri	80
4.2.5. İzolatların Hidrofobisite Özelliklerinin Belirlenmesi	82
4.2.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Tür Tanımlamaları.....	83
4.2.6.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Tür ve Familya	
Düzeyinde Sınıflandırılması	83
4.2.6.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Genotipik Tür	
Tanımlamaları.....	85
4.2.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karakterizasyonu.....	86
4.2.7.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Sıcaklık Toleranslarının	
Belirlenmesi.....	86
4.2.7.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Asite Karşı Direnç	
Özelliklerinin Belirlenmesi.....	87
4.2.7.3. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzlarına Karşı	
Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi.....	88
4.2.7.4. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Pepsine Karşı Direnç	
Özelliklerinin Belirlenmesi.....	90
4.2.7.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Siderofor Üretim	
Yeteneğinin Belirlenmesi	91
4.2.7.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin <i>Vibrio fluvialis</i> 'e Karşı	
Gösterdiği Antagonistik Etki	92
4.2.7.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık	
Düzeylerinin Belirlenmesi	93
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	123
EKLER.....	124

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Çipura ekstrüde yem içeriği.....	27
Çizelge 4.1. Araştırma alanlarındaki su parametreleri.....	41
Çizelge 4.2. Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen balıklarda boy ve ağırlık değerleri*	42
Çizelge 4.3. Doğa ve yetiştiricilik ortamlarından elde edilen balık bağırsaklarındaki koloni sayımları.....	43
Çizelge 4.4. Kanlı agardan izole edilen aerobik mikroorganizmaların biyokimyasal özellikleri.....	46
Çizelge 4.5. İzolatların hidrofobisite özelliği.....	48
Çizelge 4.6. Potansiyel probiyotiklerin fenotipik tür tanımlamaları.....	50
Çizelge 4.7. Potansiyel probiyotik bakterilerin familya düzeyinde sınıflandırılması	52
Çizelge 4.8. Potansiyel probiyotik bakterilerin PZR protokolü.....	53
Çizelge 4.9. Potansiyel probiyotik bakterilerin sıcaklık toleransları	56
Çizelge 4.10. Potansiyel probiyotik bakterilerin asit toleransları	59
Çizelge 4.11. Potansiyel probiyotik bakterilerin safra tuzlarına karşı toleransları	62
Çizelge 4.12. Potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı toleransları.....	65
Çizelge 4.13. Potansiyel probiyotik bakterilerin siderofor yetenekleri.....	68
Çizelge 4.14. Potansiyel probiyotik bakterilerin <i>V. fluvialis</i> 'e karşı gösterdiği antagonizma	71
Çizelge 4.15. Antibiyotik duyarlılık testi*	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1 Balık materyalinin elde edildiği, Tuzla Milli Parkı Dalyanı.....	25
Şekil 3.2. Balık materyalinin elde edildiği Tuzla milli parkı dalyan bölgesi.....	26
Şekil 3.3. Balık materyalinin elde edildiği yetiştiricilik ünitesi bölgesi	26
Şekil 3.4. Balık materyalinin elde edildiği yetiştiricilik ünitesi yüzer ağ kafes sistemleri.....	27
Şekil 3.5. Analiz balıkları iç bakı ve dış bakı.....	28
Şekil 3.6. Termal döngü cihazı	33
Şekil 3.7. Elektroforez düzeneği	35
Şekil 3.8. Jel görüntüleme sistemi.....	34
Şekil 4.1. Doğa ve yetiştiricilik ortamlarından elde edilen balıklarda koloni sayımları.....	44
Şekil 4.2. Kültür ortamlarına göre bakterilerin üreme dağılımları.....	45
Şekil 4.3. Gram pozitif bakterilerin ışık mikroskobu görüntüsü	46
Şekil 4.4. Gram negatif bakterilerin ışık mikroskobu görüntüsü.....	46
Şekil 4.5. Kanlı agardan izole edilen aerobik bakterilerin biyokimyasal özellikleri.....	47
Şekil 4.6. VRBD agarda üreyen Gram negatif Enterobacteriaceae familyasının biyokimyasal özellikleri.....	47
Şekil 4.7. Hidrofobisite pozitif izolatlar.....	48
Şekil 4.8. Hidrofobisite negatif izolatlar.....	48
Şekil 4.9. İzolatların alındığı bölgeye göre, hidrofobisite pozitif türlerin oranı.	49
Şekil 4.10. Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin tür dağılımı.....	51
Şekil 4.11. Doğadan ve yetiştiricilikten izole edilen potansiyel probiyotik bakterilerin oransal dağılımı.....	52
Şekil 4.12. <i>K. rosea</i> bant görüntüsü	54

Şekil 4.13. <i>K. kristinae</i> bant görüntüsü.....	54
Şekil 4.14. <i>S. sanguis</i> bant görüntüsü.....	54
Şekil 4.15. <i>A. lwoffii</i> bant görüntüsü	55
Şekil 4.16. <i>P. flourecens</i> bant görüntüsü.....	55
Şekil 4.17. <i>R. dentocariosa</i> bant görüntüsü	55
Şekil 4.18. <i>K. varians</i> bant görüntüsü.....	55
Şekil 4.19. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin inkübasyon sıcaklık toleransları.....	57
Şekil 4.20. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin inkübasyon sıcaklık toleransları.....	57
Şekil 4.21. Potansiyel probiyotik bakterilerin asit tolerans görüntüleri.....	60
Şekil 4.22. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin asit toleransları.....	60
Şekil 4.23. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin asit toleransları.....	61
Şekil 4.24. Potansiyel probiyotik bakterilerin safraya karşı dirençleri.....	63
Şekil: 4.25. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin safra tuzlarına karşı toleransları.....	63
Şekil 4.26. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin safra tuzlarına karşı toleransları.....	64
Şekil 4.27. Potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı dirençleri.....	66
Şekil 4.28. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı toleransları.....	66
Şekil 4.29. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı toleransları.....	67
Şekil 4.30. Kültür ortamında siderofor üretim yeteneği sarı turuncu renk değişimi.....	69

Şekil 4.31. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin siderofor üretim yetenekleri.....	69
Şekil 4.32. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin siderofor üretim yetenekleri.....	70
Şekil 4.33. <i>Vibrio fluvialis</i> 'e karşı antagonistik etkinin kültürdeki görüntüleri.	72
Şekil 4.34. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin antagonistik etkileri.....	72
Şekil 4.35. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin antagonistik etkileri.....	73
Şekil 4.36. Müller-Hinton agar'da antibiyogram ölçümleri.....	76
Şekil 4.37. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerin antibiyotik duyarlılıkları.....	76
Şekil 4.38. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin antibiyotik duyarlılıkları.....	77



SİMGELER VE KISALTMALAR

FAO	:Food and Agriculture Organization
EC	:European commission
Cm	:Santimetre
EFSA	:Avrupa gıda güvenliği otoritesi
rRNA	:Ribozomal ribonükleik asit
rDNA	:Ribozomal deoksinribo nükleik asit
LAB	:Laktik asit bakterisi
km	:Kilometre
K	:Kuzey
D	:Doğu
Ltd	:Limited
G	:Gram
mS/cm	:Millisiemens/centimeter
°C	:Santigrat
‰	:Binde
g/l	:Gram/litre
mL	:Mililitre
dk	:Dakika
rpm	:Revolutions per Minute
µL	:Mikrolitre
MRS	:Man, Rogosa ve Sharpe
VRBD	:Violet Red Bile Dextrose
%	:Yüzde
H ₂ O ₂	:Hidrojen peroksit
N	:Orijinal suspansiyondaki mikrop sayısı
V	:Petri kutularına ekilen inokulum miktarı

X	:Ortalama mikrop sayısı
D	:Dilasyonun ters logaritması
TSA	:Tryptic soy agar
BOPP	:Biaxially oriented polypropylene polipropilenin
TPX	:Thiol peroxidase
nm	:Nanometre
β	:Beta
TE	:Tris+edta
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
sn.	:Saniye
TBE	:Tri:s+borat+edta
bç	:Baz çifti
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
EDTA	:Etilen diamin tetra asetik asit
mg/mL	:Miligram/mililitre
PBS	:Phosphate buffered saline
kob/mL	:Koloni oluşturan bilim/mililitre
CPCA	:Chrome plate count agar
CAS	:Crom azurol s
E	:Eritromisin
ENR	:Enrofloksasin
SXT	:Sulfametoksazol /trimetoprim
AMC	:Amoksisillin/klavulanik asit
TE	:Tetrasiklin
w	:Wilcoxon sıra sayıları toplamı
EFSA	:Avrupa gıda güvenliği otoritesi

1. GİRİŞ

Dünya, bir yandan iklim değişikliğinden kaynaklanan sorunlarla mücadele ederken, diğer yandan 9 milyarı aşması beklenen hızlı nüfus artışının yarattığı yeterli, güvenli ve dengeli gıdayı sağlama sorunları ile karşı karşıya kalmıştır. Küresel ölçekte önemli bir gıda ve kazanç kapısı olan su ürünleri üretimi, 2016 itibarıyla 171 milyon tonluk bir rakama ulaşmış olup, bunda su ürünleri yetiştiriciliği %47'lik bir paya sahiptir. Gıda dışı kullanım (balık yemi ve balık yağı vb.) çıkarıldığında ise bu payın %53'e ulaştığı gözlenmiştir (FAO, 2018). FAO (2018)'nin çalışmalarında, ekolojik veriler ışığında; önümüzdeki yıllarda avlama yoluyla denizlerden elde edilecek su ürünleri miktarında azalma olacağı öngörüsü, yetiştiricilik sektöründeki büyümenin daha da artacağını göstermiştir. Türkiye'de denizlerden yetiştiricilik yoluyla üretilen balıkların %54'ünü levrek (*Dicentrarchus labrax*), % 37'sini çipura (*Sparus aurata*) ve %5'ini alabalık (*Salmo trutta*) oluşturmaktadır. Türkiye çipura yetiştiriciliğinde, dünya çapında Yunanistan ve İspanya ile birlikte en fazla üretim yapan ülke durumuna gelmiştir (EC, 2017).

Araştırma konusu çipura'ya hemen hemen tüm Akdeniz'de rastlanmakla birlikte, Doğu ve Güneydoğu Akdeniz ülkelerinde, Kanarya adaları, İngiltere kıyıları, Verde Burnu ve nadir olarak Karadeniz kıyılarında rastlamak ta mümkün olmuştur. Ülkemizde ise daha çok Güney ve Ege Bölgeleri'nde yaygın olarak bulunmaktadır. Genellikle tropikal, subtropikal ve ılıman kuşaklarda yayılım gösteren çipura, çamurlu ortamların yanı sıra nehir ağızlarına ve lagüner bölgelere de girmektedir. (Saka ve Fırat, 2008).

Çipuranın büyüme hızı, bölgelere göre farklılık gösterebilir. Ege'de Aralık-Mart ayları arasında doğan yavrular, İlkbaharda 30-50 grama ulaşırken, 1. yaz sonunda ise 100 gramı geçerler. Çipuralar optimum büyümeyi 22-25°C'de gösterip, 6-32°C arası sıcaklıklarda yaşayabilirler. Çok soğuk sulardan hoşlanmaz ve aşırı sıcaklık değişimlerinde ölürlür. Bu nedenle dalyanları sonbaharda terk ederler.

%10-40 tuzluluğa dayanabilirler. Ülkemizde çipuraların üreme periyodu Ekim-Aralık ayları arasında olup, maximum boyları 70 cm ve ortalama uzunlukları 25-40 cm arasındadır (Saka ve Fırat, 2008).

Çipuraların bakterilerle olan ilk karşılaşması, fizyolojik gelişimindeki en önemli unsurlardan biridir. Bakteriyle karşılaşma, döllenmeden birkaç saat sonra yumurta yüzeyinde oluşan bakteriyel adezyon ve kolonizasyonla meydana gelmektedir. Yumurtadan çıkan larvalar suyla doğrudan teması geçip ve yem almaya başladığında, larvaların mikroflorası da yem ve suyun mikroflorasıyla paralel olarak gelişir (Hansen ve Olafsen, 1999). Zaman içinde gelişen sindirim kanalı yüzeyindeki epitel doku ile kommensal bakteriler arasında bir ilişki oluşur. Bağırsak mukozasındaki sindirim ve koruma dengesi, bu ilişki sayesinde sağlanmaktadır (Yan ve Polk, 2004).

Sucul hayvanların bağırsak mikrobiyotası yem ve sudan gelen mikroorganizmaların alınması ile hızla değişebilir. Deniz balıkları vücutlarındaki su kaybını önlemek için sürekli su içmek zorundadır. Çift kabuklular, karides larvası ve canlı yem organizmaları filtre ederek beslenenlerde, sürekli su akışı ile organizmayı çevreleyen ortamın mikrobiyotası da değişir. Bu değişim, gastrik bariyere sahip olmayan larvalarda oldukça yıkıcı olabilir. Bu nedenle canlı yemlerle alınan bakterinin etkisi, özellikle ilk yemleme sırasında önemlidir. (Gatesoupe, 1999). Ek olarak, birkaç çalışmada, larvalar beslenmeye başladıktan sonra, bağırsak mikrobiyotalarının suda bulunan bakterilerden değil, alınan canlı yemden kaynaklandığını ortaya konulmuştur (Muroga ve ark., 1986; Bergh ve ark., 1994; Munro ve ark. 1995; Griez ve ark., 1997).

Yapılan çalışmalarda bakterilerin nitel ve nicel özelliklerinin; balıkların türüne, gelişim durumuna, sindirim sistemi anatomisine ve beslenmesine göre değişkenlik gösterdiği, diğer yandan çevresel değişiklikler (sıcaklık, tuzluluk, bölgesel farklılıklar, mevsimler), yetiştiricilik tesislerinin tipi gibi faktörlere göre de değiştiği bildirilmiştir (Campbell ve Buswell, 1983; Sugita ve ark., 1988; Cahill, 1990; Sitja-Bobadilla ve ark., 2003; Al-Harbi ve Uddin, 2004; Heikkinen ve ark.,

2006; Ringo ve ark., 2006; Floris ve ark., 2013). Yoğun yetiştiricilik koşulları, denizel türlerin larvaları için mikrobiyal problemlerin oluşmasını kolaylaştırabilir. Larva yetiştiriciliğinin erken aşamalarında su değişiminin çok az ya da hiç olmaması, küçük larvalarda hassasiyete, yoğun larva stoğu ve ölü larva birikimleri ile yüksek organik madde yükünün artmasına neden olur (Skjermo ve Vadstein, 1999). Larvalarda oluşan bu stres hali, denizel türlerin beslenme faaliyetlerini azaltır, kültür koşullarında ise tüketilmemiş yem miktarını artıracığından, su kalitesinde bozulmalara neden olur (Sung ve ark., 2001).

Sediman yoğunluğunun artması, en sık karşılaşılan deniz kaynaklı fırsatçı patojen bakteri *Vibrio* spp.'nin sayıca artmasına neden olur. *Vibrio*'nun neden olduğu vibriosis, organik besinler açısından zengin sularda, en büyük ölüm sebebi olarak görülmektedir (Goarant ve ark., 1999).

Vibrionaceae familyasına ait *Vibrio* cinsi Gram-negatif, düz ya da hafif kıvrık 0,5-0,8 µm genişliğinde; 1,4-2,6 µm uzunluğunda çomakları içerir. Endospor ya da mikrokist oluşturmazlar (Sanders ve Fryer, 1988). Sıvı besiyerlerinde, tek ya da çok polar flagella ile hareketli olup, katı besiyerlerinde çok sayıda lateral flagella sentezleyebilirler (Baumann ve Furniss, 1994).

Vibriosis yüzyıllar boyunca bilinen bir hastalıktır ve ortaya çıkışı İtalya sahillerinde 1500'lü yıllara dayanmaktadır. *Vibrio* enfeksiyonlarını tanımlamak amacı ile 'kızıl veba', 'kızıl çıban', 'kızıl plak' ya da 'tuzlu su furunkulozisi' gibi isimler kullanılmışsa da 'vibriosis' günümüzde hastalığın genel adı olarak kabul edilmiştir (Bullock, 1987; Reed ve Francis-Floyd, 1996).

Vibriosisi kontrol etmek için çeşitli stratejiler önerilmiş olup, bu yönde, aşılar geliştirilmiştir. Ancak aşılar, su ürünleri yetiştiriciliğinde zaman ve emek yoğunluğunun fazla olması nedeniyle, genel bir hastalık kontrol önlemi olarak kullanılmazlar. Bu nedenle, yetiştiricilik sistemlerinde önemli miktarda antibiyotik ve kemoterapötik uygulamaları, su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisinin birçok yerinde hastalık kontrolü ve yem dönüşümünü artırmak için tercih edilen yöntem olmaya devam etmektedir. Ancak antimikrobiyal kimyasalların kötüye kullanılması

su ürünlerinde dirençli türlerin oluşmasına ve kimyasalların birikmesine yol açmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik direnci üzerine yapılan birkaç çalışmada, *Vibrio spp.*'nin 1990'da sadece 4 antibiyotiğe (eritromisin, kanamisin, penisilin G ve streptomisin) direnç gösterirken, yıllar içerisinde direnç geliştirilen antibiyotik sayısının 20'ye yükseldiği tespit edilmiştir (Eleonor ve Leobert, 2001).

Bu antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında yoğun olarak kullanımı, antibiyotiklerin dokularda birikmesine ve bağırsaktaki faydalı mikrobiyal popülasyonun azalmasına, normal bağırsak mikrobiyotasının dengesinin bozulması ve en kötüsü, antibiyotiklere dirençli bakteri nesillerinin oluşmasına neden olurlar. Bu tür direnç, ekolojik nişte diğer türlere de aktarılabilir ve mevcut genomun değişimine, plazmidler veya bakteriyofajlar aracılığıyla genetik materyalin hücreler arasında geçişine sebep olmaktadır (Gomez ve Balcazar, 2008; Nami ve ark., 2015).

Su ürünlerinde yapılan araştırmalarda en çok kullanılan moleküler tanımlama yöntemlerinin başında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gelmektedir. PZR; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özgül tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir (Schochetman ve Jones, 1988; Arda, 1995). Reaksiyon işleminde; kalıp DNA'nın sentezlenmesi, türe özgü primer sentezi, polimeraz enzimleri, deoksinükleotit-trifosfat (dNTP) karışımının (master mix) birleştirilmesi. Ardından, DNA'nın PZR ile çoğaltılması, bağlanma, uzama aşamasıyla PZR işlemi sonuçlanmaktadır. Seçilen DNA dizisi çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir. Böylece DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır. PZR işlemi, bakteriye özgü primer dizisinin DNA'ya bağlanmasıyla tam bir tür teşhisinin yapılmasına olanak sağlamaktadır (Walker ve Dounan, 1989; Türkyılmaz ve Esendal, 2002).

Avrupa Birliği kararları doğrultusunda, bir gıdanın güvenli gıda olabilmesi için, çiftlik balıklarının yaşam ve bağışıklık sisteminin güçlendirilip geliştirilmesi

gerekmektedir. Tüketicinin de bu bilgiler ışığında, katkı maddesi içermeyen doğal ürünler talep etmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda bilimsel araştırmalar, hastalıkların önlenmesi ve kontrolüne yönelik, kimyasal katkı maddeleri ve veteriner ilaçların özellikle de antibiyotik kullanımının azaltılmasına odaklanmıştır (Anderson, 1992). Hastalık kontrolünde antimikrobiyallerin kullanımına yönelik alternatif stratejiler geliştirilmesi, ekosistemin korunması açısından da önem arz etmektedir (You ve ark., 2005).

Doğal olana yönelik stratejiler insanoğlunu yeniden canlının doğasına döndürmüştür. Canlıların ekosisteminde bulunan mikroorganizmalar, temelde faydalı ve zararlı olmak üzere iki grupta incelenir ve sağlıklı bir konakta denge halindedirler. Faydalı mikroorganizmalar baskın mikrobiyotayı oluşturmakta ve mide-bağırsak sisteminde bulunan yemlerin sindirimine, vitamin üretimine ve zararlı mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların önlenmesine yardımcı oldukları bilinmektedir. Bu bağlamda, bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek konakçı sağlığı üzerinde de olumlu etkileri olan mikroorganizmalar “Probiyotik” olarak tanımlanmaktadır (Çakmakçı ve ark., 2012).

Parker (1974), probiyotikleri “bağırsak mikrobiyal dengesine katkı sağlayan organizma ve maddeler” olarak ifade etmiştir. Gram ve ark., (1999) tanımlamayı “konakçı hayvanın mikrobiyal dengesini olumlu yönde etkileyen canlı mikrobiyal takviye” olarak değiştirmiştir. Gatesoupe (2002) probiyotikleri, “sağlığı geliştirmek amacıyla mikrobiyal hücrelerin sindirim sistemine girebilecek ve canlı kalabilecek şekilde düzenlenmesi” olarak tanımlamıştır.

Probiyotiklerin işleyiş mekanizmaları ve yararlarını temel olarak maddeler halinde tanımlamak mümkün olacaktır:

1. Patojen bakteri ile rekabet eder.
2. Konağa sindirim enzimleri sağlar.
3. Probiyotik bakteri, suda bulunan organik veya toksik maddeleri ayrıştırarak su kalitesinin iyileşmesini sağlar.
4. Patojenlere karşı humoral ve hücrel bağışıklık yanıtını uyarır ve artırır.
5. pH seviyesini düşürerek mikrobiyal metabolizmanın değişimini sağlar (Balcazar ve ark., 2006).

Probiyotik bakteri, patojen bakteri ile besin, yer veya oksijen için rekabete girerek ya da patojen bakterinin gelişmesini engelleyecek maddeler üreterek, patojen bakterilerin ortamda azalmasını sağlamaktadır (Vaseeharan ve Ramasamy, 2003). Probiyotikler, besinlerdeki potansiyel zararlı bileşimlerin detoksifikasyonunu sağlayarak, beslenmenin düzenlenmesine, amilazlar ve proteazlar ile diyetle sindirimin kolaylaşmasına, vitaminlerin üretimine (biotin ve B12 vb.) ve ayrıca konağın bağışıklık sisteminin uyarılmasına yardımcı olurlar (Spanggaard ve ark., 2000; Irianto ve Austin, 2002).

Probiyotik bakteriler O_2 toleransına göre, anaeroplara ve fakültatif anaeroplara ve aeroplara olmak üzere üç ana grupta değerlendirilmektedir. Ortam pH'sının (3-5'den düşük ve 8-8,5'dan yüksek) ve üreme sıcaklığının ($10^{\circ}C$ - $45^{\circ}C$) optimum olmadığı koşullarda ise çoğalmaları azalmaktadır (Yaşar ve Kurdaş, 2009). Probiyotikler aynı zamanda, ortam pH'sını düşürerek diğer bakterilerin üremeleri için uygun olmayan bir ortam yaratmaktadır (Yiğit, 2009). Probiyotik bakteriler laktik asit, asetik asit, bakteriyosin, hidrojen peroksit gibi antimikrobiyal maddeler üreterek, bağırsaklarda patojenlerin üremesini kontrol altına alırlar (Timmerman ve ark., 2004; Yaşar ve Kurdaş, 2009). Bazı laktik asit bakterilerinin %10' luk safra ortamında aktivitelerine devam ettiği tespit edilmiştir (Balcazar ve ark., 2008). Probiyotik bakteriler, proteolitik enzimler de (pH 2.5–9.0 aralığı) üretirler.

Böylece normal bağırsak mikroflorasında bu bakterilerin proteinleri metabolize ettiği sonucuna varılmıştır (Novik ve ark., 2006).

Probiyotik bakterilerin, bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde ve kontrolünde önemli rolleri vardır. Probiyotikler bu önemli rolü, bağırsak epitel hücreleri ve bağırsak lenfoid doku arasında devamlı bir etkileşim sağlayarak oluşturular. Öncelikle, bağırsağa giriş yapan bakteriler “toll-like reseptörler” (TLR) ve “nucleotide-binding oligomerisation domain” (NOD) proteinleri tarafından tanınır. Bu reseptörler, bakteriyi hücre duvarı lipopolisakkaritleri, peptidoglikan, bakteriyal flajellin aracılığı ile tanır (Coşkun, 2006).

Bakterilerin bağırsaktaki epitel yüzeylere tutunması; kolonizasyon, bağışıklık sisteminin aktive edilmesi ve patojenlere karşı antogonistik aktivitenin ön şartı olarak dikkate alınmıştır. Bu nedenle de tutunma ve hidrofobik karakter, probiyotik seçiminin asıl kriteridir (Turabian, 1996).

Yetiştiricilikte probiyotiklerin kullanımına yönelik, ilk uygulama ise Kozasa (1986) tarafından rapor edilmiştir. Kozasa (1986), topraktan izole edilen *Bacillus toyoi* sporlarının, *Edwardsiella* spp. tarafından enfekte olmuş Japon yılan balıklarında mortaliteyi azalttığını, aynı yem ilavesinin sarıkuyruklarda, büyüme oranını arttırdığını bildirmiştir. Sektörde sağlık problemlerinin hızlı artışı da bu tür çalışmaların sayısında artışa neden olmuş ve son yıllarda giderek yaygınlaşmıştır. Yapılan çalışmalarda; Gram-negatif bakteriler (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* spp), Gram-pozitif bakteriler (*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* ve *Weissella* spp.), mikroalgler (*Tetraselmis*, *Spirulina*) ve mayalar (*Debaryomyces*, *Phaffia* ve *Saccharomyces*) (Irianto ve Austin, 2002; Vine ve ark., 2006) probiyotik olarak yetiştiricilik sistemlerinde yerini hızla almıştır.

Ancak probiyotiklerle yapılan araştırmalarda, uygun olmayan mikroorganizmaların seçimi ve bununla birlikte seçilen mikroorganizmaların, potansiyel probiyotik kritere sahip olup olmadığı konusunda önemli sıkıntılar çıkmaktadır. Genel seçim kriterlerinde çoğunlukla biyolojik güvenlik şartları dikkate alınıp; üretim ve probiyotik kullanım yöntemlerinin mikroorganizmanın vücuttaki hedeflenen yeri ile belirlenmesi gerekmektedir. Yetiştiricilikte kullanılacak probiyotik bakterilerin seçimlerinde:

1. Geçmiş bilgilerin toplanması
2. Probiyotik bakterinin kazanımı
3. Probiyotik bakteri ile rekabet eden patojenik türlere etkisi
4. Probiyotik bakterinin patojenitesinin tespiti
5. Larvada probiyotik bakterinin etkisinin değerlendirilmesi
6. Ekonomik maliyet ve kâr analizi gibi aşamalar dikkate alınmalıdır (Reuter, 2001).

Yakın gelecekte, patojenlere karşı savaşın kazanılmasında probiyotiklerle ilgili çalışmaların artması, üretim koşullarının optimize edilmesi, sürdürülebilir ve ekonomik üretim süreçlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Balık sindirim sisteminde probiyotiklerin kullanılması, patojen mikroorganizmalar arasında direnç genlerinin aktarılamamasına ve dolayısıyla su ürünü tüketen insanlarda da hastalıklara karşı, doğru ve zamanında antibiyotik mücadelesinde fayda sağlayacaktır.

Yetiştiricilik sistemlerinde yapılan çalışmalarda; probiyotikler, patojenlerin engellenmesinde ve sucul türlerin hastalık kontrolünde sıklıkla kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, yetiştiricilik sistemlerinde çipuralara uygulanan ticari probiyotiklerin yem değerlendirme oranlarında iyi sonuçlar verdiği, ancak patojene karşı aktif rol üstlenemediği bildirilmiştir. Elde edilen sonuç çipuranın yaşadığı

bölge itibariyle doğal mikrobiyotanın bilinmemesine bağlı olarak, uygun probiyotiğin kullanılmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Burr ve ark., 2005).

Yetiştiricilikte yapılacak uygulamalarda; balık sağlığı, üretim maliyeti ve zamanın doğru kullanımı önem arz etmektedir. Avcılığı bölgemizde yaygın olarak yapılan çipuraların, probiyotik mikrobiyotasının ortaya konması ve hastalıklara karşı balıklara verilecek probiyotiklerde olması gereken kriterlerin de sınıflandırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Kuzeydoğu Akdeniz’de farklı iki habitatta yer alan çipuraların kültüre edilebilir aerobik bakteri florasının tespiti ile elde edilen türlerden potansiyel probiyotik bakterilerin moleküler tanımlaması ve probiyotik kriterlerin karakterizasyonu araştırılmış ve değerlendirilmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Balıklarda Bakteriyel Flora

Yetiştiricilik yolu ile üretilen balık türlerinin yanı sıra doğada yaşayan tatlısu ve deniz balıklarının, bakteriyel florası üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda, açık denizlerin suyu çok az miktarlarda bakteri içerirken, kıyı bölgelerde kirlenmenin daha fazla olması nedeniyle mikrobiyotadaki bakteri yükünün arttığı gözlemlenmektedir (Cahill, 1990). Gökoğlu (2002) yaptığı çalışmada, tatlı su balıklarının bakteriyel florasının deniz balıklarından istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olduğunu bildirmiştir. Bilim insanları yaptıkları çalışmalarda, balığın türüne, sindirim kanalının anatomik özelliklerine göre bakteriyel floranın değiştiğini tespit etmişlerdir (Huss, 1988; Cahill, 1990).

Hamid ve ark. (1978), yetiştiricilik koşulları altında kefal balıklarını önce tatlı suya, daha sonra deniz suyuna adapte edip, balıkların mikrofloralarını incelemişlerdir. Balıklar tatlı suda iken *Enterobacter*, *Aeromonas* ve *Micrococcus* türleri baskın, deniz suyuna alındıklarında *Vibrio*, *Pseudomonas* ve *Photobacterium* cinslerinin baskın olduğunu tespit etmişlerdir.

Yoshimizu ve ark. (1980), tatlı sularda ki salmonid balıkların bağırsak florasının başlıca Aeromonadlar ve Enterobacteriaceae familyası üyelerinden oluştuğunu, bu balıkların tuzlu suya göç etmeleri durumunda floralarının da değişerek *Vibrio* türlerinin dominant tür olabileceğini bildirmişlerdir

Deniz ve acı su balıkları için en önemli patojen *Vibrio* cinsine ait bakteriler olmasına karşın nadiren de olsa tatlı su balıklarında hastalık yapıcı etmen olarak bildirilmiştir (Ross ve ark., 1968; Ghittino ve ark., 1972; Muroga ve ark., 1986).

Vibrio'ların omurgasızlardan, sedimentten, sudan ve klinik olarak sağlıklı balıkların mukozal yüzeylerinden ve iç organlarından izole edildiği Noga (2000) tarafından bildirilmiştir. Reed ve Francis-Floyd (1996), *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. furnisi*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. cholerae* non-01, *V. vulnificus* ve

V. damsela balık patojeni olarak tanımladıkları sekiz adet *Vibrio* türü tespit etmişlerdir.

Stres şartlarında (yoğun populasyon, organik kirlilik veya beslenme vb.), normal flora elemanı olan *Vibrio*'lar, konakçıyı istila ederek konakçının sistematik hastalığına ve dolayısıyla ölümüne neden olurlar (Reed ve Francis-Floyd, 1996). Türe ait suşların virülensi de farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalar, bazı suşların stres olmadan da hastalık oluşturdıklarını göstermiştir (Horne, 1982; Reed ve Francis-Floyd, 1996; Noga, 2000; Timur ve Timur, 2003).

Yetiştiricilik sistemlerinde hastalık durumuna karşı üreticiler öncelikle antibiyotik kullanımına başvurmaktadırlar. Antibiyotikler patojen mikroorganizmaların populasyonlarının yok edilmesine neden olurlar. Bakteriye hastalıkların kontrolünde aynı ilacın sıklıkla doz ve süre kavramına uymaksızın kullanımı, genellikle balık patojenlerinde direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Direnç, sık ve yoğun antibiyotik kullanımı veya başka bir mekanizma ile şekillense de antibiyotiklere dirençli bakteri yoğunluğu, tüm dünyada halk sağlığını tehdit eden önemli bir unsur olarak tanımlanmıştır (Mc Phearson ve ark., 1991).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) gibi uluslararası kuruluşların son zamanlardaki çabalarına rağmen, su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımının antibiyotik direnç genlerinin geliştirilmesi ve yayılmasındaki rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliği dikkatle izlenmesi gereken durumlar içinde yer almaktadır (Erdoğan, 2012).

Su ürünleri yetiştiriciliği için özel olarak tasarlanmış antibiyotikler mevcut olduğu gibi veterinerlik ve diğer alanlar için geliştirilen yetkili ürünler de kullanılmaktadır. Türkiye'de ruhsatlandırılmış 34 adet ruhsatlı ilaç bulunmaktadır. Oral ya da immersiye şeklinde kullanılan bu ilaçlardan; 14 adeti Florfenikol, 9 adeti Sulfadiazin+Trimetoprim, 9 adeti Oksitetrasiklin, 1 adet Amoksisiklin ve 1 adeti de Oksoolinik asit etken maddesini içermektedir (Erdoğan, 2012).

Balta ve Yılmaz (2019), Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki yüzen ağ kafeslerde kültürü yapılan levreklerdeki hastalık salgınlarından izole edilen bakterileri tanımlayarak, antibakteriyel direnç profillerini belirlemişlerdir. Universal 16S rRNA primerleri kullanarak yaptıkları PZR test sonucuna göre, suşların %98 V. *parahaemolyticus* olduğu doğrulanmıştır. Antibiyogramı yapılan izolatlar; sulphamethoxazole (%100), ampicilline (%84,4), eritromisine (%71,9), oksitetrasiklin (%62,5), trimetoprim-sulfametoksazol (%56,3) ve streptomisin (%46,9) dirençli, fakat suşların hepsi oksolinik asit, enrofloksasine ve florfenikol'e duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Aoki (1988) yaptığı çalışmada, kültür sazanlarından izole edilen antibiyotiklere dirençli *Aeromonas hydrophila* soylarında transfer edilebilir R plazmidlerine sıklıkla rastlandığını bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, *Aeromonas* türlerinin Amerika Birleşik Devletleri'nde lisanslandırılmış iki antibiyotik oksitetrasiklin ve sülfometoksinormetoprim'e dirençlerinin oldukça yüksek olduğu, izolatların sırasıyla bu antibiyotiklere %67 ve %97 oranında dirençli olduğu saptanmıştır (Dixon ve ark., 1990).

İskoçya'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise oksitetrasikline dirençli 40 *Aeromonas salmonicida* izolatından 11'inde transfer edilebilir R-plazmidleri saptanmıştır (Inglis ve ark., 1993).

Antimikrobiyallere karşı plazmid aracılı rezistans gelişimi *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *V. anguillarum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda* ve *Yersinia ruckeri* gibi bazı bakteriyel balık patojenlerinde belirlenmiştir. *A. salmonicida*'da kloramfenikol, sülfonamid ve streptomisin (Japonya'da) ile sülfonamid kombinasyonları, streptomisin, trimetoprim ve/veya tetrasikline (İrlanda'da) karşı direnci kodlayan, transfer edilebilir R-plazmidleri belirlenmiştir (Grandis ve Stevenson, 1985; Aoki, 1988).

Tittleimie ve ark. (2007), Kanada'da 1993- 2004 yılları arasında su ürünlerinde LC-MS/MS ile 39 farklı veteriner ilacın varlığını araştırdıkları

çalışmada, 1 balıkta 0,4 µg/kg kloramfenikol, 4 karideste nitrofuran 0,5-2 µg/kg, 3 karideste 0,3-0,73 µg/kg enrofloksasin kalıntısına rastlandığını bildirmişlerdir.

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Toksikoloji laboratuvarında yapılan toplam 3962 balık numunesi analizinde; 16 numunede Enrofloxacin, 10 numunede Ciprofloxacin, 10 Enrofloxacin+Ciprofloxacin numunede, 6 numunede Doksisiklin, 5 numunede Oksitetrasiklin, 3 numunede Sulfadiazin olmak üzere 50 adet numunede yasal limitlerin üstünde kalıntıya rastlanmıştır (Erdoğan, 2012).

Çapkin ve ark. (2015) çalışmalarında, 2004-2014 yılları arasında balıklardan izole edilen 133 bakteri suşu kullanmışlardır. Çalışılan 133 bakteri örneği, 43 farklı türü oluşturmuştur. İzole edilen bakterilerin belirlenen antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direnç her bir bakteri türü için farklılık göstermiştir. Bakterilerin en dirençli olduğu antibiyotikler ise Eritromisin (%68) ve Cephalothin (%70) olarak tespit edilmiştir. İzole edilen bakteriler antibiyogram testinde Ticarcilin (75µg), Ampisilin (10µg), Sulphamethoxazole (100 µg), Aztreonam (30µg), Cephalothin (30µg), Eritromisin (15 µg) ve Amoxycillin (25µg)'e karşı %50'den fazla direnç göstermişlerdir.

2.2. Denizel Türlerden Yapılan İzolasyonlar ve Kullanılan Probiyotikler

Karasal ve sucul ortamlarda, antibiyotiğe dirençli suşların sürekli ortaya çıkışı, antibakteriyel ilaçların kullanımıyla ilgili artan düzenlemeler ve yasaklar konuyla ilgili yeni yaklaşımlar geliştirmiştir (Kesarcodi-Watson ve ark., 2008). Bu nedenle su ürünleri yetiştiriciliğinde; konağı istilacı patojenlere karşı koruyan mekanizmalar, balık bağırsak mikroflorasının manipülasyonu ve kontrolü açısından kritik öneme sahiptir (Merrifield ve ark., 2010).

Doğal mikrobiyotada yer alan probiyotik bakteriler; rekabetçi dışlanma, balık bağışıklık yanıtını iyileştirme yoluyla patojenik bakterilere hükmeden ve bazen antiviral bir araç olarak ta hareket ederler (Gildberg ve ark., 1995; Nikoshelainen ve ark., 2001).

Probiyotiklerin sucul çiftlik hayvanları üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapılan bilimsel çalışmaların çoğu, konakçı türlerin hayatta kalması ve büyümesinde iyileşme, beslenme, patojenlere karşı savaş ve konakçının bağışıklığına odaklanmıştır (Merrifield ve ark., 2010; Dimitroglou ve ark., 2011).

Uygulama yapılmadan önce, probiyotik bakterilerin seçiminde konakçı canlıının mikrobiyotasının iyi tanınmış olması çok önemli bir faktördür. Probiyotik bakteriler konakçı türlerine göre özgünlük göstermektedirler. Bu yüzden kullanım için seçilecek probiyotik bakteri türü, o canlıının mikroflorasından izole edilmiş bir bakteri türü ise çok daha olumlu sonuçlar vermektedir (Duangjitcharoen ve ark., 2008).

Hjelm ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, kalkan (*Scophthalmus maximus*) larvası yetiştiriciliğinde hastalıkların kontrolünü sağlamak için, bakteri seçimi, tanımlaması ve karakterizasyonun önemini amaçlamışlardır. 400 deniz suyu bakteri suşunun 34'ünün, üç balık larva patojenine (*V. anguillarum* 90-11 287, *V. splendidus* DMC-1, *Pseudoalteromonas* HQ) karşı *in vitro* anti-bakteriyel aktivite sergilediğini tespit etmişlerdir.

Savaş ve ark. (2005), çipura larva ve yavrularının bağırsaklarındaki aerobik bakteri florasını, beslendikleri diyetlere (rotiferler, karides, yapay diyet) ve içinde bulundukları suyun kalitesine göre analiz etmişlerdir. Canlı yemlerle beslenen balıkların, yapay diyetle beslenen balıklardan daha yüksek bir bakteri yüküne sahip olduğu bildirilmiştir. Rotiferlerde toplam bakteri sayısı $8,7 \times 10^6$ cfu/g ve *Pseudomonas* (%60,2)'in florada baskın durumda olduğunu tespit etmişlerdir. Rotiferle beslenen larvalardaki bakteri yükü $9,8 \times 10^2$ cfu/g ve *Pseudomonas* (%48,4) ve *Vibrio* (%28,3)'yu baskın türler olarak bulmuşlardır. Karidesin bakteri yükü $1,7-3,5 \times 10^7$ cfu/g iken *Vibrio* (%73,7-81,3), *Pseudomonas* (%10,2-15,5) 'tan daha fazla sayıda yer almıştır. Karidesle beslenen larvaların bakteri yükü $5,3 \times 10^4$ - $1,8 \times 10^5$ cfu/g bulunurken, *Vibrio* (%61,2-70,1) baskın tür olarak tespit edilmiştir. Yapay yem ile beslenen larvalarda bakteri yükü $1,2 \times 10^4$, *Pseudomonas* baskın iken, yapay yemle beslenen yavrular için sayım $2,3 \times 10^4$ cfu/g, *Vibrio*'yu dominant

olarak tespit etmişlerdir. Yetiştirme suyundaki bakteriyel mikroflora ise, $1,3 \times 10^2$ ila $3,2 \times 10^3$ cfu/ml arasında değişmiştir. Bu çalışma ile, çipura larvalarının bağırsak mikroflorasının balık yemi içerikleri tarafından kantitatif ve kalitatif olarak etkilendiği gösterilmiştir.

Chabrillon ve ark. (2005), çiftlik çipuralarında önceki çalışmalarından izole ettikleri Vibrionaceae, Pseudomonodaceae familyaları ve *Micrococcus* cinsine ait 4 adet izolatin, çiftlik dil balığı (*Solea senegalensis*)'nin *Vibrio harveyi*'ye karşı antagonistik etkisini araştırmışlardır. Bu 4 izolattan sadece 2'sinin *V. harveyi*'ye karşı antagonistik etki oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

You ve ark. (2005) bir karides çiftliğindeki deniz sedimanlarından toplam 94 Actinomycetes suşu izole etmişler, bunlardan %87,2'si *Streptomyces* cinsine ait, diğerleri ise *Micromonospora* spp. olarak bulunmuştur. Actinomycetes suşlarının %50'si patojenik *Vibrio* spp'ye karşı aktivite göstermiştir. Denizel *Streptomyces* suşlarının %38'i krom azurol S (CAS) agar plaklarında siderofor üretmiştir. 7 *Streptomyces* suşunun siderofor ürettiği ve *in vitro*'da *Vibrio* spp.'nin büyümesini engellediğini bildirmişlerdir. Sonuçlar, *Streptomyces*'lerin kültür balıkçılığındaki biyolojik kontrol ajanları için umut verici bir kaynak olabileceğini göstermiştir.

Chabrillon ve ark. (2006), çipuradan elde ettikleri dört izolatin, çipura deri, solungaç ve bağırsak mukozasına yapışma ve çiftlik çipuralarının önemli bir patojeni olan *Listonella anguillarum* ile etkileşim yeteneğini test etmişlerdir. Sadece iki izolatin, rekabet ve yer değiştirme koşullarında, *L. anguillarum*'un mukusa yapışmasını önemli ölçüde azattığını tespit etmişlerdir. Pdp11 adlı izolat seçilmiş ve *in vivo* probiyotik potansiyelini, oral uygulama ile değerlendirmiş, ardından patojen *L. anguillarum* ile rekabet ettirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, Pdp11 adlı suşun patojene karşı koyduğunu bildirmişlerdir.

Öztürk (2007), ticari olarak temin edilen *Lactobacillus rhamnosus* bakterisinin, levreklerin larval ve yavru dönemlerinde büyüme ve hayatta kalma

oranlarına etkisini araştırmıştır. Larval ve yavru dönemde probiyotik kullanımının istatistiksel olarak ağırlık artışına etkisinin olmadığını tespit etmiştir. Yumurtadan çıkan larvaların tanklara aktarılması sonrasında yaşama oranını ise istatistiksel açıdan yüksek bulmuştur. Larval yaşama oranı deneme gruplarında %20-27 iken kontrol grubunda %18,9 olarak belirlenmiş ve larval dönemden yavru döneme geçişin arttığını saptamıştır. Yavru dönemdeki balıkların kafeslere aktarılması sonrasında ise yaşama oranlarında istatistiksel farkın olmadığını bulmuştur.

Süzer ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada, ticari probiyotiğin (*Lactobacillus* spp.) çipura büyüme parametrelerinde ve bağırsak sindirim enzimlerinde yarattığı etkileri incelemiştir. *in vivo* olarak gerçekleştirdikleri çalışmada, *Lactobacillus* spp.'yi grup 1'de sadece canlı yeme, grup 2'de canlı yeme ve suya, grup 3'te ise sadece suya ilave etmişlerdir ve kontrol grubuyla karşılaştırmışlardır. 1. ve 2. gruplarda *Lactobacillus* spp., bağırsaklarda sindirim enzimlerinin aktivitesini arttırırken, bu doğrultuda ağırlık ortalamalarında da artış tespit etmişlerdir. *Lactobacillus* spp.'nin sadece suya ilave edildiği 3.grupta, balıkların sindirim enzimlerinin aktivitesine ya da büyüme parametreleri üzerine etkisinin olmadığını saptamışlardır.

Sorroza ve ark. (2012) çalışmalarında, yetiştiricilikten elde edilen çipura ve levrek bağırsaklarından izole edilen farklı bakteri suşlarında, probiyotik potansiyeli ortaya çıkarmayı amaçlamışlardır. *in vitro* olarak 50 bakteri suşu izole etmişler ve sadece 1 potansiyel probiyotiği, *in vivo*'da iyi yanıtlar verdiğini bildirmişlerdir. *Vagococcus fluvialis* olarak tanımlanan türün, *in vivo* da *Vibrio anguillarum*'a karşı pozitif kontrol grubundan %42,3 daha yüksek bir hayatta kalma oranı sergilediğini görmüşlerdir.

Floris ve ark. (2013) Sardunya'da iki kıyı lagününden (Porto Pino ve Tortoli) yakalanan çipuraların bağırsağında mikrobiyal ekoloji üzerine çalışmışlardır. İki bölgeden toplamda 120 adet bakteri kolonisi izole edilmiştir. Sonuçlarda, iki bölge arasında bakteri yükleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmediğini bildirmişlerdir. Tortoli lagünündeki bağırsak mikrobiyotası, toplam

13 farklı genetik varyasyona sahip bakteri grubu (*Pseudomonas* spp. (%33,3), *Sphingomonas paucimobilis* (%10,5), *Proteus* spp. (%8,8), *Chryseobacterium* sp. B-G-R2A3 (%5,3), Arctic soil bacterium A1T3 (%5,3), *Sphingobacterium* spp. (%5,3), *Psychrobacter* spp. (%3,5), *Psychrobacter maritimus* (%3,5), *Leucobacter* spp. (%3,5), *Yersinia bercovieri* (%3,5), *Aeromonas* spp. (%3,5), *Aeromonas molluscorum* (%1,7), *Erwinia persicina* (1,7%)) ile yüksek genetik varyasyon göstermiştir. Öte yandan, Porto Pino bağırsak örneklerinde yapılan bakteri florasının 16S rRNA gen analizleri sonucunda, Tortoli'ye kıyasla daha düşük bir varyasyon göstermiş ve sadece 3 farklı (*Pseudomonas* spp. (%90), *Janthinobacterium* spp. (%8) and *Psychrobacter maritimus* (%2)) taksonomik grup olarak tanımlanmıştır.

Rungrassamee ve ark. (2014) çalışmalarında, kara kaplan karides (*Penaeus monodon*)'lerini kullanmışlardır. Doğadan ve çiftlik *P. monodon* anaçlarında bağırsak bakteri topluluklarını incelemek için, 16S rRNA genlerinin V3-4 bölgelerini bir barkod pyrosekans analizi olarak kullanmışlardır. Hem doğadan hem de çiftlik ortamlarından 5 sınıf (Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Firmicutes ve Bacteroidetes) bakteri grubu tespit etmişlerdir. Proteobakteriler (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* ve *Undibacterium*), Firmicutes (*Fusibacter*) ve Bacteroidetes (*Cloacibacter*). İki farklı habitatın alınmış konağın, bakteri üyeleri üzerinde seçici bir baskı uyguladığını göstermiştir. Bağırsakların bakteriyel profilleri ise, denatüre gradyan jel elektroforezi (DGGE) kullanılarak karşılaştırılmış ve doğadan temin edilen yabani karideslerin bağırsaklarında da benzer bakteriler olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Alonso ve ark. (2018), İspanya'nın Gijon lagününden elde edilmiş 13 adet deniz balığı bağırsak mikrobiyotasının taranmasıyla, antimikrobiyal aktiviteye sahip toplam 45 Gram-pozitif suştan 9'unu 16S rRNA gen dizilimi ile Laktik asit bakteri (LAB) olarak tanımlamışlardır. LAB suşları, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *Photobacterium damsela* patojenleriyle deneysel gastrointestinal koşullarda farklı pH ve safra tuzları değerleriyle kültüre edildiğinde, LAB suşlarının hayatta

kaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacıların bu sonuçları, yabancı deniz balıklarının mikroflorasından elde edilen LAB suşlarının, su ürünleri yetiştiriciliğinde potansiyel probiyotik olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

2.3. Tatl Su Türlerinden Yapılan İzolasyonlar ve Kullanılan Probiyotikler

Ringo ve Holzapfel (2000) çalışmalarında, Atlantik salmonu (*Salmo salar* L.)'nın solungaçlarında meydana gelen aerobik bakteri populasyon seviyesini yaklaşık 3×10^4 g⁻¹ olarak belirlemişlerdir. İncelenen 100 adet izolattan 58'inin Gram-negatif, geri kalan 42 adet Gram-pozitif izolattan 26'sını, 16S rDNA dizi analizi ve AFLpTM parmak izi esasına göre, *Carnobacterium piscicola* olarak tanımlamışlardır. Bu Carnobacteria suşlarının, balık patojenler (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio anguillarum* ve *Vibrio salmonicida*)'ne karşı büyüme önleyici bileşik üretimini test etmişlerdir. Test edilen 10 adet *C. piscicola* izolatından 9'unun, patojenlerin gelişimini kuvvetle inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Spanggaard ve ark. (2000) 48 adet gökkuşağı alabalığının bağırsak mikroflorasını, direkt mikroskopik sayım ve plak sayımı yaparak kültür ortamında karşılaştırmışlardır. Örnekleme noktası içindeki balıkların bakteri yükünün 3-5 log birim farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Fizyolojik kriterlere göre toplam 504 bakteri izole edilmiş ve bunlardan 153 adet suşta, 16S rRNA geninin kısmi dizilimi gerçekleştirilmiştir. Klasik ve moleküler tanımlama arasında yüksek oranda uyuma saptamışlardır. Baskın mikroflorayı; Protrobacteria'nın gamma alt sınıfı (*Citrobacter*, *Aeromonas* ve *Pseudomonas* cinsleri), Proteobacteria'nın beta alt sınıfına ait düşük G+C içeriğine sahip Gram-pozitif bakteriler (*Carnobacterium* cinsi) olarak tanımlamışlardır. Bununla birlikte, incelenen üç balık çiftliği arasında ve ayrıca bir balık çiftliği içindeki farklı zamanlarda yapılan örneklemeler sonucunda, bağırsak mikroflorası bileşiminin yüksek farklılıklar oluşturduğu araştırmacılar tarafından bulunmuştur.

Nikoskelainen ve ark. (2001) çalışmalarında, insan kullanımı için 6 adet laktik asit bakterisi (LAB) ve balık probiyotiği olarak *Enterococcus faecium* Tehobak'ın potansiyel probiyotik özelliklerinin araştırılmasını amaçlamışlardır. 3 adet balık patojeni (*Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* ve *Flavobacterium psychrophilum*) ve 7 adet LAB'ın adezyon yetenekleri rekabet ettirilerek belirlenmiştir. Test edilen LAB suşlarının beşi, farklı balık mucus tiplerine önemli oranda yapışma göstermiştir. LAB suşları, *A. salmonicida*'nın yapışkan özelliklerine rağmen mukusa tutunmasını engelleyerek ve *A. salmonicida*'nın büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. *L. casei* Shirota dışındaki tüm LAB'lar, balık safralarına karşı tolerans göstermiştir. *L. rhamnosus* ATCC 53103 ve *L. bulgaricus*'un balık mucusuna diğer probiyotik bakterilerden daha iyi penetre olduğunu bulmuşlardır. Karakterizasyon verilerine dayanarak, *L. rhamnosus* ATCC 53103 ve *L. bulgaricus*'un, balık yetiştiriciliğinde *in vivo* olarak yapılacak çalışmalarda güvenli olabileceğini kabul etmişlerdir.

Balcazar ve ark. (2007), laktik asit bakteri (LAB)'lerinin kahverengi alabalığın (*Salmo trutta*) humoral immün sistem üzerindeki tepkisini incelemişlerdir. Alabalığa, LAB gruplarını (*Lactococcus* (*Lc.*) *Lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus* (*Lb.*) *sakei* ve *Leuconostoc* (*Leu.*) *mesenteroides*) yemlerde 10^6 cfu/g olacak şekilde 2 hafta boyunca ağızdan uygulamışlardır. LAB besleme döneminde, *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. sakei* ve *Leu. mesenteroid*'ler balık bağırsağında devam etmiş, ancak LAB'la desteklenmeyen diyetten geçtikten sonra bağırsaklarda LAB sayısı yavaşça azalmıştır. Sadece *Lb. lactis* ssp. *lactis* ve *Leu. mesenteroid*'ler 4. haftanın sonunda 1×10^2 cfu/g'nin üzerindeki seviyelerde saptanmıştır. İkinci haftanın sonunda tüm LAB gruplarında serumdaki aktivitenin, kontrol balıklarına kıyasla, anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. *Lc. lactis* ssp. *lactis* ve *Leu. mezenteroid*'ler ile desteklenmiş gruplar, 3. haftanın sonunda yüksek düzeyde bir lizozim aktivitesi sergilemiş, ancak *Lb. sakei* ile takviye edilen grup lizozim aktivitesinde önemli bir değişiklik gösterememiştir. Serum

immüoglobulin düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, ancak LAB ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

Wang ve Han (2007) çalışmalarında, Sazan (*Cyprinus carpio*) havuzlarından izole edilen *Bacillus* sp. YB-030518 ve *Bacillus* sp. YB 034325'nin hücre duvarı hidrofobisitesi ve farklı kültür koşulları altındaki değişimlerini incelemişlerdir. İzole edilen bakterileri, probiyotik olarak karides yemlerine eklenmesiyle, bakterilerin biyolojik iyileşmedeki rolünü araştırmışlardır. Üstel büyüme fazında, YB-030518 ve YB-034325'in 18. saatteki hidrofobisitesini, 96. saatteki büyüme fazından daha yüksek bulmuşlardır. pH 5,5'te 5 °C ve pH 8,5; pH 5,5'te ve pH 7,0'da 20 °C kültür koşulları altında, YB-034325'in hidrofobisitesinin, YB-030518'den önemli ölçüde daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Balcazar ve ark. (2008)'nin çalışmalarında, gökkuşağı alabalığının bağırsağından izole edilmiş üç laktik asit bakterisinin (LAB), *Lactococcus lactis* CLFP 101, *Lactobacillus plantarum* CLFP 238 ve *Lactobacillus fermentum* CLFP-242'nin *in vitro* koşullar altında çeşitli balık patojenleri (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* ve *Vibrio anguillarum*)'ne karşı yapışma yeteğini engellemeyi amaçlamışlardır. Sonuçlar sadece *Lc. lactis* CLFP 101'in, test edilmek istenen patojenlerin yapışmasını azaltırken, *L. plantarum* CLFP 238'un, *A. hydrophila* ve *A. salmonicida*'nın yapışmasını azaltmıştır. *L. fermentum* CLFP 242 ve üç LAB suşunun ancak birlikte kullanıldığında, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* ve *Yersinia ruckeri*'nin bağırsak mukozasına yapışma yeteğinin azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, sadece *Lc. lactis* CLFP 101, kültür sıvısında ölçülen tüm balık patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Tüm LAB suşları nispeten düşük pH ve yüksek balık safra konsantrasyonlarında dahi hayatta kalabilmişlerdir.

Aly ve ark. (2008) çalışmalarında, toprak havuzlardan alınan 40 adet tilapia (*Oreochromis niloticus*)'yı bakteriyolojik ve patolojik incelemeye tabi tutmuşlar ve 80 farklı bakteri izole etmişlerdir. 15 bakteriyel izolat, *in vitro* ve *in vivo* olarak probiyotik aktivite açısından incelenmiştir. İzolatlardan, *Aeromonas hydrophila*,

Citrobacter freundii, *Pseudomonas* türlerini ve *Bacillus pumilus* ve *Bacillus firmus*'u potansiyel probiyotik olarak tanımlamışlardır. İncelenen 15 izolattan 3'ünün (*B. pumilus*, *B. firmus* ve *C. freundii*) *in vitro*'da *A. hydrophila*'ya karşı inhibe edici etkiler gösterdiğini ve balıklara *B. pumilus* ve *B. firmus* enjekte edildiğinde, herhangi bir hastalık veya ölüme neden olmadığını görmüşlerdir. *B. pumilus*'un, diyetle 5 hafta boyunca 4-25 °C'de canlılığını koruduğunu tespit etmişlerdir.

Boutin ve ark. (2012) çalışmalarında, Kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) deri mukusundan 9 bakteri suşu izole etmişler ve iki ana patojene (*Flavobacterium columnare* ve *F. psychrophilum*) karşı antagonistik etkiyi test etmişlerdir. 4 farklı balık ailesinin test edildiği *in vivo* deneyde, alabalıktan izole edilen bu suşlar karıştırılmış ve difüzyon testleri ve buyyon ortak kültür analizlerinden elde edilen sonuçlarda; 7 bakteri suşunu, *F. psychrophilum* ve *F. columnare*'ye karşı Columnaris hastalığının tedavisi için kullanılmıştır. Çalışmalarında, balıkların ölüm oranlarında (%54-86) önemli düşüşe neden olmuş ve bu durum konakçı mikrobiyotasından *in vitro* elde edilen olası probiyotiklerin rekabet potansiyelinin *in vivo*'da yeterli olduğunu göstermişlerdir.

Reda ve ark. (2017) çalışmalarında, tilapianın bağırsaklarındaki probiyotik bakterileri tanımlamayı amaçlamışlardır. 135 adet izolattan 9'unun patojenik olmadığı ve en az 5 adet izolatin balık patojenleri (*Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Staphylococcus aureus*)'ne karşı antibakteriyel faaliyette olduğunu görmüşlerdir. Bu izolatların, yüksek safra konsantrasyonu (% 10) varlığında ve farklı asidik pH değerlerinde yaşayabildiğini göstermişlerdir. 1 adet suş (14HT)'un seçilen tüm antibiyotiklere duyarlılık gösterdiğini, 2 adet suşun (9HT and 11HT) streptomisine karşı direnç gösterdiğini ve 3 adet suş (9HT, 11HT ve 38HT)'un iki antibiyotiğe direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. İzole edilen diğer suşları; *Lactococcus lactis* (8HT, 9HT, 11HT ve 33HT); *Enterococcus faecalis* (14HT), *Lysinibacillus* sp. (38HT) ve

Citrobacter freundii (39HT, 41HT ve 47HT) 16S rRNA gen analizine dayanarak tanımlamışlardır.

Dehler ve ark. (2017) çalışmalarında, kapalı devre laboratuvar akvaryumunda yetiştirilen Atlantik salmonu larvası bağırsak mikrobiyotasını ve çiftlik Atlantik salmonu larvası bağırsak mikrobiyotasını karşılaştırmıştır. Araştırmada habitat tipinden bağımsız olarak sabit bir bakteri alt kümesi olup olmadığını araştırmışlardır. 16S rRNA geninin iki değişken bölgesi boyunca, sekanslama yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan balıkların tümü, baskın sınıf olarak Firmicutes, Proteobacteria ve Tenericutes ile eşleşmiştir. Araştırmacılar, her iki yetiştirme grubu arasında bağırsak mikrobiyotasının bileşimlerinde önemli farklılıklar tespit etmişlerdir. Ayrıca, Proteobacteria, Bacteroidetes ve Firmicutes'den oluşan, ana mikrobiyota tanımlanmıştır. Bireysel yetiştirme gruplarının çekirdek mikrobiyota alımının veya kaybının iki habitatta farklı şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Alanları

Bu çalışma, Kuzeydoğu Akdeniz’de doğa (Tuzla Milli Parkı dalyanından) ve yetiştiricilik (Mersin-Taşucu bölgesindeki özel bir balık çiftliği) ortamlarında gerçekleştirilmiştir.

Tuzla Milli Parkı dalyanında (36°41' K-35°04' D) (Şekil 3.1.; Şekil 3.2.) denizden tatlı suya geçmek isteyen balıklar, geçiş sonrası lagün ağzındaki kuzulukların kapatılmasıyla yakalanmıştır. Koruma altında olan dalyan havzası çevresinde, herhangi bir kirletici unsur bulunmamaktadır.



Şekil 3.1. Balık materyalinin elde edildiği, Tuzla Milli Parkı Dalyanı (Tuzla, Adana) (uydu görüntüsü)



Şekil 3.2. Balık materyalinin elde edildiği Tuzla milli parkı dalyan bölgesi kuzulukları

Mersin Taşucu bölgesinde; kıyıdan 5 km açıkta yer alan, 1000 ton kapasiteli, 16 adet kafes kapasiteli özel bir balık çiftliği (Bensu su ürünleri ticaret ltd.) ($36^{\circ}18' K-33^{\circ}51' D$)'nde (Şekil 3.3.; Şekil 3.4.) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Balık materyalinin elde edildiği yetiştiricilik ünitesi bölgesi (Taşucu/Mersin) (uydu görüntüsü)



Şekil 3.4. Balık materyalinin elde edildiği yetiştiricilik ünitesi yüzer ağ kafes sistemleri

3.1.2. Balık Materyali

Doğadan (Tuzla Milli Parkı dalyan kuzuluklarından) ortalama 100-160 g ağırlıktaki çipuralar, bahar aylarında bir defaya mahsus olmak üzere, avcılık yoluyla, yakalanmıştır.

Yetiştiricilikten (Mersin-Taşucu bölgesinde özel balık çiftliği) elde edilen çipuralar, göz açıklığı 20mm olan ağ kafeslerde, 4 numara (Skreting, Milas/Türkiye) ekstrude yem (Çizelge 3.1.) ile beslenmiş ve bahar mevsiminde dip trolle avlanıp, hasat işlemi sonrası 100-160 g'lık bireylerden bir defaya mahsus olmak üzere temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çipura ekstrüde yem içeriği

Kimyasal Analiz	%
Ham protein	41
Ham yağ	20
Ham kül	8
Ham selüloz	3,5
Makro elementler	%
Fosfor	2
Kalsiyum	1,4
Sodyum	0,2

Analizlerde, 25 adet yetiştiricilik ve 25 adet doğadanolmak üzere ortalama 100-160g ağırlıkta ki, tüketimlik boyda olan, makroskobik incelemeler sonucunda eşeysel olgunluğa ulaşmamış genç olduğu saptanan çipura (*S. aurata*) bireyleri kullanılmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Analiz balıkları iç bakı ve dış bakı (orijinal)

3.1.3. Araştırma Alanlarındaki Su Analizleri

Örnekleme istasyonlarında sıcaklık (°C), tuzluluk (‰), elektriksel iletkenlik (mS/cm), pH, çözülmüş O₂ (g/l) olarak ölçülmesi planlanan değişken çevresel parametre değerleri multiparametre (YSI 556 prob) kullanılarak herhangi bir ön işleme gerek duymaksızın yerinde ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

3.2. Metod

Yapılan tüm mikrobiyolojik çalışmalar, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Mikrobiyolojik Uygulamalar Öncesi Ön Hazırlık

Sağlıklı 25 adet yetiştiricilik ve 25 adet doğadan elde edilen çipuralar aynı dönemde ve farklı zaman dilimlerinde canlı halde buza yatırılmış, ardından 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvara ulaştırılan balıkların, ağırlık ve boy ölçümleri yapıldıktan sonra dış yüzeyleri, alkolle steril hale getirilmiştir. Steril makasla disekte edilen balıkların, pilorik seka ve anüs bölgesi alınıp, bağırsak ortaya çıkarılmıştır.

3.2.2. Toplam Mezofil Aerobik Bakterilerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Balıklardan alınan bağırsak, önceden tartılmış ve içerisinde 3 mL buyyon olan tüplere yerleştirilmiş, ardından, tüpler 3 dk. vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 1500 rpm de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerden 50µL örnek alınıp; kanlı agara, endo, MRS (Man, Rogosa ve Sharpe) agara (Merck, Almanya) ekim yapılmıştır. Toplam aerobik bakteriler için genel besiyerleri; koyun kanlı agarda (bood base (Sigma, Almanya)+kan) 26°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Toplam Gram negatif bakteriler için endo agarda (Sigma, Almanya) 26°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra endo besi yerinde üreyen Laktoz negatif ve pozitif olarak ayrılarak saf koloniler elde edilmiştir. *Enterobacteriaceae*'ye dahil bakterilerin tespiti için, endo besiyerinden elde edilen saf kültürler, Violet Red Bile Dextrose (VRBD) (Merck, Almanya) agar besiyerine pasajlanıp 26 °C'de 24saat inkübe edilmiştir. Laktik asit bakterileri MRS agarda 26°C'de yaklaşık 4-7 gün anaerob koşullarda inkübasyona tabi tutulmuştur. Saf kültürler elde edilinceye kadar pasaj işlemi gerçekleştirilmiştir.

Pasaj işlemleri sonunda elde edilen türler biyokimyasal açıdan incelenmiştir. Bunun için;

- Sitokrom oksidaz testi; redoks ayıraç (dimetil veya tetrametil fenilendiamin dihidroklorid) damlatılan test kağıtlarına, bakteri plastik öze ile alınıp yayılır, reaksiyonla oluşan yüzeyde renk değişimi değerlendirilmiştir. Renk değişimi veren örneklerle oksidaz pozitif, renk değişimi göstermeyen izolatlar oksidaz negatif olarak tanımlanmıştır.
- Katalaz testi; temiz bir lam üzerine damlatılmış bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) üzerine bakteri yayılarak gerçekleştirilmiştir. Köpük oluşumu gözlenen izolatlar katalaz pozitif, tepkime meydana gelmeyen izolatlar da katalaz negatif olarak gruplandırılmıştır.

Buyyon formülü

Et ekstraktı	20 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 mL

Alkali peptonlu su formülü

Peptone	10 g
NaCl	10 g
Distile su	1000 mL

3.2.3. Toplam Aerobik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Sayımı yapılacak numunenin, 10 mL sıvı besiyerinde 10 katlı dilusyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ...) hazırlanmıştır. 25°C'de 24 saat'lik inkübasyona konduktan sonra orijinal kültürdeki (1mL'de) bakteri miktarı hesaplanmıştır. Kültürdeki mikroorganizma sayısını hesaplamada aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Arda, 2000):

N= Orijinal suspansiyondaki mikrop sayısı,

V= Petri kutularına ekilen inokulum miktarı (0,1 mL)

X= Ortalama mikrop sayısı

D= Dilusyonun ters logaritması, olacak şekilde

$N = (1/v) \times X \times D$ formülü kullanılmıştır.

3.2.4. Aerobik Bakterilerin Hidrofobisite Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların hidrofobisite özelliğini belirlemek için, steril hale getirilen triptic soy agar (TSA) (Merck, Almanya) ve % 0,03 kongo kırmızısı (Sigma, Almanya) karıştırılarak, petrilere döküm yapılmıştır. Tüm izole edilen flora bakterileri, kongo kırmızısı ilave edilen TSA'ya ekilip, 25 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kırmızı renkte olan koloniler pozitif (hidrofobik), beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (hidrofobik olmayan) kabul edilmiştir (Sharma ve ark., 2006).

Probiyotik bakteriler hidrofobik karakter gösterdiği için, kırmızı görünen bakteriler (hidrofobisite pozitif) potansiyel probiyotik olarak kabul edilmiştir.

3.2.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Tür Tanımlamaları

3.2.5.1. Potansiyel Probiyotik Baktelerin Fenotipik Tür Tanımlamaları

Potansiyel probiyotik olarak kabul edilen türlere Vitek II test otomatize sistem (BioMerieux) kitlerinin doğru kullanımı için, Gram boyama yapılmıştır.

Vitek-II cihazıyla yapılan tür tanımlama çalışması Çukurova Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji bölümünde yürütülmüştür.

Kanlı agara ve Mc Conkey agara (Merck, Almanya) ekilen kültürler, 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında, fenotipik tür tanımlaması için Vitek II test tüplerine alınmıştır. Vitek II test otomatize sistemindekullanılan tanımlama kartları Gram pozitifler için BOPP ile, Gram negatifler için TPX bant çeşidi ile kaplıdır. Kartlarda 64 adet kuyu bulunup, her kuyu 30µL süspansüyon alabilir. Bilgisayara

grup isimleri girilip sisteme kaydedilerek, tanımlama okumaları 365nm ve 445nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Cihazda ayrıca çeşitli biyokimyasal testler de otomatik olarak yapıldığından, oksidaz, katalaz, β hemoliz, koagülaz gibi ilave biyokimyasal testlere ihtiyaç duyulmamıştır. Gram pozitif ve Gram negatif izolatların test kitleriyle tepkimeleri sonrasında, izolatların tür adları sonuç olarak alınmıştır.

3.2.5.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Genotipik Tür Tanımlamaları

3.2.5.2.(1). Gram-pozitif Bakteriler için 16S rDNA Ekstraksiyonu

- Örnekler, 5 mL Tris+Edta (TE) çözeltisi içeren tüplerde Mc Farland 5 bulanıklığa ayarlanmıştır
- 1000 μ L'si alınıp 8000 *g*'de 3 dk. santrüfjü edilip supernatant atılmıştır
- Üzerine 1000 μ L TE çözeltisi eklenip, süspansiyon 100 °C'de 10 dk. kaynatılmıştır
- 500 μ L süspansiyona, 150 μ L boncuk eklenmiştir
- Mickle 536-TD.2 cihazı (Mickle Laboratory Engineering, İngiltere)'nda maximum hızda 7 dk. lizis edilmiştir
- Daha sonra 1200 *g*'de 10 dk. santrifjü edilmiştir
- Süpernatanttan 200 μ L alınarak -20 °C'ye kaldırılmıştır

3.2.5.2.(2). Gram-negatif Bakteriler için 16S rDNA Ekstraksiyonu

- Örnekler, 5 mL TE çözeltisi içeren tüplerde Mc Farland 5 bulanıklığa ayarlanmıştır
- 1000 μ L'si alınıp 8000 *g*'de 3dk. santrüfjü edilip supernatant atılmıştır
- Üzerine 1000 μ L TE çözeltisi eklenip, süspansiyon 100°C'de 10 dk. kaynatılmış ve bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır
- +4°C'de 1200 *g*'de 10 dk. santrifjü edilmiştir
- Süpernatanttan 200 μ L alınarak -20 °C'ye kaldırılmıştır

3.2.5.2.(3). Amplifikasyon

- 10xPZR buffer 5 µL
- MgCl₂ 3,5Mm
- dNTP 200µM
- Primer 0,5µL
- DNA tag polimeraz 3U
- DNA 1µL
- Distile su ile 25 µL'ye tamamlanmıştır.

Elde edilen DNA'lar, türe özgü primerler kullanılarak amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında (Applied biosystem 2720 termal cycler) (Şekil 3.6.) aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlanmıştır;

94°C	5 dk.	ilk denaturasyon	} 37-42 döngü
94°C	30 sn.	denaturasyon	
58-64°C	30sn.	primer bağlanma (annealing)	
72°C	4sn	uzama (extension)	
72°C	7 dk	son uzama	

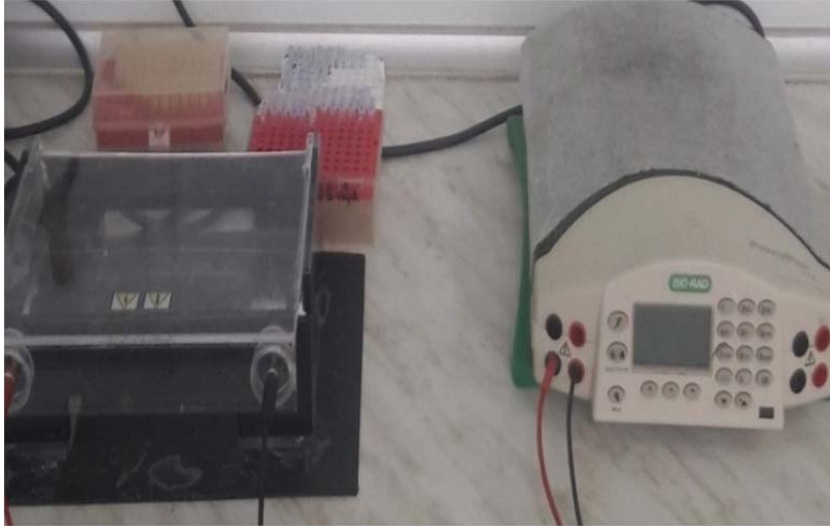


Şekil 3.6. Termal döngü cihazı (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler)

3.2.5.2.(4). Elektroforez

- 100 mL 1x Tris+Borat+Edta (TBE) ve agaroz (%2) çözeltisi mikro dalгада eritilmiştir
- Eriyen çözelti içerisine 5µL etyhidium bromid ile boyanarak tarak yerleştirilmiş jel kasetine dökülüp, donmaya bırakılmıştır
- Tarak çıkarılıp, ilk kuyucuğa 5 µL ladder (50 ve 100 bp)(MBI Fermentas)yüklenmiştir
- 10 µL DNA+2 µL loading kenarda karıştırılıp, diğer kuyucuklara yükleme işlemi yapılmış ve 120 voltta 1 saate ayarlanmıştır

Agaroz jel içindeki DNA, etyhidium bromid ile 60 dakika boyanıp koşturulmuştur (Şekil 3.7.). Daha sonra, UV ışığında Gel logic 1500 Imaging sistem (ayırma gücü: 1708×1280 pixel, Kodak company, NY, ABD) (Şekil 3.8.) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilmiştir. Doğada radyoaktif bir madde olan etyhidium bromid kontaminasyonunu engellemek için tüm jeller tıbbi-kimyasal atık olarak muamele edilmiş ve böylelikle etyhidium bromid'in insan ve çevre sağlığına negatif etkileri ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 3.7. Elektroforez düzeneği (BIO RAD)



Şekil 3.8. Jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 1500 Imaging Sistem)

10×TBE çözelti formülü

Tris-base	108 g	
Borik asit	55 g	
EDTA	7,44 g	
Ultra saf su	1000mL'ye tamamlanır	(pH:8,4)

TE çözelti formülü

Tris-HCl	0,1576g	
EDTA	0,0372 g	
Ultra saf su	100 mL	(pH:8,4)

Etidyum Bromid

Etidyum bromid (1000x, 5mg/mL)	5 g
Distile su	100 mL

Işıktan korumak için alüminyum folyoyla kaplanarak, +4°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karakterizasyonu**3.2.6.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi**

İzolatların gelişme sıcaklıklarının belirlenmesi için; bakteriler agar içeren petrilere pasajlanmıştır. Daha sonra farklı sıcaklıklara (10°C, 15°C, 25°C, 37°C ve 45°C) ayarlı inkübatörlerde 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda izolatların gelişebildikleri sıcaklık değerleri, koloni varlığına göre pozitif (+) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Buchanon ve Gibson, 1974).

3.2.6.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Asite Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Potansiyelprobiyotik bakterilerin farklı pH şartlarına toleransını belirleyebilmek için düşük pH değerlerinde toleransları araştırılmıştır. Farklı pH değerlerine (pH 1; 3; 7) sahip Phosphate Buffered Saline (PBS) içerisine, 10^7 kob/mL olarak hazırlanan potansiyel bakteri süspansiyonları 25 °C’de 1,5 saat inkübe edilmiştir. Sürenin bitiminde steril PBS içinde 10^{-6} düzeyine kadar seyreltilerek, 6 eşit parçaya bölünmüş TSA’da her bir bölmeye 10 µL gelecek şekilde inoküle edilmiştir. 25 °C’de 24 saat inkübasyonun ardından canlı bakteri sayımı yapılmıştır (Balcazar ve ark., 2008).

Sonuçlar; üremenin olmadığı petrilere negatif (-); 1-50 arasında koloni üremesi (+); 51-150 arasında koloni sayısı, orta derece üreme yeteneği (++); 151-250 ve üstü koloni sayısı, kuvvetli üreme yeteneği (+++) olarak değerlendirilmiştir.

Phosphate Buffered Salin (PBS) çözeltisi

NaCl	8,0g	
KCl	0,2g	
Na ₂ HPO ₄	1,44g	
KH ₂ PO ₄	0,24g	
Distile su	1000mL	(pH 7,4)
	36	

3.2.6.3. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzlarına Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Potansiyel probiyotik bakterilerin PBS içerisindeki süspansiyonları 10^7 kob/mL olarak hazırlanmıştır. Balıklardan safra kesesinin patlatılmasıyla safra örnekleri toplanmış ve kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır. Bakteriyel süspansiyon, safra (%0,6; 1; 1,5) içeren 1 mL'lik tüplere inoküle edilmiştir. Örnekler 25°C 'de 1,5 saat inkübasyonun bitiminde steril PBS içinde 10^{-6} düzeyine kadar seyreltilerek, 10 μL TSA'ya inoküle edilmiş ve canlı bakteri sayımı yapılmıştır (Balcazar ve ark., 2006).

Bölmelerde yapılan koloni sayım işlemine göre; üremenin olmadığı petriler negatif (-); 1-50 arasında koloni üremesi (+); 51-150 arasında koloni sayısı, orta derece üreme yeteneği (++); 151-250 ve üstü koloni sayısı, kuvvetli üreme yeteneği (+++) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.4. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Pepsine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Suşların pepsine toleranslarının araştırılmasında, gastrik ortamın oluşturulması amacıyla pH 1,5 ve pH 3 düzeyleriyle çalışılmıştır. Her izolat için bir kontrol ve biri pH 1,5 diğeri pH 3 olmak üzere iki test grubu hazırlanmıştır. Test gruplarına, pepsin (3 mg/mL; Merck) içeren PBS çözeltisi (pH 1,5 ve pH 3) ilave edilerek, 25°C 'de 1,5 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun 1,5 saatinde kontrol ve test gruplarından alınan örnekler 10^{-6} düzeyine kadar seyreltilerek, agar ortamlarına yayma ekimler yapılmış, 25°C 'de 24 saat inkübasyondan sonra kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, canlı hücre değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis ve ark., 2006).

Buna göre; (-): negatif üremenin olmadığı; +: 1-50 arasında koloni üremesi; ++: 51-150 arasında koloni sayısı, orta derece üreme yeteneği; +++: 151-250 ve üstü koloni sayısı, kuvvetli üreme yeteneği olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Siderofor Üretim Yeteneğinin Belirlenmesi

Chrome plate count agar (CPCA) probiyotiklerin siderofor üretiminde kullanılan özel bir ortamdır. CPCA ortamı 3 solüsyon olarak hazırlanmıştır.

1. 50 mL distile suda, 60,5 mg chrome azurol S (Sigma, Almanya) çözdürülmüştür
2. 10 mL 0,01 N HCl ya 2,7 mg FeCl₃.6H (Sigma, Almanya) eklenmiştir
3. 40 mL distile suya 73 mg hexadecyltrimethylammonium bromide (Sigma, Almanya) hazırlanmıştır 1.ve 2. solüsyonlar birleştirilip, 3. solüsyonun üzerine dökülüp (pH: 6,8) otoklavlanmıştır
4. 900 mL PCA (Plate Count Agar) (Merck, Almanya) otoklavlanmıştır
5. 60°C’de soğuttuktan sonra laminar flow kabin içinde hot plate’te PCA ve boya solüsyonu yavaşça karıştırılıp, Crom Azurol S (CAS) agar oluşturulmuştur
6. Potansiyel probiyotikler, pasaj yapıldıktan sonra 25°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Shin ve ark., 2001).

Petride sarı-turuncu hareli koloniler siderofor pozitif (+),: petrideherhangi bir üremenin olmaması siderofor negatif (-)’liği ifade etmiştir.

3.2.6.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin *Vibrio fluvialis*’e Karşı Gösterdiği Antagonistik Etkinin Belirlenmesi

Çalışmada, *Vibrio fluvialis*’ekarşı antagonistik etki gösteren Potansiyel probiyotik bakterilerin seçimi yapılmıştır. Stoktan alınan suşlar koyun kanlı agara pasajlanmış ve oradan alınan kültür TSB’ye çekilerek, 25°C’de 2 gün inkübe edilmiştir. *Vibrio fluvialis* (ATCC 33809) suşu da TSB’ye çekilip 25°C’de 2 günlük bakteri kültürü elde edilmiştir. *Vibrio fluvialis*’den 100µL alınarak, 100mL TSA’ya eklenip, petrilere döküm yapılmıştır. Dökülen TSA’ların üzerinde Durham

tüpleriyle çukur açılmış ve potansiyel probiyotiklerden 25µL inoküle edilip, 25°C’de 24 saat inkübasyonları gerçekleştirilmiştir (Belkum ve ark., 1989).

İnkübasyon süresi sonunda izolatların baskın tür olarak üreme yetenekleri, potansiyel probiyotik kolonilerin varlığına göre antagonizma pozitif (+) veya negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

İzole edilen Potansiyel probiyotik bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir (Halami ve ark.,1999). Çalışmada, Potansiyel probiyotiklerin, Müller-Hinton agara (MHA, Merck, Almanya) ekimi yapılmış ve balık sağaltımında çoğunlukla kullanılan 5 farklı ticari antibiyotik diski (Oxoid, England) kullanılmıştır.

Potansiyel probiyotikler, bulanıklık 0.5 MacFarland standardına (10^8 cfu/mL) göre ayarlanıp, Mueller-Hinton agara yayma ekim yapılmıştır. Ardından Eritromisin (E, 15µg), Enrofloksasin (ENR, 5µg), Sulfametoksazol /Trimetoprim (SXT, 25µg), Amoksisillin/Clavulanik Asit (AMC, 30µg), Tetrasiklin (TE, 30 µg) belli bir açıyla yerleştirilip, 25 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

Antibiyogram testi sonucunda suşların oluşturduğu duyarlılıklar, zon çapları ölçülerek, antibiyotiklere karşı dirençli, orta hassas ve hassas olarak sınıflandırılmıştır. Zon çaplarını, 2016 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)’e göre değerlendirilmiştir.

Kullanılan antibiyotikler;

- Eritromisin (E, 15µg): Dirençli (D) $\leq$ 13; Orta Hassas (OH) 14-17; Hassas (H) $18 \geq$
- Enrofloksasin (ENR, 5 µg): Dirençli (D) $\leq$ 11; Orta Hassas (OH) 12-17; Hassas (H) $18 \geq$

- Sulfametoksazol /Trimetoprim (SXT, 25 µg): Dirençli (D) ≤ 10 ; Orta Hassas (OH) 11-15; Hassas (H) $16 \geq$
- Amoksisillin/Clavulanik Asit (AMC, 30 µg): Dirençli (D) ≤ 13 ; Orta Hassas (OH) 14-17; Hassas (H) $18 \geq$
- Tetrasiklin (TE, 30 µg): Dirençli (D) ≤ 14 ; Orta Hassas (OH) 15-18; Hassas (H) $19 \geq$

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler, SPSS (program 22) paket programında, ikili karşılaştırma (tek örnek t testi) testi yapılarak, ortalama değerler arasında oluşan farklılıklar 0,05 önem seviyesinde test edilmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. Ayrıca istatistiksel analizde parametrik olmayan veriler, Wilcoxon sıra sayıları toplamı testi yapılarak, gruplara ait veriler min-max olarak gösterilmiş ve oluşan farklılıklar $p < 0,01$ önem düzeyinde incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Araştırma Alanlarındaki Su Analizleri

Doğada (Tuzla lagünü) yapılan çalışmada elde edilen su ölçüm değerleri; sıcaklık 8,44°C, tuzluluk ‰ 40,9, pH 7,7 ve çözünmüş O₂ 8,57 mg/L olarak bulunmuştur. Yetiştiricilikte (Taşucu/Mersin) yapılan çalışmada elde edilen su ölçüm değerleri ise; sıcaklık 9,6°C, tuzluluk ‰38,54, pH 7,4ve çözünmüş O₂ 8,81mg/L olarak tespit edilmiştir. Çalışma her iki bölgede bahar mevsiminde (Nisan-Mayıs 2017) gerçekleştirilmiş olup, elde edilen su parametreleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Araştırma alanlarındaki su parametreleri

Parametreler	Doğa	Yetiştiricilik
Sıcaklık (°C)	8,44	9,6
Tuzluluk (‰)	40,87	38,54
pH	7,7	7,4
Çözünmüş O ₂ (mg/L)	8,57	8,81

4.1.2. Balıkların Boy ve Ağırlıkları

25 adet doğadan ve 25 adet yetiştiricilikten olmak üzere toplam 50 balıkta laboratuvar koşullarında boy ve ağırlık ölçümü yapılmıştır. Doğadan elde edilen balıkların ve yetiştiricilikten elde edilen balıkların ortalama total boyları sırasıyla 19,80±1,32 cm ve 21,74±1,59 cm olarak ölçülmüştür. Yetiştiricilikten elde edilen balıklar ile doğadan elde edilen balıkların ortalama ağırlıkları ise sırasıyla 160,11±17,71g ile 113,87±26,96g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen balıklarda boy ve ağırlık değerleri*

Parametreler	Doğa	Yetiştiricilik
Boy (cm)	19,80 ±1,32	21,74±1,59
Ağırlık (g)	113,87±26,96	160,11±17,71

*Çizelgede verilen değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

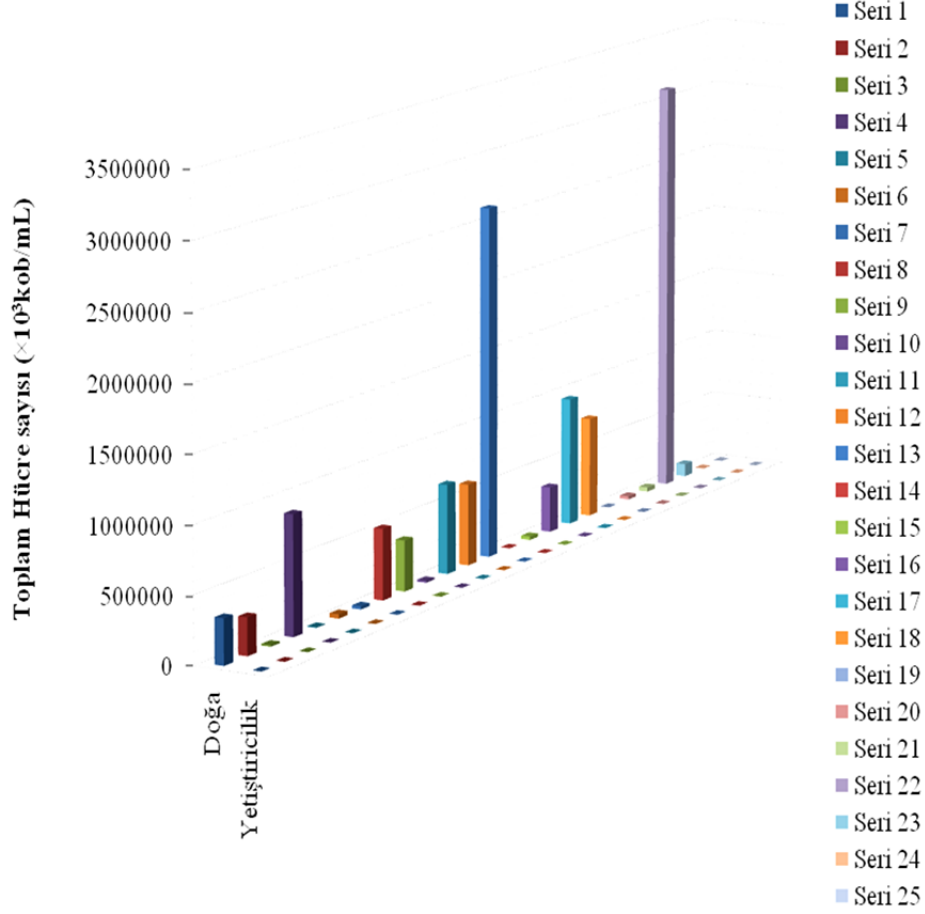
4.1.3. Toplam Aerobik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Çipuraların bağırsağından aerobik, kültüre edilebilir bakterilerin mililitrede koloni oluşturan birimi (kob/mL) belirlenmiştir. Verilen değerler istatistiksel olarak normal olmaması sebebiyle, parametrik olmayan veri analizi yapılarak, gruplara ait min-max değerler ifade edilmiştir. Buna göre, doğadan örneklenen balıkların bağırsaklarında toplam aerobik bakteri sayısı $1,98 \times 10^5$ - $3,11 \times 10^9$ kob/mL, yetiştiricilik balıklarının bağırsaklarındaki bakteri sayısı ise $0,67 \times 10^3$ - $2,44 \times 10^7$ kob/mL olarak bulunmuştur. İki grup arasında yapılan istatistiksel analizde, Wilcoxon sıra sayıları toplamı testine göre, doğadan elde edilen balıkların toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir ($w=569,5$ $p<0,01$) (Çizelge 4.3.; Şekil 4.1.)

Çizelge 4.3. Doğa ve yetiştiricilik ortamlarından elde edilen balık bağırsaklarındaki koloni sayımları

Balık no	Doğa	Yetiştiricilik
1.	$3,4 \times 10^8$	$0,56 \times 10^5$
2.	$2,8 \times 10^8$	$0,62 \times 10^4$
3.	$1,3 \times 10^7$	$0,49 \times 10^4$
4.	$0,89 \times 10^9$	$1,24 \times 10^3$
5.	$5,6 \times 10^6$	$0,94 \times 10^5$
6.	$3,3 \times 10^7$	$0,83 \times 10^5$
7.	$2,4 \times 10^7$	$1,64 \times 10^4$
8.	$5,3 \times 10^8$	$3,27 \times 10^6$
9.	$3,8 \times 10^9$	$1,53 \times 10^6$
10.	$1,5 \times 10^7$	$0,67 \times 10^3$
11.	$6,7 \times 10^8$	$0,57 \times 10^5$
12.	$6,1 \times 10^8$	$0,69 \times 10^4$
13.	$2,63 \times 10^9$	$0,78 \times 10^4$
14.	$1,96 \times 10^6$	$0,95 \times 10^3$
15.	$2,71 \times 10^7$	$1,88 \times 10^4$
16.	$3,42 \times 10^8$	$1,72 \times 10^5$
17.	$0,96 \times 10^9$	$2,68 \times 10^6$
18.	$0,75 \times 10^9$	$0,74 \times 10^5$
19.	$1,82 \times 10^6$	$2,44 \times 10^7$
20.	$1,98 \times 10^5$	$1,55 \times 10^4$
21.	$2,54 \times 10^7$	$0,63 \times 10^5$
22.	$3,38 \times 10^7$	$0,78 \times 10^6$
23.	$3,11 \times 10^9$	$1,68 \times 10^4$
24.	$0,97 \times 10^8$	$1,97 \times 10^4$
25.	$1,53 \times 10^6$	$0,88 \times 10^4$
	min-max	min-max
	$1,98 \times 10^5 - 3,11 \times 10^9$	$0,67 \times 10^3 - 2,44 \times 10^7$

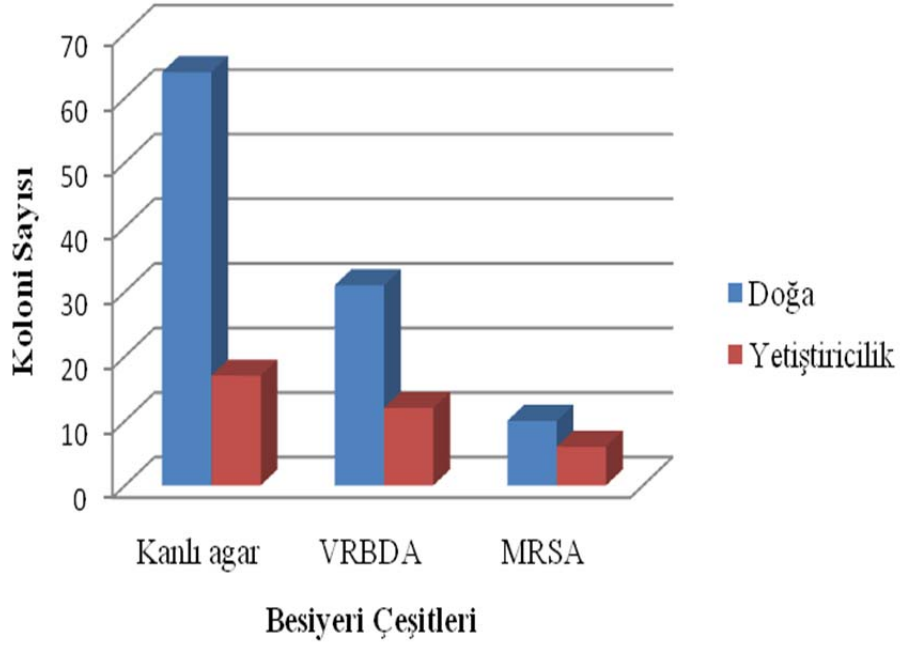
*Parametrik olmayan veri analizi yapılmış olup gruplara ait min- max değerler verilmiştir. Wilcoxon sıra sayıları toplamı testi ($w=569,5$ $p \leq 0,01$)



Şekil 4.1. Doğal ve yetiştiricilik ortamlarından elde edilen balıklarda koloni sayımları

4.1.4. Kullanılan Besiyerlerine Göre Bakterilerin Dağılımı

Balıkların bağırsak mikroflorasında yer alan genel aerobik bakteriler için kanlı agar, Enterobacteriaceae grubu için Violet Red Bile Dextrose (VRBD) agar anaerobik türler için de Man-Ragosa Shape (MRS) agar kullanılmıştır. Doğadan alınan balıkların flora elemanları kanlı agar (64 adet), VRBD agar (31 adet), MRS agar (10 adet)'da üreyen türlerin sayıları, yetiştiricilik balıklarından izole edilen kanlı agarda (17 adet), VRBD agarda (12 adet) ve MRS agarda (6 adet) üreyen türlerin sayısından yüksek bulunmuştur (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Kültür ortamlarına göre bakterilerin üreme dağılımları
 VRBDA: Violet Red Bile Dextrose Agar
 MRSA: Man-Ragosa Shape Agar

4.1.5. İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

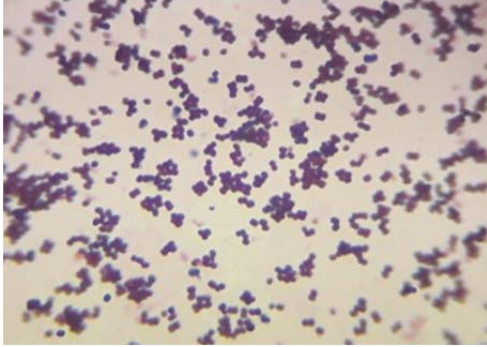
Doğadan elde edilen balıklarda kanlı agardan izole edilen bakterilerin 56 adeti Gram-negatif ve 8 adeti Gram-pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3.; Şekil 4.4.). Bunlar içerisinde 1'i katalaz negatif, 63 adeti katalaz pozitif ve 13 adeti oksidaz negatif iken; 51 adet oksidaz pozitif olarak bulunmuştur. Yetiştiricilik balıklarından izole edilen bakterilerin 13 adeti Gram-negatif, 4 adeti Gram-pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu bakterilerin 2 tanesinin katalaz negatif ve 15 tanesinin katalaz pozitif olduğu, 3 adeti oksidaz negatif ve 14 adeti ise oksidaz pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.4.; Şekil 4.5.).

Çizelge 4.4. Kanlı agardan izole edilen aerobik mikroorganizmaların biyokimyasal özellikleri

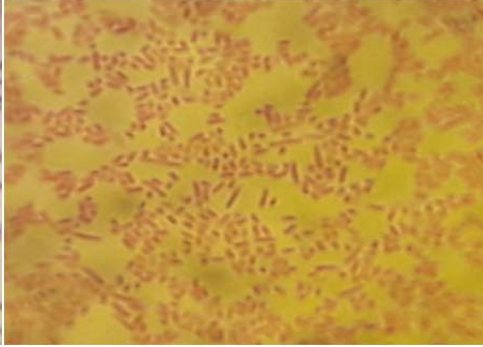
Parametreler	Doğadan elde edilen izolatlar	Yetiştiricilikten elde edilen izolatlar
Gram negatif	56	13
Gram pozitif	8	4
Katalaz negatif	1	2
Katalaz pozitif	63	15
Oksidaz negatif	13	3
Oksidaz pozitif	51	14

Enterobacteriaceae familyasının laktoz pozitif olan cinsleri, koliform grup olarak adlandırılır. Bu yüzden Laktoz pozitif türlerde, 16 izolatın tümünün, katalaz pozitif ve oksidaz negatif olduğu tespit edilmiştir. Yetiştiricilikten izole edilen bakterilerin VRB agarda üreyen 7 adetinin laktoz pozitif ve 5 adetinin ise laktoz negatif izolat olduğu ve Laktoz pozitif 7 izolatın tamamının katalaz pozitif ve oksidaz negatif olduğu bulunmuştur (Şekil 4.6.).

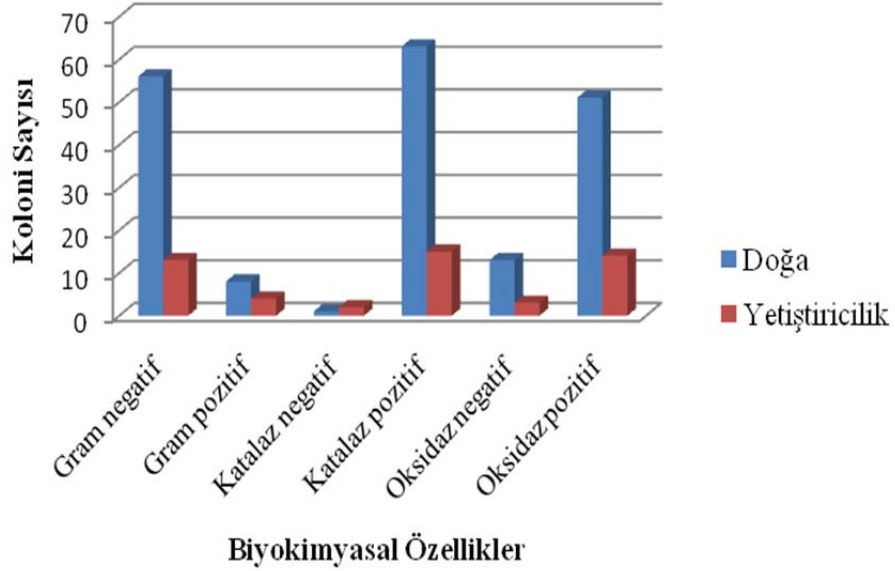
Araştırmada MRS agarda izole edilen anaerobik türler testler sırasında canlılığını koruyamadığı için araştırmadan çıkarılmak zorunda kalmıştır.



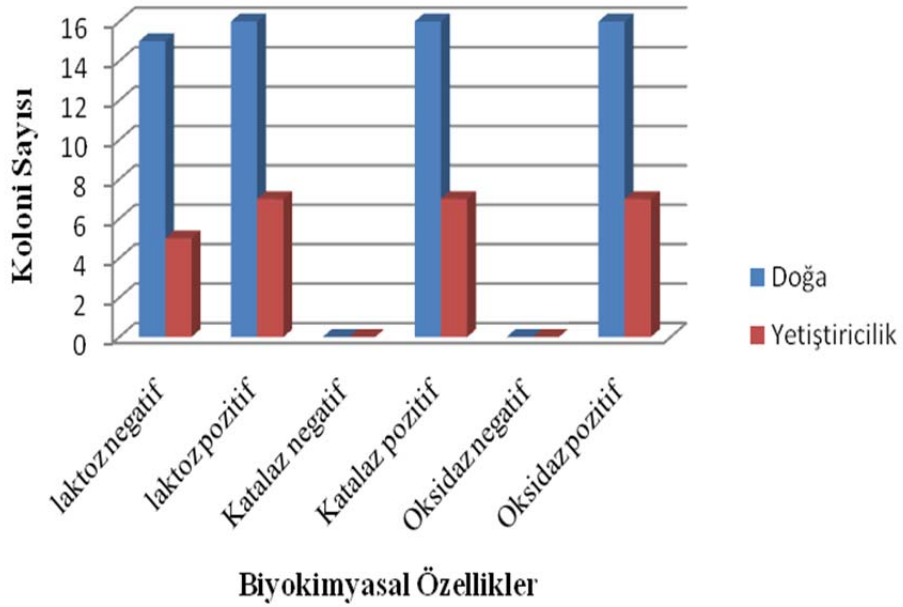
Şekil 4.3. Gram pozitif bakterilerin ışık mikroskobu görüntüsü (×100) (orjinal)



Şekil 4.4. Gram negatif bakterilerin ışık mikroskobu görüntüsü (×100) (orjinal)



Şekil 4.5. Kanlı agardan izole edilen aerobik bakterilerin biyokimyasal özellikleri



Şekil 4.6. VRBD agarda üreyen Gram negatif Enterobacteriaceae familyasının biyokimyasal özellikleri

4.1.6. İzolatların Hidrofobisite Özelliklerinin Belirlenmesi

Yapılan değerlendirme sonucunda doğadan alınan izolatlardan, 17'sinin ve yetiştiricilikten alınan izolatlardan ise 4 tanesinin hidrofobisite pozitif karakter gösterdiği (Şekil 4.7.; Çizelge 4.5.) ve diğer türler ise hidrofobisite negatif (Şekil 4.8.) olarak tespit edilmiştir. Doğadan elde edilen hidrofobisite pozitif yüzdesinin (%81), yetiştiricilikten elde edilenlere (%19) göre yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.). Hidrofobisite pozitif karakterine göre izolatlar, potansiyel probiyotik olarak sınıflandırılmıştır.



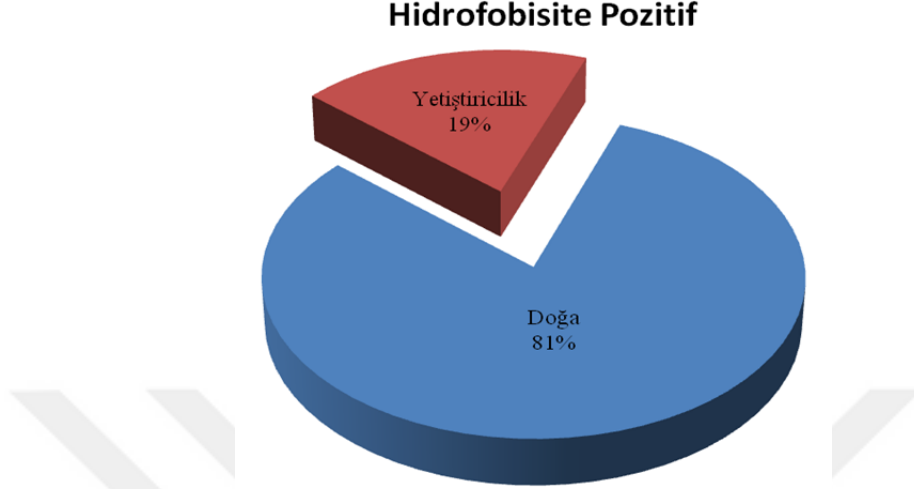
Şekil 4.7. Hidrofobisite pozitif izolatlar



Şekil 4.8. Hidrofobisite negatif izolatlar

Çizelge 4.5. İzolatların hidrofobisite özelliği

Parametre	Doğa	Yetiştiricilik
	Potansiyel Probiyotik Suş No	Potansiyel Probiyotik Suş No
Hidrofobisite Pozitif	D1; D2; D3; D4; D5; D6;	
	D7; D8; D10; D11; D12;	Y1; Y2; Y3; Y4
	D13; D14; D15; D16; D17	



Şekil 4.9. İzolatların alındığı bölgeye göre, hidrofbisite pozitif türlerin oranı

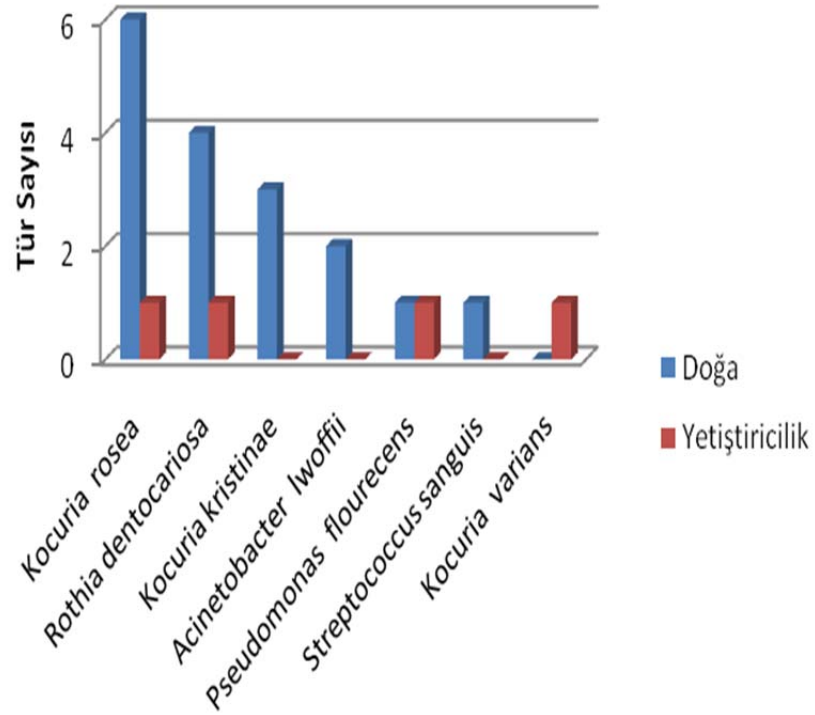
4.1.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Tür Tanımlamaları

4.1.7.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Tür Tanımlamaları

Doğadan yakalanan çipuraların bağırsak florasından izole edilen 17 adet potansiyel probiyotik suşun Vitek-II cihazıyla tür tanımlaması yapılmıştır. Buna göre; 6 suş *Kocuria rosea*, 4 suş *Rothia dentocariosa*, 3 suş *Kocuria kristinae*, 2 suş *Acinetobacter lwoffii*, 1 suş *Streptococcus sanguis* ve 1 suş *Pseudomonas flourecens* olarak tanımlanmıştır. Yetiştiricilikten alınan çipuraların bağırsak florasından izole edilen 4 adet potansiyel probiyotik suşun tür tanımlamasına göre; 1 suş *Rothia dentocariosa*, 1 suş *Kocuria rosea*, 1 suş *Kocuria varians* ve 1 suş *Pseudomonas flourecens* olarak bulunmuştur (Çizelge 4.6.; Şekil 4.10.)

Çizelge 4.6. Potansiyel probiyotiklerin fenotipik tür tanımlamaları

	Potansiyel	Tür adı	Gram boyama
	Probiyotik Suş No		
Doğa	D1	<i>Rothia dentocariosa</i>	Pozitif
	D2	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	D3	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	D4	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	D5	<i>Kocuria kristinae</i>	Pozitif
	D6	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Negatif
	D7	<i>Rothia dentocariosa</i>	Pozitif
	D8	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	D9	<i>Rothia dentocariosa</i>	Pozitif
	D10	<i>Rothia dentocariosa</i>	Pozitif
	D11	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Negatif
	D12	<i>Streptococcus sanguis</i>	Pozitif
	D13	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	D14	<i>Pseudomonas flourecens</i>	Pozitif
	D15	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	D16	<i>Kocuria kristinae</i>	Pozitif
	D17	<i>Kocuria kristinae</i>	Pozitif
Yetiştiricilik	Y1	<i>Rothia dentocariosa</i>	Pozitif
	Y2	<i>Pseudomonas flourecens</i>	Negatif
	Y3	<i>Kocuria rosea</i>	Pozitif
	Y4	<i>Kocuria varians</i>	Pozitif



Şekil 4.10. Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin tür dağılımı

4.1.7.1.(1). Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Familya Düzeyinde Sınıflandırılması

Doğadan yakalanan çipuralardan izole edilen 6 farklı tür Micrococcaceae (%52,9), Actinomycetaceae (% 23,5), Moraxellaceae (%11,8), Pseudomonadaceae (%5,9) ve Streptococcaceae (% 5,9) olarak 5 farklı familya olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.7.; Şekil 4.11.).

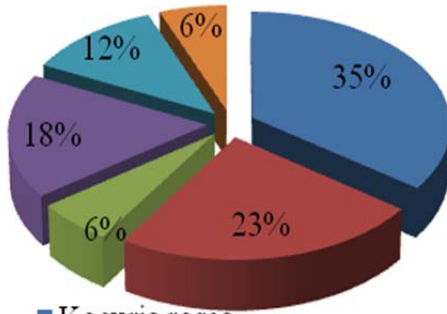
Yetiştiricilikten yakalanan çipuralardan elde edilen potansiyel probiyotiklerden 4 farklı türün, Micrococcaceae (%50), Actinomycetaceae (%25) ve Pseudomonadaceae (%25) familyalarına dahil oldukları bulunmuştur (Çizelge 4.7.; Şekil 4.11.).

Çizelge 4.7. Potansiyel probiyotik bakterilerin familya düzeyinde sınıflandırılması

	Potansiyel Probiyotik Tür Adı	N (%)	Familya
Doğa	<i>Kocuria rosea</i>	6 (35,3)	Micrococcaceae
	<i>Rothia dentocariosa</i>	4 (23,5)	Actinomycetaceae
	<i>Kocuria kristinae</i>	3 (17,6)	Micrococcaceae
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2 (11,8)	Moraxellaceae
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	1 (5,9)	Pseudomonadaceae
	<i>Streptococcus sanguis</i>	1 (5,9)	Streptococcaceae
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	1 (25)	Actinomycetaceae
	<i>Kocuria rosea</i>	1 (25)	Micrococcaceae
	<i>Kocuria varians</i>	1 (25)	Micrococcaceae
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	1 (25)	Pseudomonadaceae

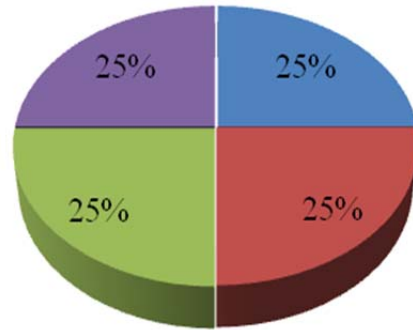
N: Tür içerisinde yer alan suş sayısı

Doğa



- *Kocuria rosea*
- *Rothia dentocariosa*
- *Pseudomonas flourecens*
- *Kocuria kristinae*
- *Acinetobacter lwoffii*
- *Streptococcus sanguis*

Yetiştiricilik



- *Kocuria rosea*
- *Rothia dentocariosa*
- *Pseudomonas flourecens*
- *Kocuria varians*

Şekil 4.11. Doğadan ve yetiştiricilikten izole edilen potansiyel probiyotik bakterilerin oransal dağılımı

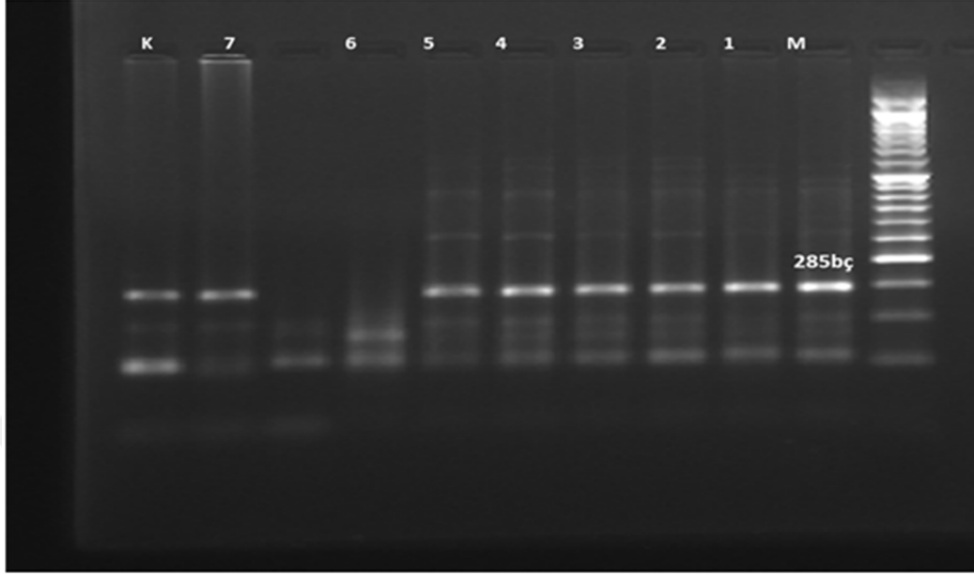
4.1.7.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Genotipik Tür Tanımlamaları: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Fenotipik olarak elde edilen tür adlarını, moleküler açıdan kanıtlayabilmek için gen banktan 16S rRNA üzerinde türe özgü primerler sentezletilip PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Buna göre; *Kocuria kristinae* 480 baz çifti (bç), *Kocuria rosea* 285 bç, *Kocuria varians* 220 bç, *Pseudomonas flourecens* 351 bç, *Rothia dentocariosa* 293 bç, *Streptococcus sanguis* 238 bç, *Acinetobacter lwoffii* 400 bç’de bant vermiştir (Çizelge 4.8. ve Şekil 4.12.; 4.13.; 4.14.; 4.15.; 4.16.; 4.17.; 4.18.).

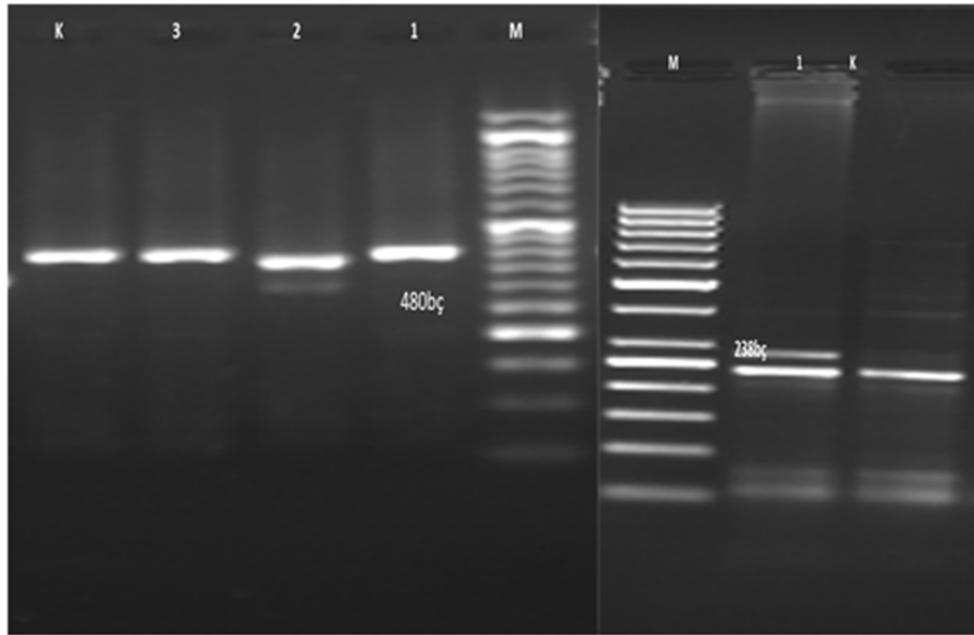
Çizelge 4.8. Potansiyel probiyotik bakterilerin PZR protokolü

Potansiyel Probiyotikler	Primer dizisi(5'-3')	Döngü	T _A (°C)	Baz çifti (bç)	Kaynak
<i>Kocuria kristinae</i>	CGGTACCTGCAGAAGAAGCG ATGTCCCCACACCTAGTGC	40	64	480	Genbank
<i>Kocuria rosea</i>	GAGAGTGACGGTACCTGCAG TCAGCGTCAGTAACAGCCCA	40	63	285	Genbank
<i>Kocuria varians</i>	CGGTTTGTGCGGTCTGCTGT TCAGCGTCAGTAACAGCCCA	40	63	220	Genbank
<i>Pseudomonas flourecens</i>	CCTTCGGGAACATTGAGACA CACCGCGACATTCTGATTCG	37	61	351	Genbank
<i>Rothia dentocariosa</i>	GTCGTGAGATGTTGGGTAA CGTTGCTGATCTGCGATTAC	42	70	293	Genbank
<i>Streptococcus sanguis</i>	GGTAATACGTAGGTCCCGAG TACGCATTTACCGCTACAC	42	61	238	Genbank
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATTGACGAGAAATTTGCCGA ACCTTTGTTACCGTGACGAC	40	58	400	Genbank

T_A (°C): Primer bağlanma sıcaklığı

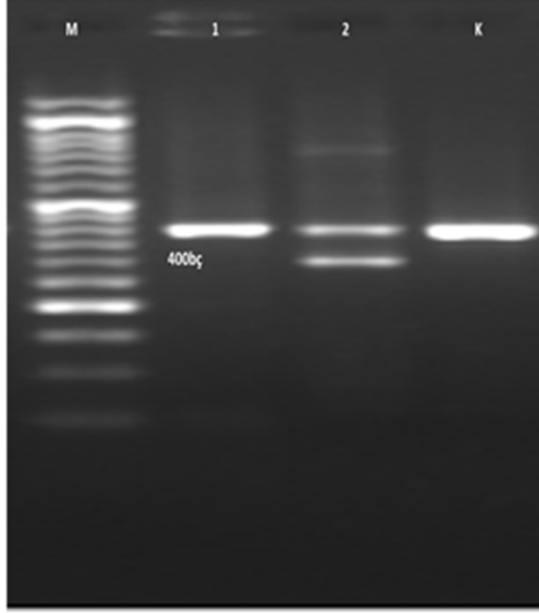


Şekil 4.12. *K. rosea* bant görüntüsü (285bç)
M: Marker (100bç); K: Kontrol

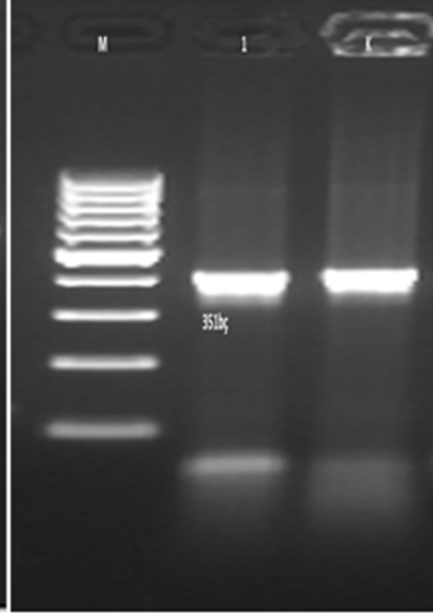


Şekil 4.13. *K. kristinae* bant görüntüsü
(480bç)
M: Marker (50bç); K: Kontrol

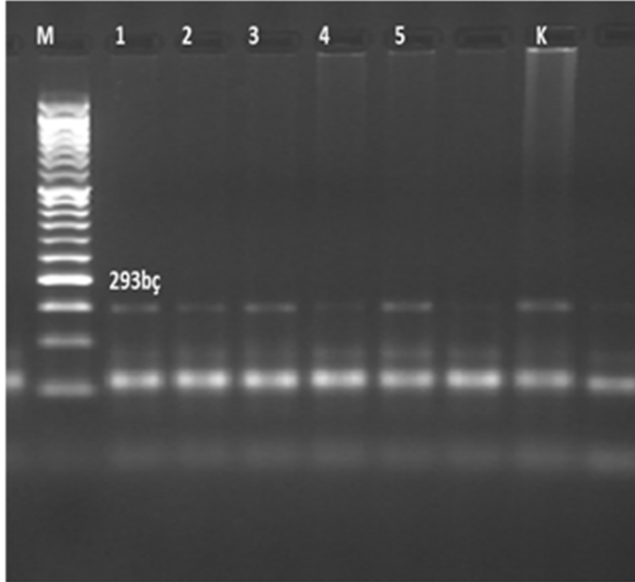
Şekil 4.14. *S. sanguis* bant
görüntüsü (238bç)
M: Marker (50bç); K: Kontrol



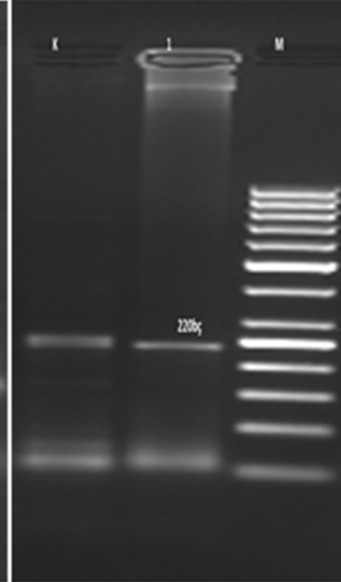
Şekil 4.15. *A. lwoffii* bant görüntüsü (400bç)
M: Marker (50bç); K: Kontrol



Şekil 4.16. *P. flourecens* bant görüntüsü (351bç)
M: Marker (100bç); K: Kontrol



Şekil 4.17. *R. dentocariosa* bant görüntüsü (293bç)
M: Marker (100bç); K: Kontrol



Şekil 4.18. *K. varians* bant görüntüsü (220bç)
M: Marker (50bç); K: Kontrol

4.1.8. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karakterizasyonu

4.1.8.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi

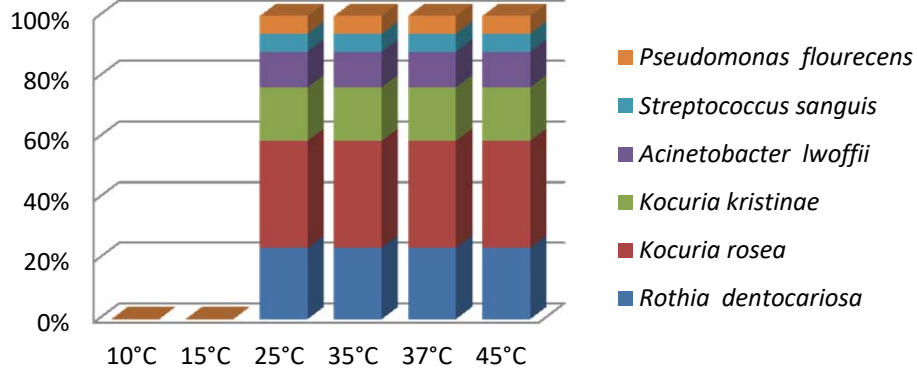
Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki üremeleri test edilmiştir. Buna göre; hem doğadan hem de yetiştiricilikten elde edilen tüm potansiyel probiyotikler, 10°C ve 15°C’de üreme göstermezken, 25°C, 37°C, 45°C inkübasyon sıcaklıklarında üreme tespit edilmiştir (Çizelge 4.9.; Şekil 4.19.; Şekil 4.20.).

Çizelge 4.9. Potansiyel probiyotik bakterilerin sıcaklık toleransları

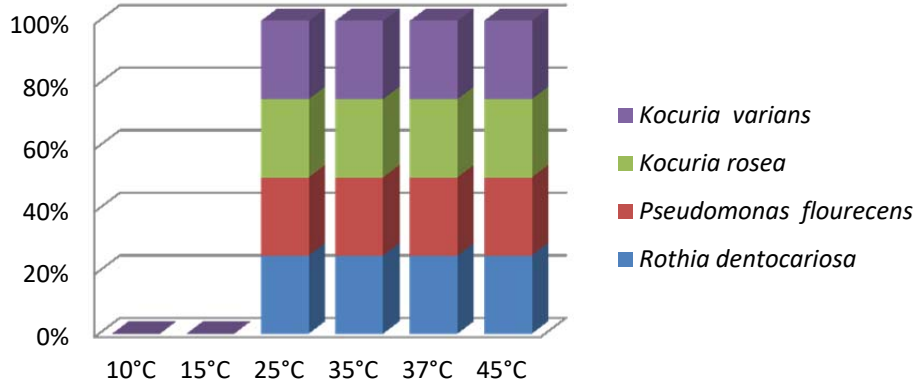
	Potansiyel Probiyotikler	İnkübasyon Sıcaklığı				
		10°C	15°C	25°C	37°C	45°C
Doğa	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	+	+	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	+	+	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	+	+	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	+	+	+
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	-	+	+	+
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-	-	+	+	+
	<i>Streptococcus sanguis</i>	-	-	+	+	+
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	+	+	+
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	+	+	+
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-	-	+	+	+
	<i>Kocuria varians</i>	-	-	+	+	+

+: inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak bakterinin ürediği

-: inkübasyon sıcaklığına bağlı olarak bakterinin üremediği



Şekil 4.19. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin inkübasyon sıcaklık toleransları



Şekil 4.20. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin inkübasyon sıcaklık toleransları

4.1.8.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Asite Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Potansiyel probiyotiklerin asidik (pH 1 ve pH 3) ve nötr (pH 7) ortamda üreme yetenekleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.21.). Doğadan elde edilen bakterilerden; *Rothia dentocariosa*'ya ait 3 suş pH 3 ve 7 de kuvvetli üreme gösterirken, pH 1'de üreme görülmemiş ve 1 suş hem pH 1 de hem de pH 3'te üreme göstermemiştir. *Kocuria rosea*'nın 4 suşu pH 3 ve pH 7'de kuvvetli ürerken,

pH 1’de üreme göstermediği, ayrıca diğer 2 suşun ise pH 1, pH 3 ve pH 7’de üreyebilmiştir. *Kocuria kristina*’ya ait 3 suş pH 1 ve pH 3’te üreme görülmezken, pH 7’de üreme göstermiştir. *Acinetobacter lwoffii* suşları her üç pH (pH 1, 3 ve 7)’da üreme sağlayabilmiştir. *Streptococcus sanguis* suşu, pH 1 ve pH 3 gelişim gösterememiş, ancak pH 7’de kuvvetli bir üreme kaydedilmiştir. *Pseudomonas flourecens* suşu ise pH 3 varlığını koruyabilmiş ve pH 7’de kuvvetli bir üreme gösterirken, pH 1’de ise gelişim gösterememiştir (Çizelge 4.10.; Şekil 4.22.)

Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden, *Rothia dentocariosa* suşu pH 3 ve pH 7’de üreme gösterirken, pH 1’de üreme göstermemiştir. *Pseudomonas flourecens* ve *Kocuria rosea* suşları pH 3 varlığını korumuş, pH 7’de kuvvetli bir üreme kaydedilmiştir. Fakat pH 1 olan ortamda varlık gösterememişlerdir. *Kocuria varians* suşu ise sadece pH 7’de kuvvetli üreme yeteneği göstermiş, pH 1 ve pH 3’te varlık gösterememiştir (Çizelge 4.10.; Şekil 4.23.).

Elde edilen sonuçlar yetiştiricilikten ve doğadan elde edilen ortak 3 tür üzerinde farklı pH değerleri açısından benzer üreme yetenekleri ortaya koymuştur.

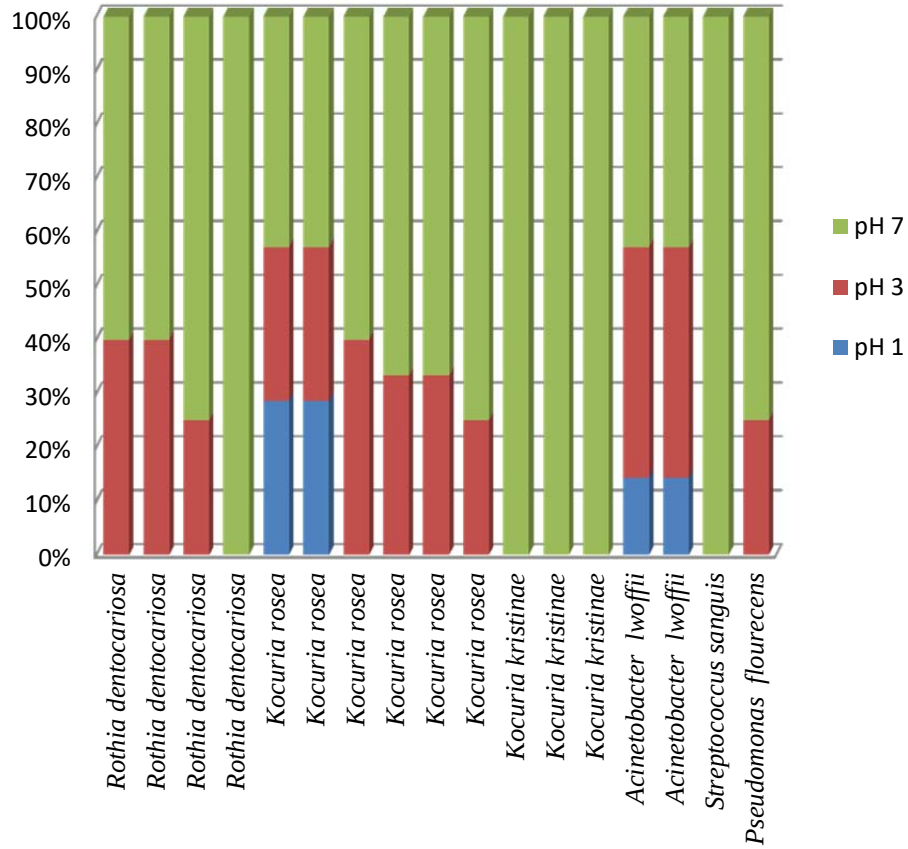
Çizelge 4.10. Potansiyel probiyotik bakterilerin asit toleransları

	Potansiyel Probiyotikler	pH 1	pH 3	pH 7
Doğa	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++	+++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++	+++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	+	+++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	++	++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	++	++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	-	++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	-	+	++
	<i>Kocuria rosea</i>	-	+	++
	<i>Kocuria rosea</i>	-	+	+++
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	+++
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	+++
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	-	+++
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+	+++	+++
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+	+++	+++
	<i>Streptococcus sanguis</i>	-	-	+++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	-	+	+++
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	+	+++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	-	+	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	-	+	+++
	<i>Kocuria varians</i>	-	-	+++

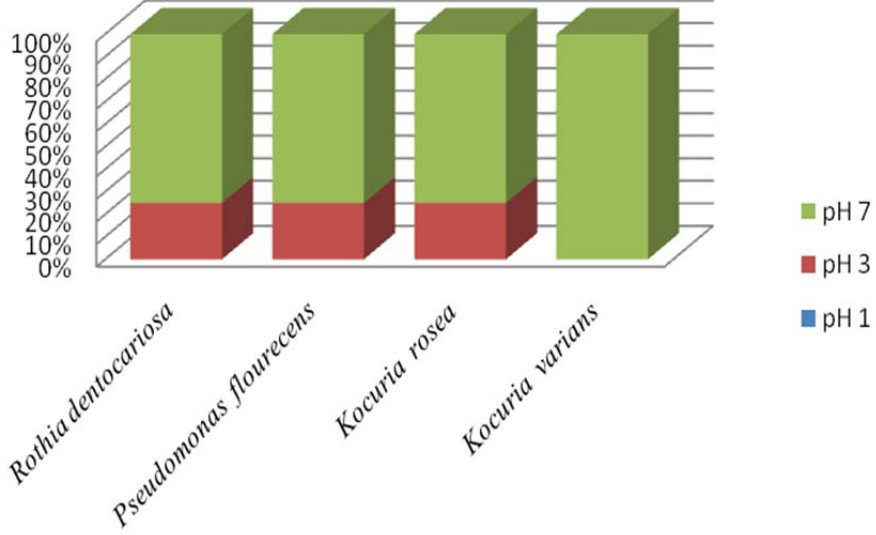
-: Üremenin olmadığı; +: koloni üremesi; ++: orta derece üreme yeteneği;
 +++: güçlü üreme yeteneği



Şekil 4.21. Potansiyel probiyotik bakterilerin asit tolerans görüntüleri (orjinal)



Şekil 4.22. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin asit toleransları



Şekil 4.23. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin asit toleransları

4.1.8.3. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzlarına Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Potansiyel probiyotiklerin farklı safra oranlarına karşı dayanma yeteneği test edilmiştir (Şekil 4.24.). Buna göre doğadan alınan potansiyel probiyotiklerden; *Rothia dentocariosa*'nın 4 suşunun 2'si 3 farklı safra oranında (% 0,6; 1; 1,5) kuvvetli üreme gösterirken, diğer 2 suş (% 0,6; 1; 1,5) safra içeriğinde üreme gösterememiştir. *Kocuria rosea*'nın 4 suşu %0,6 ve 1 safrada kuvvetli bir üreme sergilemiş ve % 1,5 safrada üreyememiştir. Diğer 2 suşu ise safranın tüm oranlarında (% 0,6; 1; 1,5) kuvvetli bir gelişim göstermiştir. *Kocuria kristinae*'ye ait 3 suş % 0,6 ve 1 safrada kuvvetli bir üreme göstermiş, %1,5 ta varlığını sürdürememiştir. *Acinetobacter lwoffii*'nin 2 suşu, *Streptococcus sanguis* ve *Pseudomonas flourecens* suşları, safranın tüm oranlarında (% 0,6; 1; 1,5) kuvvetli bir üreme yeteneği göstermiştir (Çizelge 4.11; Şekil 4.25.).

Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik türlerden; *Rothia dentocariosa* ve *Pseudomonas flourecens* suşları safranın farklı oranlarında kuvvetli

üreme göstermiştir. *Kocuria rosea* suşu sadece %1,5 safrada üreme gösterememiş, % 0,6 ve % 1 safra içeriğinde ise kuvvetli bir üreme yeteneği sergilemiştir. *Kocuria varians* ise safranın farklı oranlarında varlığını sürdürememiştir (Çizelge 4.10; Şekil 4.26.).

Yetiştiricilik ve doğadan elde edilen ortak suşlar (*Rothia dentocariosa*, *Pseudomonas flourecens* ve *Kocuria rosea*) safraya (% 0,6; 1; 1,5) karşı kuvvetli üreme yeteneğiyle benzer yanıtlar vermiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Potansiyel probiyotik bakterilerin safra tuzlarına karşı toleransları

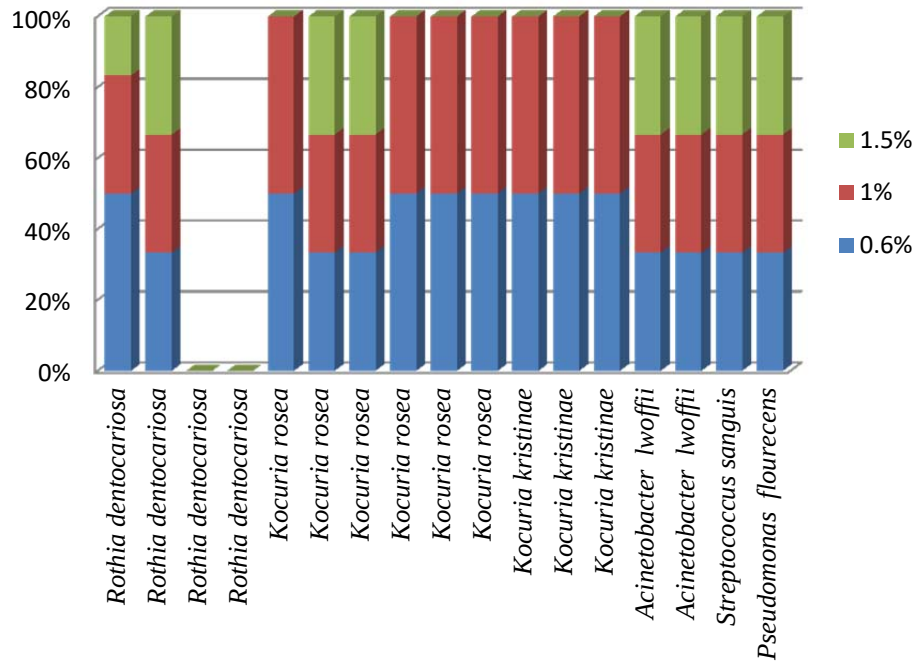
	Potansiyel Probiyotikler	Safra		
		% 0,6	% 1	% 1,5
Doğa	<i>Rothia dentocariosa</i>	+++	+++	+++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+++	+++	+++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	-
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	-
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	+++	+++	-
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+++	+++	+++
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+++	+++	+++
	<i>Streptococcus sanguis</i>	+++	+++	+++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	+++	+++	+++
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	+++	+++	+++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	+++	+++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	+++	+++	-
	<i>Kocuria varians</i>	-	-	-

-: Üremenin olmadığı; +: koloni üremesi; ++: orta derece üreme yeteneği;

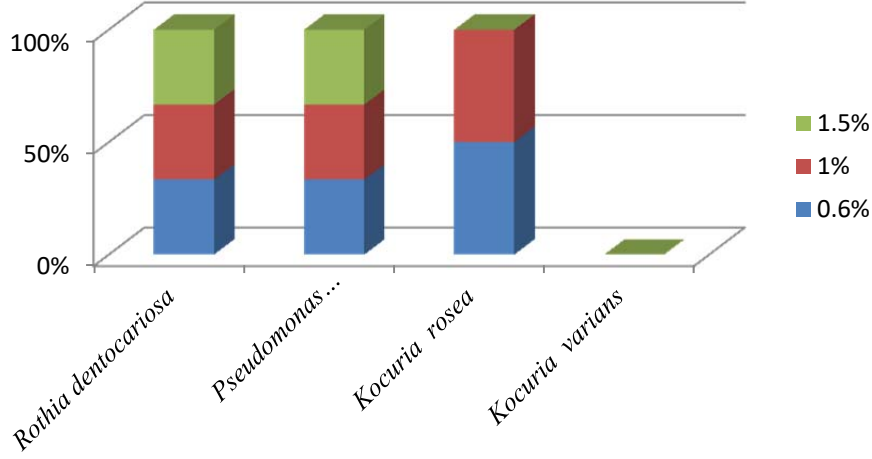
+++; güçlü üreme yeteneği



Şekil 4.24. Potansiyel probiyotik bakterilerin safraya karşı dirençleri (orjinal)



Şekil: 4.25. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin safra tuzlarına karşı toleransları



Şekil 4.26. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin safra tuzlarına karşı toleransları

4.1.8.4. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Pepsine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin, farklı asit değerleri (pH 1,5 ve pH 3) içerisindeki pepsin enzimine karşı gösterdikleri direnç araştırılmıştır (Şekil 4.27.). Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *Rothia dentocariosa*'ya ait 4 suş pepsin+pH 1,5 ortamında yaşamını sürdürememiş, ancak pepsin+pH 3 ortamında varlığını koruyabilmiştir. *Kocuria rosea*'ya ait 6 suşun tamamı ise pepsinin pH 1,5 ve pH 3'te kuvvetli üreme kaydetmiştir. *Kocuria kristinae*'ye ait 2 suş, pepsinin her iki asitlik değer (pH 1,5 ve pH 3)'de üreme yeteneği göstermiş, 1 suş ise pepsin+pH 3 ortamında ürerken, pepsin+pH 1,5 ortamında varlığını koruyamamıştır. *Acinetobacter lwoffii*'ye ait 2 suş ve *Streptococcus sanguis* suşu pepsin+pH1,5 ve pepsin+pH3 ortamında üremesini göstermiştir. Fakat *Pseudomonas flourecens* suşu pepsin+pH 1,5 ve pepsin+pH 3 ortamlarında varlığını koruyamamıştır (Çizelge 4.12; Şekil 4.28.)

Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *Rothia dentocariosa* suşunun pepsin+pH 1,5'te üreme göstermediği, fakat pepsin+pH 3'te varlığını

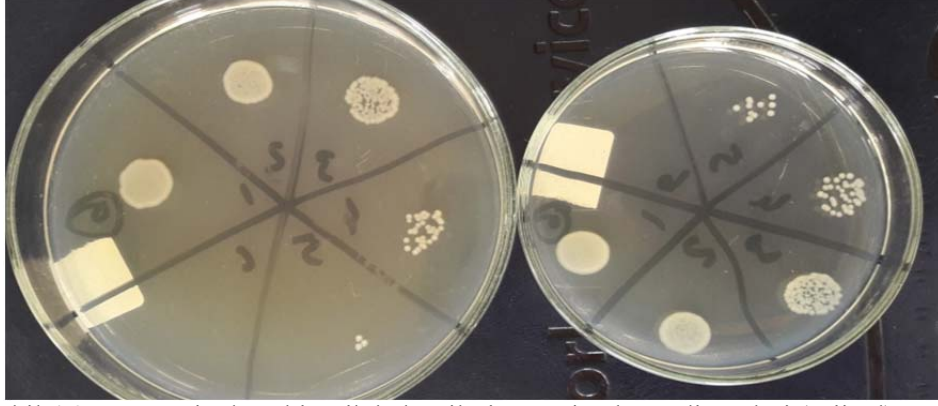
sürdürebildiği tespit edilmiştir. *Pseudomonas flourecens* pepsin+pH 1,5 ve pepsin+pH 3 ortamlarında üreme gösterememiştir. *Kocuria rosea* ve *Kocuria varians* suşları, pepsin+pH 1,5 ve pepsin+pH 3 ortamlarında varlıklarını koruyabilmişlerdir (Çizelge 4.12.; Şekil 4.29.).

Hem doğadan hem de yetiştiricilikten elde edilen ortak türler olarak *Rothia dentocariosa*, *Pseudomonas flourecens* ve *Kocuria rosea*, pepsin+pH 1,5 ve pepsin+pH 3 ortamlarında benzer oranda direnç göstermiştir.

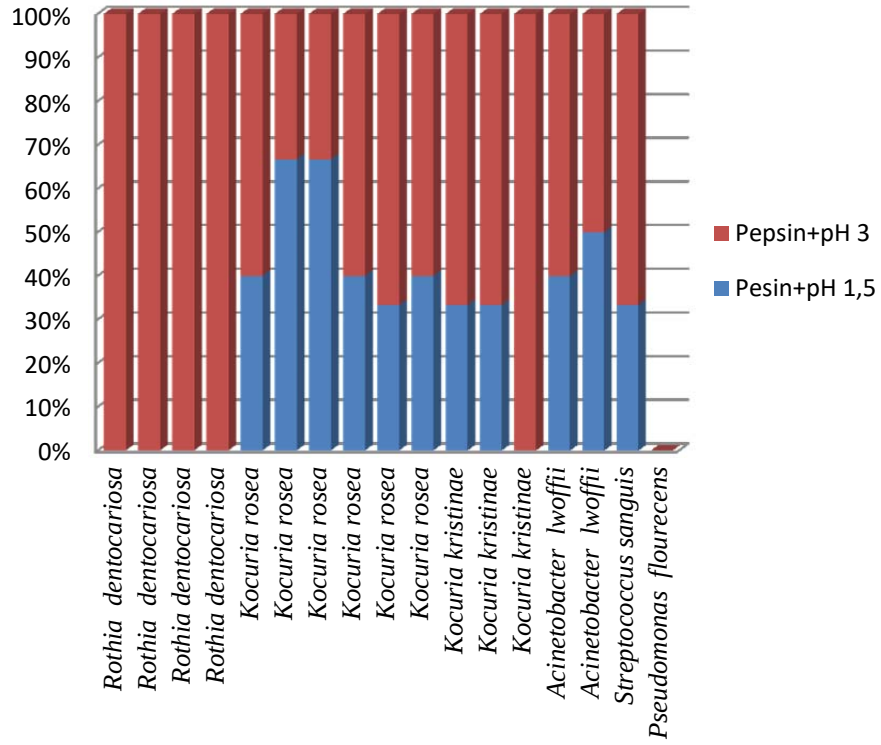
Çizelge 4.12. Potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı toleransları

	Potansiyel Probiyotikler	Pesin+pH 1,5	Pepsin+pH 3
Doğa	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++
	<i>Kocuria rosea</i>	++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	++	+
	<i>Kocuria rosea</i>	++	+
	<i>Kocuria rosea</i>	++	+++
	<i>Kocuria rosea</i>	+	++
	<i>Kocuria rosea</i>	++	+++
	<i>Kocuria kristinae</i>	+	++
	<i>Kocuria kristinae</i>	+	++
	<i>Kocuria kristinae</i>	-	++
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	++	++
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	++	++
	<i>Streptococcus sanguis</i>	+	++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	-	-
	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	-	-
	<i>Kocuria rosea</i>	++	++
	<i>Kocuria varians</i>	+	+
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	-	++
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	-	-
	<i>Kocuria rosea</i>	++	++
	<i>Kocuria varians</i>	+	+

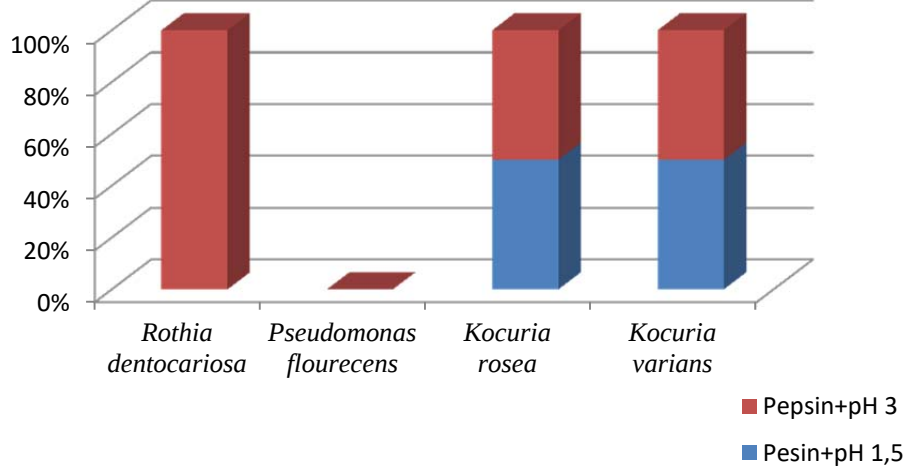
-: Üremenin olmadığı; +: koloni üremesi; ++: orta derece üreme yeteneği; +++: güçlü üreme yeteneği



Şekil 4.27. Potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı dirençleri (orjinal)



Şekil 4.28. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı toleransları



Şekil 4.29. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin pepsine karşı toleransları

4.1.8.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Siderofor Üretim Yeteneğinin Belirlenmesi

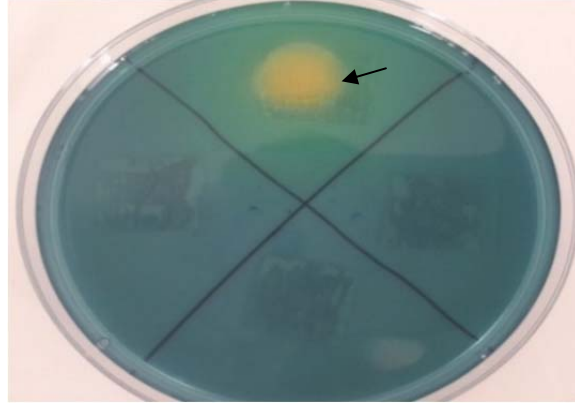
Potansiyel probiyotiklerin siderofor (konaktan veya demir sınırlı ortamlardan demir alımı için etkin mekanizmalar) oluşturma yetenekleri test edilmiştir (Şekil 4.30.). Buna göre *Rothia dentocariosa*'ya ait 4 suşu siderofor yeteneği göstermiş, buna karşın *Kocuria rosea*'nın 6 suşu ve *Kocuria kristinae*'nin 3 suşu siderofor oluşturma yeteneği gösterememiştir. *Acinetobacter lwoffii* ait 2 suş ve *Pseudomonas flourecens* suşu siderofor oluşturmuş, fakat *Streptococcus sanguis*'de siderofor yeteneği gözlenmemiştir (Çizelge 4.13.; Şekil 4.31.).

Yetiştiricilikte *Rothia dentocariosa* ve *Kocuria rosea* suşları siderofor oluşturmazken, *Pseudomonas flourecens* ve *Kocuria varians* suşlarının siderofor yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13; Şekil 4.32.). Doğadan ve yetiştiricilikten alınan ortak türler karşılaştırıldığında, *Kocuria rosea*'nın siderofor yeteneğinin olmayışı ve *Pseudomonas flourecens*'in siderofor yeteneği göstermesi, iki tür açısından benzer sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.13.).

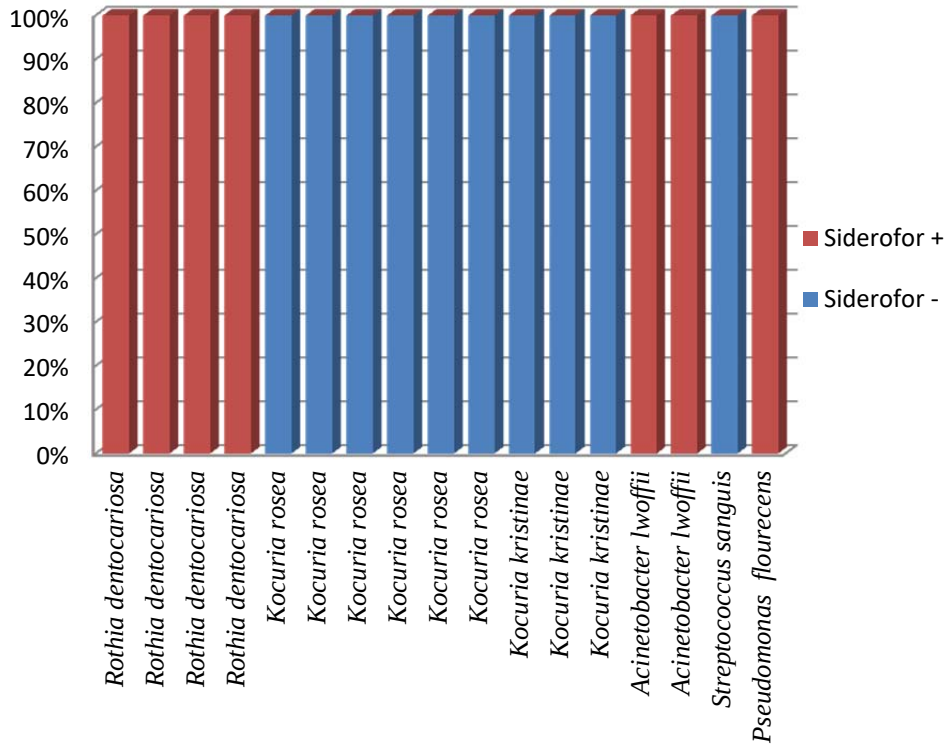
Çizelge 4.13. Potansiyel probiyotik bakterilerin siderofor yetenekleri

	Potansiyel Probiyotikler	Siderofor
Doğa	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+
	<i>Streptococcus sanguis</i>	-
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	+
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	-
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria varians</i>	+

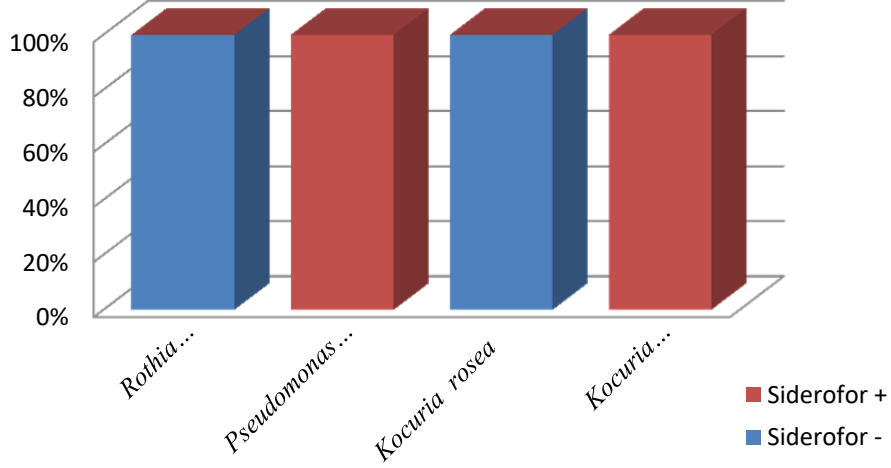
-: siderofor yokluğu; +: siderofor üretimi



Şekil 4.30. Kùltür ortamında siderofor üretim yeteneği sarı turuncu renk değişimi (orjinal)



Şekil 4.31. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin siderofor üretim yetenekleri



Şekil 4.32. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin siderofor üretim yetenekleri

4.1.8.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin *Vibrio fluvialis*'e Karşı Gösterdiği Antagonistik Etkinin Belirlenmesi

Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin *Vibrio fluvialis*'e karşı antagonistik etkisi test edilmiştir. Buna göre, doğadan elde edilen potansiyel probiyotikler; *Rothia dentocariosa* türüne ait 4 suşun tamamı antagonizma göstermiştir. *Kocuria rosea*'ya ait 5 suşun antagonistik etki gösterdiği, 1 suşun ise antagonizma göstermediği tespit edilmiştir. *Kocuria kristinae*'ye ait 3 suş antagonizma göstermemiş, *Acinetobacter lwoffii*'nin 2 suş ve *Pseudomonas flourecens*'in ise antagonistik etki yarattığı izlenmiştir. Diğer yandan *Streptococcus sanguis* ise antagonizma göstermemiştir (Çizelge 4.14.; Şekil 4.34.)

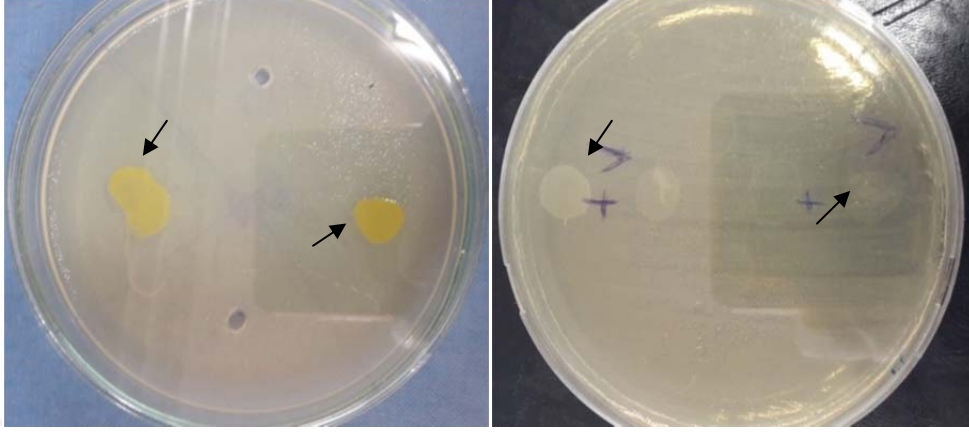
Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotikler; *Rothia dentocariosa* ve *Pseudomonas flourecens*'a ait 1'er suş antagonizma göstermiş, *Kocuria rosea* ve *Kocuria varians*'a ait 1'er suş antagonizma yaratmamıştır (Çizelge 4.15.; Şekil 4.35.).

Hem doğa ve hem de yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotikler arasında *Rothia dentocariosa* ve *Pseudomonas flourecens*'in *Vibrio fluvialis*'e karşı antagonistik etki yarattığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.14. Şekil 4.33.).

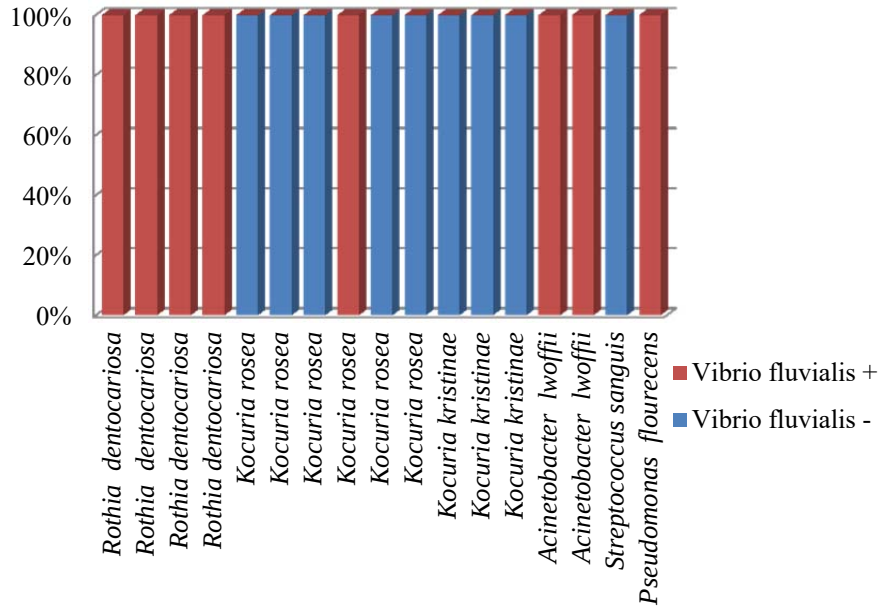
Çizelge 4.14. Potansiyel probiyotik bakterilerin *V. fluvialis*'e karşı gösterdiği antagonizma

	Potansiyel Probiyotikler	Antagonizma
Doğa	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-
	<i>Kocuria kristinae</i>	-
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+
	<i>Streptococcus sanguis</i>	-
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	+
Yetiştiricilik	<i>Rothia dentocariosa</i>	+
	<i>Pseudomonas flourecens</i>	+
	<i>Kocuria rosea</i>	-
	<i>Kocuria varians</i>	-

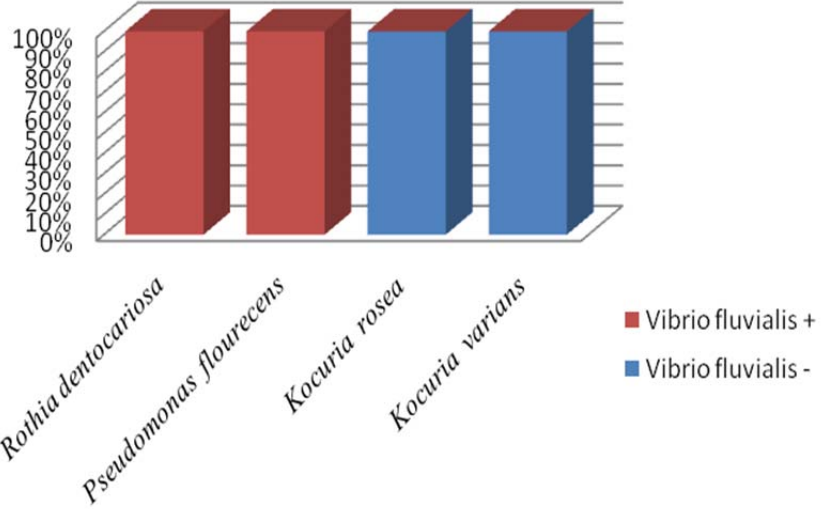
-: Antagonistik etkinin olmadığı; +: Antagonistik etkinin varlığı



Şekil 4.33. *Vibrio fluvialis*'e karşı antagonistik etkinin kültürdeki görüntüleri (orjinal)



Şekil 4.34. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin antagonistik etkileri



Şekil 4.35. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotik bakterilerin antagonistik etkileri

4.1.8.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

Potansiyel probiyotiklerin antibiyotik duyarlılık testleri için 5 farklı ticari antibiyotik diski kullanılmıştır (Şekil 4.36.). Buna göre antibiyotiklere karşı gösterilen tepkiler, ölçümler sonucunda; dirençli, orta hassas ve hassas olarak 3 gruba ayrılmıştır.

Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *Rothia dentocariosa*'nın tüm suşları eritromisin (E), enrofloksasin (ENR), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT), amoksisillin/klavulanik asit (AMC), tetrasiklin (TE)'e karşı duyarlı olarak tespit edilmiştir. *Kocuria rosea*'ya ait 2 suş eritromisin'e karşı dirençli iken, diğer antibiyotiklere (ENR, SXT, AMC, TE) karşı hassas, 1 suşu eritromisin'e karşı orta dirençli, fakat diğer antibiyotiklere karşı hassas bulunmuştur. *Rothia*'nın diğer 3 suşu ise uygulanan 5 antibiyotiğe karşı hassas bulunmuştur. *Kocuria kristinae*'in 1 suşu eritromisin'e dirençli diğer antibiyotiklere hassas, 1 suşu eritromisin'e karşı orta hassas ve diğer antibiyotiklere hassas olarak tespit edilmiştir. *K. kristinae*'nin 1 suşu ise tüm antibiyotiklere (E, ENR, AMC, SXT,

TE) karşı hassasiyet göstermiştir. *Acinetobacter lwoffii*'ye ait 2 suş ve *Pseudomonas flourecens* suşu tüm antibiyotiklere karşı hassasiyet göstermiştir. *Streptococcus sanguis* suşu eritromisin'e dirençli, ancak ENR, AMC, SXT, TE'ye karşı hassasiyet bulunmuştur (Çizelge 4.15.; Şekil 4.37.).

Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *Rothia dentocariosa* ve *Kocuria rosea* suşlarının uygulanan tüm antibiyotiklere (E, ENR, AMC, SXT, TE) karşı hassas oldukları görülmüştür. *Pseudomonas flourecens*'in ise E, SXT ve AMC' ye direnç gösterdiği, yalnız TE ve ENR'ye hassas olduğu tespit edilmiştir. *Kocuria varians* ise E ve AMC'ye direnç geliştirmiş, TE, ENR ve SXT'ye hassasiyet göstermiştir (Çizelge 4.15.; Şekil 4.38.).

Doğadan ve yetiştiricilikten elde edilen ortak türlerden *Rothia dentocariosa* ve *Kocuria rosea*, hem doğa hem de yetiştiricilikte antibiyotiklere karşı hassasiyet göstererek benzer yanıtlar vermiştir. Fakat *Pseudomonas flourecens* doğada tüm antibiyotiklere karşı hassasken, yetiştiricilikte E, SXT ve AMC'ye karşı direnç geliştirmiştir.

Çizelge 4.15. Antibiyotik duyarlılık testi*

Potansiyel probiyotikler	ANTİBİYOTİK DİSKLERİ				
	E (15µg)	ENR (5µg)	SXT (25µg)	AMC (30µg)	TE (30µg)
<i>Rothia dentocariosa</i>	27mm (H)	32mm (H)	35mm (H)	40mm (H)	35mm (H)
<i>Rothia dentocariosa</i>	31mm (H)	28mm (H)	30mm (H)	25mm (H)	26mm (H)
<i>Rothia dentocariosa</i>	36mm (H)	32mm (H)	27mm (H)	31mm (H)	28mm (H)
<i>Rothia dentocariosa</i>	33mm (H)	32mm (H)	29mm (H)	37mm (H)	35mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	15mm (OH)	33mm (H)	30mm (H)	32mm (H)	35mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	9mm (D)	36mm (H)	42mm (H)	40mm (H)	34mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	28mm (H)	35mm (H)	30mm (H)	30mm (H)	35mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	44mm (H)	31mm (H)	40mm (H)	29mm (H)	32mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	10mm (D)	40mm (H)	38mm (H)	40mm (H)	40mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	32mm (H)	35mm (H)	40mm (H)	39mm (H)	35mm (H)
<i>Kocuria kristinae</i>	16mm (OH)	30mm (H)	21mm (H)	8mm (H)	26mm (H)
<i>Kocuria kristinae</i>	0 (D)	34mm (H)	18mm (H)	36mm (H)	28mm (H)
<i>Kocuria kristinae</i>	25mm (H)	32mm (H)	35mm (H)	41mm (H)	40mm (H)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	25mm (H)	33mm (H)	27mm (H)	41mm (H)	35mm (H)
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	23mm (H)	41mm (H)	30mm (H)	43mm (H)	12mm (H)
<i>Streptococcus sanguis</i>	11mm (D)	34mm (H)	18mm (H)	36mm (H)	28mm (H)
<i>Pseudomonas flourecens</i>	35mm (H)	29mm (H)	36mm (H)	33mm (H)	32mm (H)
<i>Rothia dentocariosa</i>	26mm (H)	29mm (H)	31mm (H)	35mm (H)	30mm (H)
<i>Pseudomonas flourecens</i>	0 (D)	30mm (H)	0 (D)	0 (D)	21mm (H)
<i>Kocuria rosea</i>	25mm (H)	30mm (H)	32mm (H)	30mm (H)	32mm (H)
<i>Kocuria varians</i>	9mm (D)	39mm (H)	25mm (H)	15mm (D)	34mm (H)

E (Eritromisin): Dirençli (D) ≤ 13; Orta Hassas (OH) 14-17; Hassas (H) 18≥

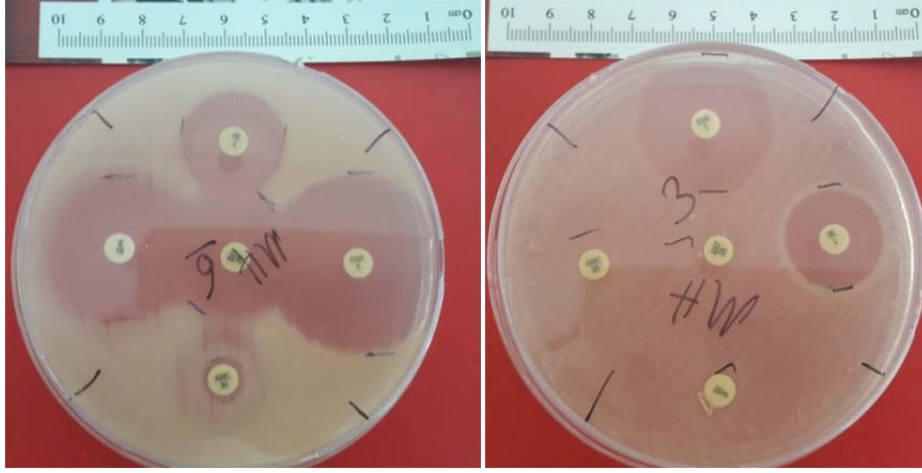
ENR (Enrofloksasin): Dirençli (D) ≤ 11; Orta Hassas (OH) 12-17; Hassas (H) 18≥

SXT (Sulfametoksazol /Trimetoprim): Dirençli (D) ≤ 10; Orta Hassas (OH) 11-15; Hassas (H) 16≥

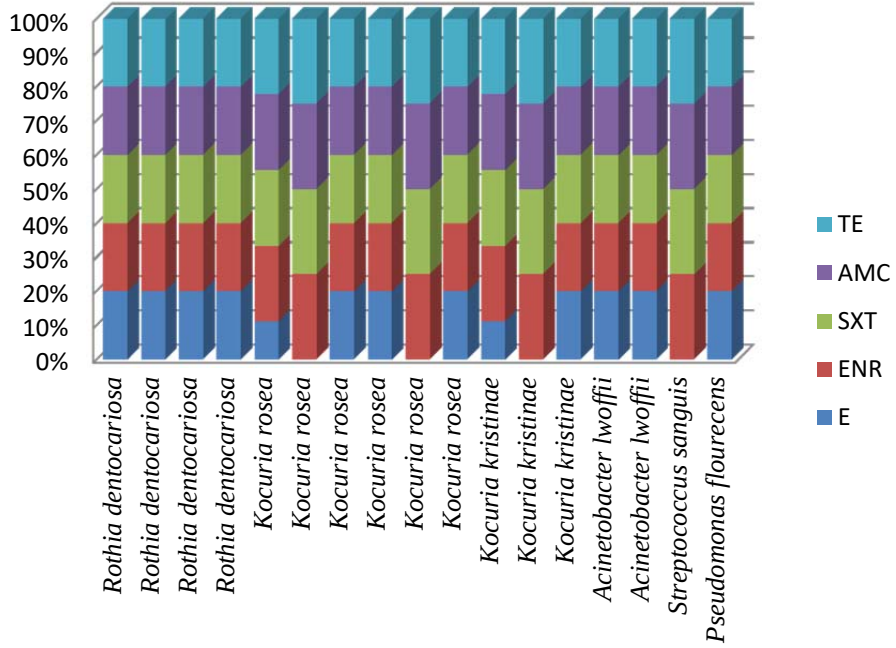
AMC (Amoksisillin/Clavulanik Asit): Dirençli (D)≤13; Orta Hassas (OH) 14-17; Hassas (H) 20≥

TE (Tetrasiklin): Dirençli (D) ≤14; Orta Hassas (OH)15-18; Hassas (H) 19≥

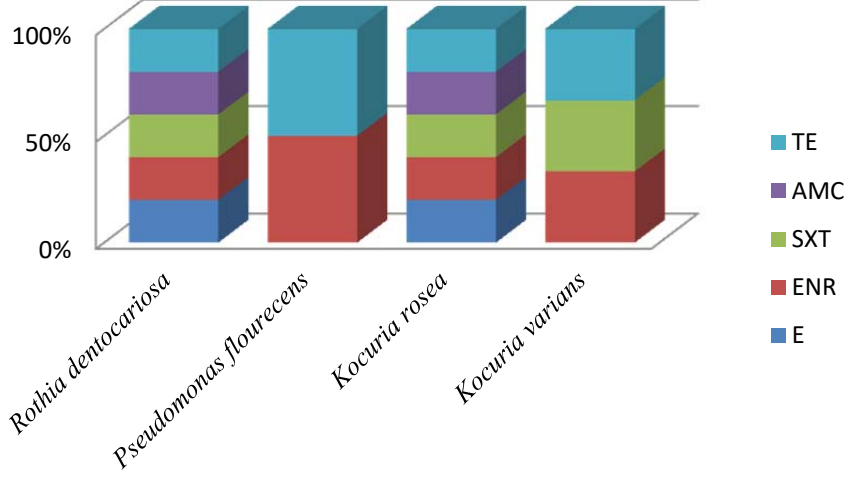
*Sonuçlar; CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) 2016'ya göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.36. Müller-Hinton agar'da antibiyogram ölçümleri (orjinal)



Şekil 4.37. Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerin antibiyotik duyarlılıkları



Şekil 4.38. Yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerin antibiyotik duyarlılıkları

4.2. Tartışma

Kuzeydoğu Akdeniz’de farklı iki habitatta yer alan çipuraların mikrobiyotasında yer alan potansiyel probiyotik suşlar, moleküler olarak tanımlanmış ve balıklarda probiyotik olarak kullanılabilirliği, *in vitro* kriterlerle sınıflandırılmış ve değerlendirilmiştir.

4.2.1. Araştırma Alanlarındaki Su Analizleri

Su canlılarının mikrobiyal topluluklarının gelişimi; tuzluluk, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu, yem miktarı ve kalitesi ile yakından ilgilidir (Hansen ve Olafsen, 1999; Nayak, 2010). Buna örnek olarak Meksika Körfezi’ndeki *Archosargus probatocephalus* (Sparidae)’da tespit edilen potansiyel patojenik *Vibrio* miktarının, su sıcaklığı ile orantılı olarak arttığı verilebilir (Paola ve ark., 1997).

Wassef ve Eisavy (1985) çalışmalarında, doğa ve yetiştiricilik koşullarında beslenen genç çipura bireylerinin, bahar mevsiminde bağırsak doluluk oranının

oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızla da özellikle doğadan elde edilen bireylerde bağırsağın doluluk oranının oldukça yüksek olması yönüyle benzerlik göstermiştir. Çevresel faktörlerdeki değişikliklerden geçici mikroflora daha kolay etkilenirken, kararlı yerleşik floranın, daha az etkilendiği görülmüştür (Kelly, 1982).

Floris ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, İtalya kıyılarında farklı 2 lagünden alınan su örneklerinin tuzluluğu ‰35-37, çözünmüş oksijeni 8,2-9,6 ve pH'yı 7,8-8,14 olarak ölçmüşlerdir. Bu veriler ışığında bizim örnekleme alanımıza ait pH (7,7-7,4), tuzluluk (‰ 36,7-38,5) ve çözünmüş oksijen (8,57-8,81) verileriyle lagünlerde yapılan yetiştiricilik faaliyeti açısından benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Sucul hayvanlar poikilotermiktir ve mikroflora ısı değişiklikleri ile değişebilir. Tuzluluk düzeyinin değişmesi de mikroflorayı etkileyebilir.

Dehler ve ark. (2017)'nin yaptıkları çalışmada, kafes işletmesinden elde ettikleri suyun fizikokimyasal değerleri (pH 7,6; sıcaklık 12°C ve çözünmüş oksijen; 9,0), çalışmamızdaki su ölçüm değerlerimizle paralellik gösterdiği görülmüştür. Çalışmamızda da, bahardan yaza geçişte verilen suyun fizikokimyasal değerleri açısından, çipura mikroflorasının mevsime bağlı arttığını gösteren çalışmalarla benzerdir (Sugita ve ark., 1989; Al-Harbi ve Uddin, 2004).

4.2.2. Balıkların Boy ve Ağırlıkları

Dehler ve ark. (2017)'nin yaptıkları çalışmada, Atlantik salmon (*Salmo salar*)'nunun (124,7±33 g) ağırlık ortalaması, çalışmamızda hem doğadan elde edilen çipuraların ağırlığı (113,87±26,96 g) hem de yetiştiricilikten elde edilen çipuraların ağırlığı (160,11±17,71 g) ile benzerlik göstermiştir.

Çalışmamızda, iki farklı bölgeden elde edilen çipura popülasyonunun ağırlık/boy ilişkilerinin karşılaştırılması önemli bir fark yaratmamıştır. Bu nedenle, balık popülasyonlarının beslenme ve büyüme faktörlerinin tutarlı olduğu düşünülmektedir. Çalışma balıklarındaki boy ağırlık ilişkisi doğa ve yetiştiricilikle

ilgili yapılmış diğer çalışmalarla benzerlik içinde olduğu tespit edilmiştir (Ferrari ve Chieregato, 1981; Wassef ve Eisawy, 1985; Cataldi ve ark., 1987).

4.2.3. Toplam Aerobik Bakteri Sayılarının Belirlenmesi

Balıkların larva aşamalarında, gastro intestinal yolları tamamen gelişmediği için sudan ve ağızdan beslenirler (Bell ve ark., 1971; Yoshimizu ve ark., 1980). Balık yumurtalarının etkileşim yüzeyinin bakteri kolonizasyonu için bir habitat olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Hansen ve Olafsen, 1999). Romero ve Navarrete (2006) ise, kararlı mikroorganizmaların, ilk besleme aşamalarından sonra kurulduğunu ve ana bileşenlerinin yumurtadan çıkma sırasında çevreden elde edildiğini göstermiştir. Deniz balıkları geniş bir beslenme skalasına sahiptir ve mikrofloraları doğal diyet ve evrimsel gelişme ile ilişkilendirilir. Bağırsak mikrobiyal kompozisyonunun beslenme ile ilişkisine dair ilk araştırmalar, Liston(1956) yassı balıklarında ve Yoshimizu ve Kimura (1976) salmonidlerde yapılmıştır.

Genel olarak, insanlar ve karasal hayvanlar bağırsak bakteri sayıları yaklaşık 10^{11} kob g^{-1} iken, balık bağırsağında tahmin edilen tipik bakteri sayıları (10^4 - 10^8 kob g^{-1}) yüksek organizasyonlu sıcak kanlı hayvanlardan daha düşüktür (Kim ve ark., 2007; Skrodenyte-Arba Cİauskiene, 2007; Nayak, 2010).

Yoshimizu ve ark. (1980)'nın, çiftlik salmonid yumurtalarında yaptıkları çalışmada, kültüre edilebilir kolonize bakteri sayısının, ilkbahardan yaza geçişte (10^3 - 10^6 g^{-1}) daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamız, bahar mevsiminde yapılması ve yetiştiricilikten elde ettiğimiz veriler ($0,67 \times 10^3$ - $2,44 \times 10^7$ kob/mL) açısından Yoshimizu ve ark. (1980)'nın verileriyle uyumludur. Floranın mevsimsel değişimine örnek gösterilebilecek diğer bir çalışmada, Al-Harbi ve Uddin (2004)'nin yaptığı hibrid tilapialarda (*O. niloticus* x *Oreochromis aureus*) bağırsak toplam bakteriyel yükü (bahar ve yaz arasında) $1,6 \times 10^6$ - $5,1 \times 10^7$ kob/g olarak tespit etmişlerdir. Yetiştiricilikten elde ettiğimiz balıkların bağırsak yüküyle uyumluluk göstermiştir.

Sakata ve ark. (1978) sarı kuyruğun (*Seriola* sp.) sindirim sistemindeki aerobik kültüre edilebilir koloni sayısının, pilorik sekada 2×10^4 g⁻¹, mide de $2,5 \times 10^5$ g⁻¹ ve bağırsakta $6,5 \times 10^4$ - $5,9 \times 10^6$ g⁻¹'ye yükseldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda yetiştiricilikten elde edilen çipuraların bağırsak bakteri yükü ile benzerlik taşımaktadır. Fakat doğadan elde ettiğimiz bireylerin bağırsak bakteriyel yükünün fazla olması ($1,98 \times 10^5$ - $3,11 \times 10^9$ kob/mL), doğanın floraya olan katkısını ortaya çıkarır niteliktedir.

Reuter (2001), canlı yemlerin (rotifer ve artemia) bakteriyel yükünü $2,1 \times 10^7$ kob/mL tespit ettikleri çalışmalarında, doğadan elde ettiğimiz (canlı yemle beslenen) çipura bağırsağının bakteriyel yükü ($1,98 \times 10^5$ - $3,11 \times 10^9$ kob/mL) ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bağırsak mikrobik yükündeki önemli farklılıkların, besleme yoğunluğunun ve gıda bileşiminin balık bağırsaklarındaki mikroorganizmaların tür çeşitliliği ve bolluğu üzerindeki etkisini ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca larval ve juvenil aşamadaki balıkların bağırsak florası, yetiştirme suyunun ve diyetlerin mikroflorası ile ilişkili olarak değişim göstermektedir (Strom ve Ringo, 1993; Bergh ve ark., 1994; Ringo ve ark., 1996; Ringo ve Vadstein, 1998; Spanggaard ve ark., 2000; Eddy ve Jones, 2002).

4.2.4. Kullanılan Besiyerlerine Göre Bakterilerin Dağılımı ve İzolatların Biyokimyasal Özellikleri

Schulze ve ark. (2006) farklı denizel türler (algal, kabuklular ve kemikli balıklar) üzerine yaptıkları çalışmada, Modified SeaWater Complex (SWC), Sea Water Agar, Cytophaga medium (CYT), Tryptic Soy Broth (TSB), Oppen Heimer Zobell indirgenmiş Agar (OZR), Brain Heart Infusion agar kullanmışlardır. Kuluçka tesisinde yetiştirilen deniz balıklarından 30 izolat elde etmişler ve bunların %13'ünü Gram pozitif bakteriler olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda, genel mikrobiyolojik kültür ortamı besi yerleri (kanlı, Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD) ve ManRagosaShape(MRS) agarda)'nin kullanımı açısından Schulze ve

ark.'nın çalışmasıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Yetiştiricilik balıklarından izole edilen aerobik bakterilerin %23'ü Gram-pozitif olarak bulunmuş olup, çalışmamızda kullanılan besiyerlerinin ve izolasyonun etkin bir şekilde yapıldığını ortaya koymuştur.

Carrascosa ve ark. (2016) çipuraların buz içerisinde kalış süresine bakarak mikrobiyolojik yük üzerine yaptıkları çalışmada, bakteriyel izolatlarını belirlemek için, Plate Count Agar (PCA), VRBD agarı, çalışmamızla benzer şekilde kullanmışlardır. Kültüre edilebilen heteroerofilik türlerin arandığı mikrobiyoloji çalışmalarında, sıklıkla çalışmamızda da yararlandığımız, en fazla koloni izole edilebilen genel besi yerleri tercih edilmiştir.

Floris (2011) çipura bağırsağından aerobik kültüre edilebilir bakteri sayıları, Nutrient ve VRBD, MRS agar kullanarak toplamda 111 bakteri kolonisi tespit etmiştir. Doğadan ve yetiştiricilikten elde ettiğimiz çipuraların bakteriyel izolasyonları için benzer besiyerleri kullanılmış olup, araştırmacının elde ettiği bakteri izolat sayısı (124 adet)'sına yakın olduğu görülmüştür.

Floris ve ark. (2013) Tortoli ve Portoli lagünlerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında, probiyotiklerin sayısı ile ilgili olarak, Tortoli lagününden aldıkları çipuraların MRS agar üzerinde 6 koloni izole etmişlerdir. Portoli lagününden alınan çipuraların bağırsak numunelerinden, MRS agarda herhangi bir koloni gözlenmemiştir. Sonuçlarımız, Kim ve ark., (2007)'nin yaptığı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin bağırsak florasının MRSA'da çoğalmadığını bildirdikleri çalışmalarıyla benzerdir. Yaptığımız çalışmada MRS agarda üreme (toplam 16 adet izolat) gerçekleşmiş, fakat izole edilen türler, tür tanımlamasının yapılma aşamasında canlılığını koruyamamıştır. İzolasyonda anaerobik kültür izolasyonu açısından, diğer çalışmalarla benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Ringo ve ark. (2001); Atlantik somonu (*Salmo salar* L.), arktik salmon (*Salvelinus alpinus* L.), Atlantik morina (*Gadus morhua* L.) ve kurtbalığının (*Anarhichas lupus* L.) sindirim kanalından *Carnobacteria*'ya ait 11 bakteri suşu Gram-pozitif çubuklar, sporsuz, katalaz ve oksidaz-negatif olarak izole etmişlerdir.

Çalışmamızda doğadan elde edilen balıklarda kanlı agardan izole edilen Gram-negatif 56 izolat, Gram-pozitif 8 izolat tespit edilmiştir. Bunlar içerisinde 63 adeti katalaz pozitif ve 51 adet oksidaz pozitif olarak bulunmuştur. Yetiştiricilik balıklarından izole edilen aerobik bakterilerin 13 izolat Gram-negatif, 4 adeti Gram-pozitif olarak bulunmuştur. Bu bakterilerin 15 izolat katalaz pozitif ve 14 izolat oksidaz pozitif sonuç verdiği kaydedilmiştir. Çalışma sonuçlarımız ile Ringo ve arkadaşlarının çalışması benzerlik göstermesede, izolatlara ait biyokimyasal verilerin ortaya çıkarılması, flora elemanlarının tür tanımlamasında temel bir basamak yaratması açısından uyumlu bulunmuştur.

4.2.5. İzolatların Hidrofobisite Özelliklerinin Belirlenmesi

Balık yüzeylerinin kolonistleri, antibakteriyel bileşenlere ve mukozanın yıkama aktivitesine karşı dirençli olmalıdır. Bağırsak epiteline tutunamayan bakteriler vücuttan dışkıyla atıldıkları için bağırsak üzerinde herhangi bir yararlı etki de oluşturamaz. potansiyel probiyotiklerin,bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyeti (kolonizasyon) ve kuvvetli hidrofobik karakter göstermesi, öne çıkmasında birincil faktörü oluşturmaktadır (Rastall ve ark.,2005; Koçak ve ark., 2016).

Hidrofobisite için kullanılan, kongo kırmızı boya agar testi ilk olarak Surgalla ve Beasley (1969) tarafından, virulent ve avirulent *Pasteurella pestisi* (şimdi *Yersinia*)'nin karakterinin farklılaştırılması için kullanılmıştır. Virulent ve avirulent karakter ayrımı, çalışmamızla probiyotik karaktere sahip olabileceğini düşündüğümüz bireylerin ayrılması açısından benzerlik göstermiştir. Pozitif hidrofobisite sonuçları bakterilerin bağırsak epitelyum hücrelerine tutunabildiğini ve potansiyel probiyotik olabileceğini göstermektedir (Douglas ve Sanders, 2008).

Sharma ve ark. (2006), 97 *Escherichia coli* izolatının, 46 (%47,42)'sı hidrofobiste testi pozitif reaksiyon verirken, 51 izolatın (%52,57) ise 72 saat sonra dahi boyayı bağlamadığı ve daha sonra negatif olarak ilan edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda doğadan beslenen balıklardaki aerobik 95 izolatın

17'si hidrofobisite testi pozitif reaksiyon vermiştir. Yetiştiricilikten elde edilen balık bağırsaklarındaki aerobik 29 izolatın 4 adeti hidrofobisite testi pozitif reaksiyon vermiştir. Testi negatif olan izolatların, Sharma ve arkadaşlarının yaptığı testle benzer olarak, 72 saat sonra boyanın bakteriler üzerinde bağlanmadığı görülmüştür. Bu testin, avirü lent *E. coli*'yi potansiyel olarak virulent *E. coli*'den ayırmak için birincil tarama testi olarak kullanılabileceği, yanlış negatif göstermeden %100'lük bir özgünlük sağladığı kanıtlanmıştır.

Potansiyel probiyotik belirlemede bağırsak mukozasına yapışma eğiliminde olduğu görülen hidrofobisite pozitif sonuçlarımız, Didinen ve ark. (2017)'nin alabalıklarda laktik asit bakterileri (LAB) (*L. lactis subsp. lactis* M17 2-2, *L. lactis subsp. cremoris* ve *L. garvieae* suşları, *L. sakei* 2-3 ve *P. acidilactici* 3-5) üzerine yaptıkları çalışmalarında, kongo kırmızı agar test sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca Balcazar ve ark. (2007; 2008)'nin gökkuşağı alabalığı bağırsaklarından izole edilen LAB (*L. sakei*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. fermentum* ve *L. mesenteroid*)'ların hidrofobisite çalışmalarıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Potansiyel probiyotik bakterilerin hidrofobisite testi, genellikle alabalıklarda ve LAB'lar üzerindeki çalışmalarda kullanılmıştır. Fakat, çalışmamız çipuralarda ve aerobik bakteriyel flora üzerinde yapılmış ilk çalışma olması nedeniyle önemli bir yere sahiptir. Ayrıca, çalışmamızda hidrofobik yüzeye sahip olan bakterilerin, fagositoza direnç geliştirme ve bağırsak epiteli üzerinde patojen geçişine karşı bariyer oluşturma, özelliğine sahip oldukları düşünülmektedir (Balcazar ve ark., 2007; 2008).

4.2.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Tür Tanımlamaları

4.2.6.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Tür ve Familya Düzeyinde Sınıflandırılması

Özşavlı ve ark. (2018), içme suyundan koliform bakteriyel izolasyon sonrası Vitek II sistemi kullanarak *Klebsiella pneumoniae* spp., *Enterobacter aerogenes* ve *Citrobacter freundii* olarak tanımlama işlemi yapmışlardır. Vitek II test sisteminin

kullanımı açısından çalışmamızla benzerlik göstermiş olup, hastane laboratuvarlarında da fenotipik tanımlama test sistemi sıklıkla kullanılmaktadır.

Önceki çalışmalarda (Onarheim ve ark., 1994; Verner-Jeffreys ve ark., 2003; Gomez ve Balcazar, 2008; Nayak, 2010) tespit edilen deniz balıklarındaki mikrobiyotanın baskın üyeleri *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Alteromonas*, *Flavobacterium* ve *Micrococcus* olarak tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarımız, toplam aerobik flora tespitine yönelik yapılmış bir çalışma olmaması nedeniyle önceki çalışmalarda tür adlarından ayrılır niteliktedir. Fakat potansiyel probiyotik tür tanımlama sonuçlarına göre, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* cinslerinin ve Micrococaceae familyasına dahil olan *Kocuria*'nın, genel florayı yansıttığı düşünülmektedir. Özellikle *Acinetobacter* ve Micrococaceae familyasına ait türlerin, çipurada potansiyel probiyotik olarak tespit edilmesi itibariyle ilk yapılmış çalışmadır.

Floris (2011)'in çipuranın bağırsak mikroflorasındaki, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Flavobacteriaceae tespiti, araştırma bulgularımızdan Pseudomonadaceae familyasında olan *Pseudomonas flourecens*'in tespitiyle uyum içinde olduğu ve ayrıca ortaya çıkarılan Micrococaceae, Actinomycetaceae, Moraxellaceae, Streptococcaceae familya üyelerinin tespit edilmiş olması çalışmamızı diğer çalışmalardan ayrı kılmaktadır.

Yapay diyetler, stres ve antibiyotikler balık sindirim sisteminde mikroflorada değişikliklere neden olabilir (Navarrete ve ark., 2008; Clements ve ark., 2014). Silva ve ark. (2011) çipura midesinde Firmicutes, Proteobacteria ve Bacteroidetes'in dahil olduğu, baskın filumun değiştiğini bildirmişlerdir. Dhanasiri ve ark. (2011), yetiştiriciliğe alındıktan sonra yabani Atlantik morina'nın bağırsak mikrobiyotasında değişiklik meydana geldiğini bildirmişlerdir. Doğadan elde ettiğimiz potansiyel probiyotiklerin, yetiştiricilikten elde edilenlere nazaran, cins ve tür sayısı farklılığı açısından oldukça yüksektir. Çalışmamızda yetiştiricilik koşullarının, mikroflora üzerinde yarattığı baskının, yapılmış diğer çalışmalarla benzer olduğunu göstermiştir.

4.2.6.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Genotipik Tür Tanımlamaları

Alonso ve ark. (2018), İspanya'nın Gijon lagününden elde edilmiş 13 adet deniz balığı bağırsağından izole edilen 45 adet Gram-pozitif suştan 9'unu 16S rRNA gen dizilimi ile Laktik asit bakteri (LAB) olarak tanımlamışlardır. Moleküler olarak tür tanımlaması 16S rRNA üzerinde çalışılması yönüyle çalışmamızla benzerlik göstermektedir. 16S rRNA üzerindeki toplam genom içerisinde yer alan, türe özgü korunmuş bölgeler sentezlenerek, tür adının moleküler olarak kanıtlandığı görülmüştür.

Rungrassamee ve ark. (2014) doğadan ve çiftlikten alınan *Penaus monodon* anaçlarında, bağırsak bakteri topluluklarını kültüre almaksızın, 16S rRNA genlerinin V 3-4 bölgelerini bir barkod pyrosekanz analizi kullanarak 5 sınıfta toplamışlardır. Çalışmamız, kültüre edilebilir türler üzerinde gerçekleştirilmiş olması ve sınıf değil de tür tanımlaması açısından bu çalışmadan ayrılmıştır. Potansiyel probiyotiklerin tür tanımlamasına yönelik gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, ileride bu türlerin yetiştiricilik çalışmalarında yem takviyesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Ringo ve Holzapfel (2000), Atlantik salmonu (*Salmo salar* L.)'nin solungaçlarında meydana gelen aerobik bakteri popülasyonundan 16S rDNA dizi analizi ve AFLpTM parmak izi esasına göre tür tanımlaması yapmışlardır. Kesilen DNA parçaları üzerinden PZR yapılan bu yöntemle, çalışmamızda uygulanan yöntem ve sonuçların birbirlerinden ayrı düştüğü gözlenmiştir. Çünkü çalışmamızda, prokaryotik geni ifade edebilmek için houskeeping gen görünümü sağlanmasında, 16S rRNA üzerinde, 200 ile 500 arasında ki baz çiftlerinde net görüntüleme yapılmıştır.

4.2.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karakterizasyonu**4.2.7.1. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Sıcaklık Toleranslarının Belirlenmesi**

İbrahim ve ark. (2004) gökkuşağı alabalığından izole ettikleri 5 farklı laktik asit bakterisinin (psikrofil floraya sahip olduğu düşünülürse), 21 ile 25 °C’de mukozaya daha iyi yapıştığını tespit ettikleri çalışmalarından elde ettikleri sonuçlar ile, çalışma sonuçlarımızın birbirlerini destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Ayrıca çalışmamızda mezofil potansiyel probiyotik bakterilerin, optimum sıcaklığın üzerindeki üreme gücüne sahip olması, aktivitede, dayanıklılıkta ve gelişme hızında ayırt edici özellik kazandırmaktadır.

Gilliand (1984), yüksek organizasyonlu canlılardaki laktik asit bakteri türlerinin 45-48°C’de canlılığını koruduğu çalışmasından elde ettiği bulgular, sıcaklık bulgularımızı destekler nitelikte bulunmuştur. Sıcaklığa dayanıklı olan türlerin, yem yapım rasyonlarında ısıdan etkilenmeyerek canlılıklarını koruyabilecekleri düşünülmektedir.

Bağırsakta probiyotiğin kalışını değerlendiren farklı bilim adamları, Munro ve ark. (1995), *Aeromonas*’ı kalkan (*S. maximus*) larvalarına verdiğinde 15-20 °C’de 14 gün canlı kalabildiğini; Ringo ve ark. (1996), kalkan larvalarına uyguladığı *Vibrio pelagius*’un 17-20 °C’de 14 gün canlı kalabildiğini bildirmişler. Uygulanan probiyotiklerin sıcaklığa bağlı olarak canlılığını koruma yeteneklerinin, balıkların bulunduğu suyun sıcaklığıyla paralel olarak değiştiği ve potansiyel probiyotik bakterilerimizin inkübasyon sıcaklığının optimum 25°C olması itibarıyla, yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir. Deneylerimiz sonunda, 25-45°C arasında üreme yeteneği sergileyen tüm potansiyel probiyotiklerimizin, farklı sıcaklık aralığında canlılıklarını koruyabilme yetenekleri, yerleşik floranın kurulmasında önemli role sahip olmalarını sağlar.

Sharifuzzaman ve ark. (2018)’nın gökkuşağı alabalıklarında *Kocuria* türünün 4; 15; 26; 37 ve 45 °C’de inkübe edildiğinde canlılığını koruduğu yönünde elde ettikleri sonuçlar, çalışmamızda tespit ettiğimiz *Kocuria* türlerinin sıcaklık

verileriyle uyumlu bulunmuştur. Ancak çalışmamızda izolasyonun yapıldığı çipuranın su sıcaklık toleranslarının farklı olması ve mezofil bakteri florası sebebiyle, *Kocuria* türlerinin düşük sıcaklıklarda üreyemediği görülmüştür.

4.2.7.2. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Asite Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Balcazar ve ark. (2008)'nın gökkuşağı alabalığından izole ettikleri 3 farklı laktik asit bakterisini, pH 1 ile 6,5 arasındaki asit değerleriyle inkübe ettiklerinde, probiyotiklerin pH 2,5-6,5 arasında geliştiklerini tespit etmişlerdir. Benzer bir çalışma Didinen ve ark. (2017) tarafından, *L. garvieae* suşlarının pH 2,5'ta yaşamını sürdürebildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarıyla benzer olarak tespit ettiğimiz potansiyel probiyotiklerden, *Rothia dentocariosa*, *Pseudomonas flourecens* ve *Kocuria rosea* ve *Acinetobacter lwoffii*'nin pH 3'te canlılığını koruduğu ve hatta bu türlere ait bazı suşların pH 1'i tolere edebildiği görülmüştür. Gerek çipurada yapılan flora tespitinde, gerekse probiyotik çalışmalarında pH 1 asitlik değerinde üreme yetenekleri tespit edilmemiştir. Bu açıdan çalışmamız yapılmış diğer çalışmalardan ayrılır niteliktedir. Mikroorganizmaların fizyolojik durumunun anlaşılması için suş faktörünün ele alınması gereklidir. Bu nedenle potansiyel probiyotik seçiminde, bulundukları ortam pH'sının düşmesiylemetabolik aktivitelerini arttırarak, diğer mikroorganizmaların fizyolojik durumunun düşmesini fırsata dönüştürebilen ve asit toleransı yüksek türler tercih edilmelidir.

Sharifuzzaman ve ark. (2018), izole ettikleri *Kocuria*'nın pH 2-7 arasında üreyebildiğini, bulgularımızla *Kocuria* türleri açısından paralellik olduğu ve ayrıca doğadan elde ettiğimiz çipuralardan izole ettiğimiz *Kocuria rosea*'nın pH 1'de canlılığını sürdürebildiği görülmüştür. Probiyotiklerin aktiviteleri, imalat işlemlerindeki fiziksel ve kimyasal koşullar nedeniyle kaybedecekleri varsayıldığında, bir probiyotiğin pH toleransının geniş aralıklarda olması işlemler sırasında bakterilerin enzim aktivitesinin korunacağını işaret eder.

Yufera ve ark. (2004) çipuranın sindirim sistemi boyunca, besinlerin pH'nın 2 ile 7 arasındaki asitlik değerlerine maruz kaldığını bildirmişlerdir. Denemelerimizde, uyguladığımız asitlik değerleri (pH 1; 3; 7)'nin, çipuranın sindirim sistemi asitlik değerleri ile benzer olması sağlanmıştır. Ayrıca mide asit değerinin daha da düştüğü stres koşulları hesaba katılarak, pH 1 uç değer olarak denenmiştir. Bu nedenle pH 1 asitliğe dayanma gücü sergileyen *Acinetobacter lwoffii* suşlarının sindirim sisteminden geçişleri esnasında hayatta kalma oranlarının oldukça yüksek olacağı düşünülmektedir.

Sansawat ve Thirabunyanon (2009), tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak boşluklarından izole edilen *Bacillus subtilis* P 33 ve 72 suşlarının, pH 2,5'da 3 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Uygulama yöntemi olarak, çalışmamızda denediğimiz potansiyel probiyotiklerin 1,5 saat inkübasyona alınması açısından paralellik söz konusudur. Balıkların sindirim sisteminden, alınan besinler ve bakterilerin, mideden (min. pH 2) geçiş süresinin 1 saat olduğu bilgisi (Yufera ve ark., 2004), bize inkübasyon için, 1,5 saatlik asite maruziyetin yeterli olacağını düşündürmüştür. Sonuçta bağırsakta faaliyet gösteren probiyotik bakterilerin, midenin asidik ortamından geçerken hayatta kalması gerekmektedir.

4.2.7.3. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Safra Tuzlarına Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Salmonidae (Balcazar ve ark., 2008) ve Percoidea (Rengpipat ve ark., 2008)'lerin bağırsaktaki fizyolojik safra konsantrasyonunun %0,3-1,5 arasında hesaplandığı bildirilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda potansiyel probiyotik bakterilerin %0,6, 1 ve 1,5 safra konsantrasyonlarına toleransları araştırılmıştır. Perez-Sanchez ve ark. (2011) çalışmalarında %0,2; 1 safra konsantrasyonlarını kullanmışlar ve *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroid*'lerin %10 safra toleransının olduğunu bildirmişlerdir. Buntin ve ark. (2008) deniz balıklarından izole ettikleri laktik asit bakterileri üzerinde 2000, 3000, 4000ppm safra

oranlarının, probiyotik bakterilerin sayısının %50 oranında düşürdüğünü ve safra tuzunun deterjan etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Diğer araştırmacıların verileriyle uyumlu olan çalışmamızda sadece yetiştiricilikten elde ettiğimiz *Kocuria varians*'ta safraya karşı direnç tespit edilememiştir. Yüksek oranda (%1,5) bile elde ettiğimiz safraya direnç, daha önce çalışılmamış potansiyel probiyotiklerimizin probiyotik karakterinin ne denli güçlü olduğunun göstergesi olmuştur. Çipura bağırsağında yer alan potansiyel probiyotik bakterilerin safra toleransı, onlara mideden bağırsağa geçişte hayatta kalma konusunda daha yüksek bir yetenek ve hidrofobik özelliğe sahip suşların asit ve safraya dirençli olmaları sayesinde, bağırsak yüzeyinde rahatlıkla kolonize olmalarını sağlar (Nikoskelainen ve ark. 2001). Bu nedenle, probiyotikler ve safra asitleri yüksek kolesterolün önlenmesi, yağların sindiriminde, yağın emülsiyon haline gelmesinde modern bir stratejidir (Yüngül ve Özdemir, 2017; Pavlovic ve ark, 2012).

Begley ve ark. (2005), genellikle Gram-pozitif probiyotik bakterilerin, Gram-negatif bakterilere göre safra tuzlarına karşı daha savunmasız olduğunu ve safra toleransının, suşa özgü bir nitelik olduğunu ifade etmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda elde edilen Gram-pozitif suşlardan *Rothia dentocariosa*'nın 4 suşundan 2'sinin tüm safra oranlarına dirençli iken, diğer 2 suşunun hayatta kalamadığı bildirilmiştir. Gram-negatiflerden *Acinetobacter lwoffii*'nin 2 suşu ve her iki habitattan izole edilen *Pseudomonas flourecens* suşları tüm safra oranlarında kuvvetli üreme sergilemiştir. Bu suşların probiyotik karakterlerinin ayrıntılı bir şekilde tespit edilmemiş olması, çalışmamızı önceki çalışmalardan ayırır niteliktedir. Elde ettiğimiz potansiyel probiyotikler, safranin lipid aktivitesine karşı dayanıklılık göstererek, hücre formlarını koruduğu ve böylece yerleşik florayı oluşturdıkları varsayılmaktadır.

Çevresel faktörler bakterilerin safra tuzlarına karşı daha savunmasız kalmasına neden olabilir veya hayatta kalma oranlarını artırabilir (Begley ve ark., 2005). Bu durum benzer olarak, iki farklı habitattan elde ettiğimiz izolatlardan *Rothia dentocariosa*, *Kocuria rosea*'nın bazı suşlarında tüm oranlarda safraya karşı

direnç geliştirdiği, ayrıca *Pseudomonas flourecens*'in safraya (%0,6; 1; 1,5) karşı güçlü üreme yeteneği göstererek canlı kalmayı başardığını göstermektedir. Doğadan elde ettiğimiz türlerde yüksek oranda (%1,5) safra direncinin görülmesi, yüksek yağlı yiyecekler alındıktan sonra bağırsak safra içeriğini de önemli ölçüde arttırmıştır. Probiyotiklerin sürekli düşük seviyede safra tuzlarına maruz kalması, yüksek safra konsantrasyonlarını tolere etme yeteneklerini artırabilir (Begley ve ark., 2005). Ancak, probiyotiklerin safra tuzlarını nasıl tolere ettiğinin moleküler mekanizması henüz tam olarak netlik kazanmamıştır.

4.2.7.4. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Pepsine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Balık midesinde asit konsantrasyonu pH 2-4 arasında değişir, daha sonra koşullar pilorik sekanın hemen altında alkalın (pH 7-9) olur, üst bağırsakta azami 8,6'ya yükselir ve nihayetinde arka bağırsakta nötraliteye yaklaşır (Muthukumar ve Kandeepan, 2015).

Grimoud ve ark. (2010), *Lactobacillus* suşlarının simüle gastrik koşullar altında bağırsak ortamına kıyasla daha yüksek sağkalım oranlarına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tokatlı ve ark. (2015), *Lactobacillus plantarum* ve *L. brevis* suşları (*L. brevis* MF343 hariç), pH 2,5+pepsin uygulamasından sonra yüksek hayatta kalma oranı sergilemişlerdir. Çalışmamızda, potansiyel probiyotiklerden hem doğadan hemde yetiştiricilikten elde edilen *Rothia dentocariosa*'nın tüm suşları ve *Kocuria kristinae*'nin 1 suşu pH 1,5+pepsin ortamında varlığını sürdürmemiştir. Laktik suşlarda görülen bu farklılıklara benzer olarak çalışmamızda da hem yetiştiricilikte hem de doğadan elde ettiğimiz türlerin suşlarında farklı yanıtlar görülmüştür. Bu potansiyel probiyotiklerin suş bazında da ele alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Probiyotikler, oral olarak uygulandığında midenin aşırı düşük pH bariyeri ve pepsin antimikrobiyal etkisine bağlı olarak, büyük fizyolojik zorlukların üstesinden gelmesi gerektiği anlamına gelir (Smith, 1980).

Zhang ve ark. (2013) Japon siyah nokta çipurasında 0; 2; 4; 6; 8; 10 g/L denedikleri *Leuconostoc lactis* türünün, pepsine karşı canlılığını sürdürebildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularımızın, tüm potansiyel probiyotikler (*Pseudomonas flourecens* hariç)'in pepsine (3mg/ml) karşı canlılığın korunması açısından uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Balıkların midesindeki pepsin aktivitesi, memelilere göre daha yüksek ve spesifik aktiviteye sahiptir. Aynı zamanda daha düşük asidik koşullarda optimal aktivite gösterirler (Gildberg ve Raa, 1983). Probiyotik bakterilerin pepsin ve düşük pH'ya maruz bırakıldıktan sonra yapışma özelliğinin de önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Sharifuzzaman ve ark., 2011). Bu da bize, elde ettiğimiz potansiyel probiyotiklerin mideden geçişte pH ve pepsine rağmen, potansiyel probiyotik karakter olma açısından ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

4.2.7.5. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Siderofor Üretim Yeteneğinin Belirlenmesi

Alexander ve Zuberer (1991) topraktan izole ettikleri *Pseudomonas* ve *Erdwinia* türlerinden CAS agar kullanarak *Pseudomonas flourecens*'in siderofor oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Doğa ve yetiştiricilik çipuralarından izole ettiğimiz *Pseudomonas flourens*'in siderofor oluşturma yeteneğinin, Alexander ve Zuberer (1991)'in yaptıkları çalışmayla benzerlik gösterdiği görülmüştür. Konakçı ve bakteri arasındaki etkileşimde anahtar konu demirin bağlanmasıdır (Gatesoupe ve ark., 1997). Bu bakımdan, bakteriyel sideroforlar, demirin elde edilmesi için yüksek afiniteyle Fe (III) şelatlayarak demirin bağlanmasını sağlamaktadır (Fgaier ve Eber, 2011). Sınırlı demir şartlarında gelişen *Pseudomonas fluorescens*'in kültür supernatantının, *Vibrio anguillarum*'un gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu da bize tespit ettiğimiz siderofor pozitif potansiyel probiyotiklerin, ortamdaki demirden yarar sağlayarak, potansiyel patojene karşı üstünlük sağladığını göstermektedir.

Gatesoupe (1994) siderofor pozitif laktik asit bakterilerinin, rotiferlere eklenmesinin kalkan larvalarının patojenik *Vibrio* spp ile enfeksiyona karşı direncini arttırdığını kaydetmişlerdir. Siderofor üreten bir bakterinin eklenmesi kalkan larvalarına *Vibrio*'ya karşı ek bir koruma sağlamıştır. Smith (1980)'e göre, probiyotikler tarafından salgılanan antibiyotikler veya sideroforlar gibi antimikrobiyal maddeler, patojenlere karşı yapışma önleyici aktiviteye sahiptir.

Sharifuzzaman ve ark. (2018) *Kocuria* SM1suşunu siderofor negatif bulmuşlardır. Bu çalışmada, doğadan ve yetiştiricilikten izole ettiğimiz *Kocuria rosea* ve *K. kristinae* suşları siderofor negatif olmaları açısından Sharifuzzaman ve ark.'nın çalışma sonuçları ile benzerlik içinde olduğu tespit edilmiştir. Yalnız, Goswami ve ark. (2014) *K. tufanensis* 2M4 suşunun probiyotik özelliği olmamasına rağmen, siderofor pozitif olması nedeniyle, çalışmamız yetiştiricilik çipuralarından izole edilen *K. varians* suşunun siderofor pozitif olmasıyla benzerlik göstermiştir. Çipurada ilk defa genotipik tanımlamasını yaptığımız *Kocuria* türlerinin, siderofor yeteneklerinin türlerin suşa bağlı karakter farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Probiyotikler kazandıkları siderofor üretim yeteneği ile sınırlı demir şartları altında patojen bakterilerle rekabete girerek, onları demirden mahrum bırakmaktadırlar.

4.2.7.6. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin *Vibrio fluvialis*'e Karşı Gösterdiği Antagonistik Etki

Rengpipat ve ark.(2008) Asya levreğinden (*Lates calcarifer*) izole ettikleri 5 farklı laktik asit bakterilerinin, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fluvialis* üzerinde yaptıkları inhibisyon zon ölçümlerinin birbirine yakın olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, elde ettiğimiz suşların laktik asit ürettiği bilinen *Rothia dentocariosa*'ya ait tüm suşların *V. fluvialis*'e karşı antagonizma gösterdiği tespit edilmiştir. *V. fluvialis*, hemolisin ve enterotoksijenik özellikleri yönüyle denizden izole edilen diğer *Vibrio* türleriyle (*V. anguillarum*, *V. campbellii*, *V.*

cholerae, *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. natriegens*, *V. parahaemolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. vulnificus*) benzerlik göstermektedir (Amel ve ark., 2008).

Sharifuzzaman ve ark. (2018), alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)’tan izole ettikleri *Kocuria* SM1suşu, *V. anguillarum* ve *V. ordalii* büyümesini durdurarak antagonistik etki göstermiştir. Çalışmamız, *Kocuria rosea*’ya ait 5 suşun *V. fluvialis*’e antagonistik etki yaratması açısından benzerlik göstermiştir. Fakat *Kocuria*’nın izole ettiğimiz diğer türleri (*K. kristinae* ve *K. varians*) antagonistik etki gösterememiştir. Bu yüzden, *in vitro* antagonizmanın, fırsatçı patojenlerin varlığını azaltmak veya ortadan kaldırmak için uygun bir araç olduğu ve *in vivo* çalışmalara hazırlık açısından önemli bir adım oluşturduğu düşünülmektedir.

Gram ve ark. (1999) probiyotik *Pseudomonas flourecens* AH2 suşunun, *V. anguillarum*’a karşı antagonistik etkisinin olduğunu 7 gün sonra bile etkili antimikrobiyal ürünleri koruduğunu tespit etmişlerdir. Yaptığımız testler sonucunda, hem yetiştiricilik hem de doğadan elde ettiğimiz *Pseudomonas flourecens*’in ve diğer Gram-negatif bakterilerden *Acinetobacter lwoffii*’nin *Vibrio* ailesine dahil olan *V. fluvialis*’in gelişimini durdurması açısından uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca çipurada *V. fluvialis*’e karşı antagonizmanın ilk defa çalışılmış olması açısından diğer çalışmalardan farklı nitelikte olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek oranda antagonistik etki yaratan potansiyel probiyotik bakterilerin, gastrointestinal sisteme girdikten sonra antagonistik veya inhibitör bileşikler (hidrojen peroksit, organik asitler, bakteriyosin) üreterek sindirim sistemine hakim oldukları düşünülmektedir (Ringo ve Gatesoupe, 1998).

4.2.7.7. Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

Su ürünleri sektörünün dünya çapında göstermiş olduğu ilerlemeler, balık yetiştiriciliğinin de geliştiğini göstermektedir. Bu da bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek veya önlemek için geniş bir antibiyotik kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Balık yetiştiriciliğinde izin verilen antimikrobiyal ajanları

düzenleyen yönetmelikler ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Doğrudan temas yoluyla veya besin zinciri yoluyla su ortamından insanlara antibiyotik direncinin potansiyel transferi insan sağlığı için ciddi bir endişe kaynağıdır (Marshall ve Levy, 2011). Antibiyotik direncinin izlenmesi, su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antimikrobiyal sınıfları ve antibiyotiklerin etkinliği hakkında kapsamlı bilgi toplayamamaktadır (Cabello ve ark., 2013).

Probiyotikler arasında antimikrobiyal direnç özelliklerinin varlığı, gıda ve halk sağlığı güvenliği sorunları açısından sorunlu olabilir (Smith, 1980). Bu bağlamda, Vietnamda karides çiftliğinde kullanılan ticari probiyotiklerin bazılarının, ampisilin, kloramfenikol, klindamisin, eritromisin(E), oksasilin, penisilin ve sülfometoksazol/trimetoprim (SXT) gibi antimikrobiyal bileşiklere karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Uddin ve ark., 2015). Yapılmış olan Eritromisin ve Sülfometoksazol/trimetoprim (SXT) denemesiyle uyumlu olarak, özellikle de doğadan elde ettiğimiz çipura potansiyel probiyotiklerinden; *Kocuria rosea*'nın 2 suşunda, *K. kristinae*'nin 1 suşunda, *Streptococcus sanguis* suşunda yetiştiricilikten alınan çipura potansiyel probiyotiklerden; *Pseudomonas flourens* ve *K. varians* suşlarında eritromisine ve sülfometoksazol/trimetoprim'e karşı direnç tespit edilmiştir. Çalışmamızda görülen, tetrasiklin ve sülfanomid grubunda yer alan bu antibiyotiklere karşı gelişen bu direncin konjugasyon (plazmid aracılığıyla gen transferi) yoluyla gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu durum aynı türün üyeleri arasında veya farklı cins veya familyadan gelen bakteriler arasında ortaya çıkabilir.

Abdel-Aziz ve ark. (2013), İskenderiye körfezindeki çipuralardan ve levreklerden izole ettikleri *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* ve *Photobacterium damsela* izolatlarının amokisiline karşı direnç geliştirdiği, enrofloksasin, eritromisin, tetrasikline, Sülfometoksazol/trimetoprim karşı hassas olduğu, *P. damsela*'da sadece tetrasikline karşı direnç tespit etmişlerdir. Çalışmamızdaki Doğa ve yetiştiricilikten elde ettiğimiz çipura izolatlarında genel olarak eritromisine karşı direnç görülmesi açısından bu çalışmadaki bulgulardan

farklı olduğu tespit edilmiştir. İki çalışmada görülen bu farklılık, antibiyotiklerin örnekleme bölgelerinde önceki salgınları kontrol amaçlı tekrarlı olarak kullanılmış olabileceğini veya hayvansal, insan kaynaklı antibiyotik kalıntılarının kıyı sularına nüfuz etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Sharifuzzaman ve ark. (2018) alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)’tan izole ettikleri *Kocuria* suşunun tetrasikline (TE) karşı hassas olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda elde ettiğimiz tüm *Kocuria* türlerinin tetrasikline karşı hassas olduğu tespit edilmiştir. Tüm mikroflorada protein sentezi inhibisyonuna neden olan tetrasiklinlere karşı hassasiyet görülmesi, tüm florada direnç genlerinin var olmadığını düşündürmektedir.

Scarano ve ark. (2018) çipuradan izole ettikleri *Aeromonas*’ın, Amoksisiline (β -laktam antibiyotikler) karşı oluşan direnci daha çok doğadan elde ettikleri çipuralarda olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu görüşten farklı olarak, sadece yetiştiricilik çipuralarından izole edilen *Pseudomonas fluorescens*’in, kuluhanik asitle kuvvetlendirilmiş amoksisiline karşı direnç geliştirdiği görülmüştür. Bu durum bölgemizde amoksisilin direncinin çevre kaynaklı değil de, yetiştiricilikte besleme yoluyla aktarılmış olabileceğini düşündürmektedir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doğa ve yetiştiricilik ortamında yer alan çipuraların bağırsaklarından izole ettiğimiz potansiyel probiyotik bakterilerin, çeşitliliği ve özelliklerini ayrıntılı bir şekilde ortaya koyduğumuz çalışmada,

- Kuzeydoğu Akdeniz kıyısında çipuraların, kendi doğal ortamı (lagünde) ve yetiştiricilik kafeslerinde gerçekleştirdiğimiz çalışmada, aynı yıl içerisinde bahar mevsiminde örnekleme yapılmış ve iki habitatın su analiz değerlerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.
- Doğadan elde edilen çipuraların bağırsak toplam bakteri yükü 10^5 - 10^9 kob/mL iken yetiştiricilikten elde edilen çipuraların bağırsak toplam bakteri yükünün (10^3 - 10^7 kob/mL) oldukça yüksek olduğu görülmüştür.
- Doğadan alınan balıkların genel flora izolasyonundan toplam 95 adet izolat, yetiştiricilikten toplam 29 adet izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlara biyokimyasal testler uygulanıp, sınıflandırılmıştır,
- Doğadan elde edilen hidrofobik karakter gösteren izolat yüzdesi (%81), yetiştiricilikten elde edilen izolat yüzdesi (%19)'nden oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir,
- Belirlenen potansiyel probiyotik bakterilerde, fenotipik tür ve familya tanımlaması yapılmıştır. Buna göre *Rothia dentocariosa* (293bç) *Kocuria rosea* (285bç), *Kocuria kristinae* (480bç), *Acinetobacter lwoffii* (400bç), *Pseudomonas flourecens* (351bç), *Streptococcus sanguis* (238bç), *Kocuria varians* (220bç) suşları moleküler açıdan kanıtlayabilmek için 16S rDNA üzerinde genotipik olarak tür tanımlaması yapılmıştır,
- Doğa ve yetiştiricilikten izole edilen tüm potansiyel probiyotikler; 25°C, 37°C, 45°C sıcaklıklarda canlılığını koruyabilmiştir,

- Sadece doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden, *K. rosea*'nın 2 suşunun ve *A. lwoffii* suşları, tüm pH (1; 3; 7) değerlerinde canlılığını kuvvetli üreme göstererek sürdürebilmişlerdir. Doğa ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *R. dentocariosa*'nın 4 suşu, *K. rosea*'nın 5 suşu, *P. flourecens*'e ait 2 suş pH 3 ve 7'de kuvvetli üreme sergilemiştir. Tüm *K. kristinae* ve *S. sanguis* ve *K. varians* suşları sadece pH 7'de canlı kalabilmiştir,
- Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden; *R. dentocariosa*'nın 2 suşu, *K. rosea*'nın 1 suşu, *A. lwoffii*'nin 2 suşu, *S. sanguis* ve *P. flourecens* suşu; yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden *R. dentocariosa* ve *P. flourecens* suşları %0,6; 1; 1,5 safra oranlarında canlılığını korumuş ve kuvvetli üreme göstermişlerdir. Ancak doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerde *R. dentocariosa*'ya ait 2 suş ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden *K. varians* hiçbir safra oranında yaşamını sürdürememiştir,
- Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden *K. rosea*'nın 6 suşu, *K. kristinae*'nin 2 suşu, *A. lwoffii*'nin 2 suşu ve *S. sanguis* suşları ve yetiştiricilikten elde edilen potansiyel probiyotiklerden *K. rosea* ve *K. varians* suşları pepsinin pH 1,5 ve pH 3 asitlik değerlerinde canlılığını kalmıştır. Potansiyel probiyotiklerden sadece yetiştiricilikten izole edilen *P. flourecens* suşu pepsin+pH 3'te varlığını sürdürememiştir,
- Doğadan elde edilen potansiyel probiyotiklerden *R. dentocariosa*'nın 4 suşu, *A. lwoffii*'nin 2 suşu, *P. flourecens* suşları; yetiştiricilikten izole edilen potansiyel probiyotiklerden *P. flourecens* ve *K. varians* suşları siderofor oluşturma yeteneğine sahiptir,
- Doğadan izole edilen potansiyel probiyotiklerden *R. dentocariosa*'nın 4 suşu *K. rosea*'nın 3 suşu *A. lwoffii*'e ait 2 suş ve *P. flourecens* suşları *Vibrio fluvialis*'e karşı antagonizma geliştirmiştir. Yetiştiricilikten elde edilen

potansiyel probiyotiklerden *R. dentocariosa* ve *P. flourecens* suşları *V. fluvialis*'e karşı antagonizma göstermiştir,

- Doğadan elde ettiğimiz potansiyel probiyotiklerden *K. rosea*'nın 2 suşu ve *K. kristinae*'nin 1 suşu ve *S. sanguis* suşları sadece eritromisine karşı direnç göstermiştir. Yetiştiricilikten izole edilen potansiyel probiyotiklerden; *P. flourecens*'in eritromisine, sulfametoksazol/trimetoprim ve amoksisillin/klavulanik asite; *K. varians*'ın ise eritromisin ve amoksisillin/klavulanik asite karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir.

Bu verilere dayanarak, doğada yaşayan çipuraların deniz-lagün geçişi ve beslenme skalasının geniş olması nedeniyle, probiyotik florasının daha zengin olduğu görülmektedir.

Tanımlama ve probiyotik özelliklerin karakterizasyonu bize, potansiyel probiyotiklerden özellikle *Rothia dentocariosa*, *Acinetobacter lwoffii*, *Kocuria rosea* ve *Pseudomonas flourecens*'in etkin probiyotik karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Ancak *P. flourecens*'in patojenite özellikleri üzerinde ek testlerin yapılmasına ihtiyaç vardır.

Her durumda, bu çalışmada ortaya konan potansiyel probiyotikleri derinlemesine analiz edebilmek için; toplam bakteri genomu, plazmid DNA ve antijen proteinleri üzerinde daha fazla genetik çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Probiyotik uygulamaların en büyük eksikliği, doğal ortamlarında sağlıklı balıklardan elde edilen temel mikrobiyal kompozisyon verilerinin olmayışıdır. Bu nedenle, diyet manipülasyon stratejileri de tam olarak etkili olmamaktadır. Öncelikle, en iyi giriş yolu ve en uygun dozun araştırılması önemlidir ve özellikle probiyotiği kuru peletlerde canlı tutmak için teknik çözümler geliştirmek gereklidir. Dolayısıyla, probiyotiklerin yeme katılması ve depolanması esnasında canlılıklarının korunmasının sağlanması, diğer katkı maddeleri ile birlikte kullanılma olasılıklarının araştırılması öncelikli hedeftir. Bununla birlikte,

yetiştiricilik koşullarında balık bağırsak mikrobiyal topluluklarının güçlendirilmesi, balık sağlığını ve su ürünleri verimliliğini artıracaktır.

Araştırmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçların gerek balık çiftlikleri gerekse doğal alanların balıklandırılmalarında uygulanabilir olması ülkemizde yer alan balık yetiştiriciliği sektörünün daha sağlıklı ve güvenilir bir yol alması açısından önemli bulunmuştur.

Bir probiyotığın, ticari amaçlarla kullanabilmesi için *in vitro* ve *in vivo* verilerle desteklenerek kanıtlanması gerekir. Bu, su ürünleri yetiştiriciliğindeki probiyotikler için özellikle önemlidir, nihayetinde havuzda suya ve tortuya dağılırlar ve doğru probiyotik kullanılmazsa havuzdaki florada dengesizlik oluşturabilirler. Öte yandan, su ürünleri yetiştiriciliği sistemlerindeki mikrobiyal ekoloji çalışmalarının, mikrobiyal komüniteyle hayvan büyümesi ve su kalitesi arasındaki ilişkinin güçlendirilmesine ihtiyaç vardır.

Balıklarda probiyotiklerin geliştirilmesi, bağırsak mikroflorasındaki fonksiyonları düzenleyen prebiyotiklerin alınmasında katkı sağlayacaktır. Gelecekte özellikle hayvan sağlığında bunların kullanımlarının daha yaygın hale gelmesi sonucunda verim artışının sağlanması muhtemeldir.

Probiyotiklerin, akut bir hastalığın tedavisinde antibiyotiklerin yerini alması düşünülmesine de profilaktif uygulamalarda, antibiyotiklere alternatif olarak kullanımı mümkündür. Böyle bir durumda probiyotiklerin kullanım düzeyinin ve antibiyotik direncinin, su ürünleri yetiştiriciliği ve yabani balıklar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi çok önemlidir.

- Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik bakteri suşlarının tanımlanması ve doğru türün seçilmesi için kapsamlı çalışmalar gerekir
- Deneysel verilerin, laboratuvarından endüstriyel ölçeğe yönlendirilmesi için probiyotik özelliklerin karakterizasyonu yapılmalıdır

- Yeni nesil sekanslama yöntemleri ile probiyotik mikroorganizmaların filogenetik tanımlaması yapılmalıdır
- Beslenme veya bağışıklık gibi faktörler üzerine daha fazla *in vivo* araştırma yapılmalıdır
- Antibiyotik direnç genleri taşıyıp aktarabilen suşlar, probiyotik olarak değerlendirilmemelidir
- Probiyotik kullanım sonucu oluşacak çevre düzeyindeki etkileşimler araştırılmalı ve probiyotiklerin yetiştiricilikte kullanılmalarında maliyet analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotikler gelecek için umut verici olsa da konuyla ilgili çok fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Çalışmamızın Kuzeydoğu Akdeniz kıyılarında doğada ve yetiştiricilikteki çipuraların bağırsak probiyotik bakterileri üzerine söz konusu bölgelerde yapılan ilk çalışma olması açısından önemli olabileceği düşünülmüştür.

Diğer yandan, yetiştiricilik ortamında eksiliği görülen probiyotik bakterilerin tespiti ve eksikliğin giderilmesi konusunda gerek çiftçilere ve gerekse konuyla ilgili yapılacak ileriki çalışmalara yol göstermesi ve ışık tutması açısından önemli bulunmuştur.



KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, M., Eissa, A. E., Hanna, M., Okada, M. A., 2013. Identifying Some Pathogenic *Vibrio/Photobacterium* Species During Mass Mortalities of Cultured Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) and European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) From Some Egyptian Coastal Provinces. International Journal of Veterinary Science And Medicine, 1 (2): 87-95.
- Alexander, D. B. ve Zuberer, D. A., 1991. Use of Chrome Azurol S Reagents to Evaluate Siderophore Production by Rhizosphere Bacteria. Biol. Fertil. Soils., 12: 39-45.
- Al-Harbi, A. H. ve Uddin, M. N., 2004. Seasonal Variation in the Intestinal Bacterial Flora of Hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) Cultured in Earthen Ponds in Saudi Arabia. Aquaculture, 229: 37-44.
- Alonso, S., Castro, C. M., Berdasco, M., García de la Banda, I., Moreno-Ventas, X., Hernández de Rojas, A., 2018. Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11: 569-579.
- Aly, S. M., Abd-El-Rahman, A. M., John, G., Mohamed, M. F., 2008. Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. Aquaculture, 277: 1-6.
- Amel, B. K. N., Amine, B., Amina, B., 2008. Survival of *Vibrio fluvialis* in Seawater Understarvation Conditions. Microbiological Research, 163: 323-328.
- Anderson, D., 1992. A Case for Standards of Counseling Practice. Journal of Counseling and Development, 71 (1): 22-26.
- Aoki, T., 1988. Drug-Resistant Plasmids From Fish Pathogens. Microbiol Sci. 5: 219-223.

- Arda, M., 1995. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan Yayın Serisi no 46. 2000. Medisan Yayınevi, Ankara. 29. Bölüm.
- Arslan, S., 2017. Isolation, Identification and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Different Regions of Turkey White Cheese Samples. agris. fao. org.
- Balcazar, J. L., Blas, I., Zarzuela, I. R., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J. L., 2006. The Role Of Probiotics in Aquaculture. Veterinary Microbiology, 114: 173-186.
- Balcazar, J. L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A. C., Marquez, I., Girones, O., Muzquiz, J. L., 2007. Changes in Intestinal Microbiota and Humoral Immune Response Following Probiotic Administration in Brown Trout (*Salmo trutta*). British Journal of Nutrition, 97: 522-527.
- Balcazar, J. L., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., Girones, O., 2008. Characterization of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Intestinal Microbiota of Fish. Aquaculture, 278: 188-191.
- Balta, F. ve Yılmaz, H., 2019. Kültür Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* Enfeksiyonu. Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences, 4 (2): 104-110.
- Baumann, P. ve Furniss, A. L., 1994. Vibrionaceae, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 190-272 s.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., Hill, C., 2005. The Interaction Between Bacteria and Bile. FEMS Microbiol. Rev., 29 : 625-651.
- Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J., Venema, G., 1989. Cloning of Two Bacteriocin Genes From a Lactococcal Bacteriocin Plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 55 (5): 1187-1191.

- Bell, G. R., Hoskins, G. E., Hodgkiss, W., 1971. Aspects of the Characterization, Identification, and Ecology of the Aterial Flora Associated with the Surface ff Stream-Incubating Pacific Salmon (*Oncorhynchus*) Eggs. J. Fish. Board Can., 28: 1511-1525.
- Bergh, O., Naas, K. E., Harboe, T., 1994. Shift in The Intestinal Microflora of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) Larvae During First Feeding.Canadian Journal of Fisheries And Aquatic Sciences, 51 (8): 1899-1903.
- Boutin, S., Bernatchez, L., Audet, C., Derome, N., 2012. Antagonistic Effect of Indigenous Skin Bacteria of Brook Charr (*Salvelinus fontinalis*) Against *Flavobacterium Columnare* and *F. psychrophilum*. Veterinary Microbiology, 155: 355–361.
- Buchanon, R. E. ve Gibson, N.E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 530-534 s.
- Bullock, G. L., 1987. Vibriosis in Fish Disease Leaflet77, U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- Buntin, N., Chanthachum, S., Hongpattarakere, T., 2008. Screening of Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal Tracts of Marine Fish for Their Potential Use as Probiotics. Songklanakarin J.. Sci. Technol., 30 (1): 141-148.
- Burr, G., Gatlin,D., Ricke, S., 2005. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract of Fish and the Potential. Journal of the World Aquaculture, 36 (4): 425-436.
- Cabello, F. C.,Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., Buschmann, A., H., 2013. Antimicrobial Use in Aquaculture Re-Examined: its Relevance to Antimicrobial Resistance and to Animal and Human Health. Environmental Microbiology, 15 (7): 1917-1942.
- Cahill, M. M., 1990. Bacterial flora of Fishes: A Review Microbial Ecology, 19 (1): 21-41.

- Campbell, A. C. ve Buswell, J. A., 1983. The Intestinal Microflora of Farmed Dover Sole (*Solea solea*) at Different Stages of Fish Development. *Journal of Applied Bacteriology*, 55 (2): 215-223.
- Carrascosa, C., Saavedra, P., Millan, R., Jaber, J. R., Montenegro, T., Raposo, A., Sanjuan, E., 2016. Microbial Growth Models in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Stored in Ice *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25 (3): 307-322.
- Cataldi, E., Cataudella, S., Monaco, G., Rossi, A., Tancioni, L., 1987. A Study of the Histology and Morphology of the Digestive Tract of the Sea-Bream, *Sparus aurata*. *Journal of Fish Biology*, 30 (2):135-145.
- Chabrillon, M., Rico, R. M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M. C., Morinigo, M. A., 2005. Interactions of Microorganisms Isolated from Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a Pathogen of Farmed Senegalese Sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 28 (9): 531-537.
- Chabrillon, M., Salvador A., Diaz-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.
- Clements, K. D., Angert, E. R., Montgomery, W. L., 2014. Intestinal Microbiota in Fishes: What's Known and What's Not. *Molecular Ecology*, 23 (8):1891-1898.
- Coşkun T, 2006. Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49 (2): 128-148.
- Çakmakçı, S., Çetin, B., Turgut, T., Gürses, M., Erdoğan, A., 2012. Probiotic Properties, Sensory Qualities, and Storage Stability of Probiotic Banana Yogurts. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*; 36 (3): 231-237.

- Çapkın, E., Öztürk, R. Ç., Altınok, İ., Özdemir, S., 2015. Balıklardan İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi. *Ekoloji Sempozyumu*, Sinop, s 1.
- Dehler, C. E., Secombes, C. J., Martin, S. A. M., 2017. Environmental and Physiological Factors Shape the Gut Microbiota of Atlantic Salmon Parr (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 467: 149–157.
- Dhanasiri, A. K. S., Brunvold, L., Brinchmann, M. F., Korsnes, K., Bergh, O., Kiron, V., 2011. Changes in the Intestinal Microbiota of Wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. Upon Captive Rearing. *Microb. Ecol.*, 61: 20-30.
- Didinen, B. I., Onuk, E. E., Metin, S., Cayli, Ö., 2017. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture Nutrition*: 1-8.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels, S., Guroy, D., Davies, S. J., 2011. Microbial Manipulations to Improve Fish Health and Production a Mediterranean Perspective. *Fish Shelfish Immunol.*, 30: 1-16.
- Dixon, B. A., Yamashita, J., Evelyn, F., 1990. Antibiotic Resistance of *Aeromonas* spp. Isolated From Tropical Fish Imported From Singapore. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2 (4): 295-297.
- Douglas, L. C., Sanders M. E., 2008. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *J. Am. Dietetic. Assoc.*, 108: 510-521.
- Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran, N., Chaiyasut, C., 2008. Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Plant Beverages. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (4): 652-655.
- EC, 2017. https://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/farmed_fish_and_shellfish/seabream_en, Accessed date: 4 July.

- Eddy, S. D. ve Jones. H. S., 2002. Microbiology of Summer Flounder *Paralichthys dentatus* Fingerling Production at a Marine Fish Hatchery. *Aquaculture*, 211 (1-4): 9-28.
- Eleonor A. T. ve Leobert, D., 2001. Antibiotic Resistance of Bacteria from Shrimp Ponds. *Aquaculture*, 195: 193-204.
- Erdoğan, A. T., 2012. Akuatik Canlılarda Antibiyotik Kullanımı. Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyel Direnç Sempozyumu. Gıda Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı, 87-99s.
- FAO, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations, s 26.
- Ferrari, A. ve Chiericato, R., 1981. Feeding Habits Of Juvenile Stages of *Sparus auratus* L., *Dicentrarchus labrax* L. and Mugilidae in a Brackish Embayment of the Po River Delta. *Aquaculture*, 25 (2-3); 243-257.
- Fgaier, H. ve Eber, H. J., 2011. Antagonistic Control of Microbial Pathogens under Iron Limitations by Siderophore Producing Bacteria in a Chemostat Setup. *J. Theor. Biol.*, 273: 103-114.
- Floris, R., 2011. Microbial Ecology of the Intestinal Tract of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). Tesi di Dottorato in Scienze e Tecnologie Zootecniche- XXIII Ciclo, Università degli Studi di Sassari, İtalya, s 33.
- Floris, R., Manca, S., Fois, N., 2013. Microbial Ecology of Intestinal Tract of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) From Two Coastal Lagoons of Sardinia (Italy). *Transitional Waters Bulletin*, 7 (2): 4-12.
- Gatesoupe, F. J., 1994. Lactic Acid Bacteria Increase the Resistance of Turbot Larvae, *Scophthalmus maximus*, Against Pathogenic *Vibrio*. *Aquatic living resource*, 7 (4): 277-284.
- Gatesoupe, F. J., Infante, J. Z., Cahu, C., Quazugual, P., 1997. Early Weaning of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*): the Effect on Microbiota, with Particular Attention to Iron Supply and Exoenzymes. *Aquaculture*, 158: 117-127.
- Gatesoupe, F. J., 1999. The Use of Probiotics in Aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.

- Gatesoupe, F. J., 2002. Probiotic and Formaldehyde Treatments of *Artemia nauplii* as Food For Larval Pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212 (1-4): 347-360.
- Ghittino, P., Andruetto, S., Vighani, E., 1972, 'Red mouth' Enzootic in Hatchery Rainbow Trout Caused by *Vibrio anguillarum*, *Riv. Ital. Piscic. Ittiopathol.*, 7: 41-45.
- Gildberg, A. ve Raa, J., 1983. Purification and Characterization of Pepsins from the Arctic Fish Capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75A: 337-342.
- Gildberg, A., Johansen, A., Bogwald, J., 1995. Growth and Survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Fry Given Diets Supplemented With Fish Protein Hydrolysate and Lactic Acid Bacteria During a Challenge Trial With *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 138: 23-34.
- Gilliand, S. E, 1984. Importance of Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus* Used as a Dietary. *J Dairy Sci.*, 67: 3045-3051.
- Goarant, C., Merien, F., Berthe, F., Mermoud, I., Perolat, P., 1999. Arbitrarily Primed PCR to Type *Vibrio* spp. Pathogenic For Shrimp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1145-1151.
- Gomez, G. D. ve Balcazar, J. L., 2008. A Review on the Interactions Between Gut Microbiota and Innate Immunity of Fish. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 52: 145-154.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., Thakker, J. N., 2014. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a Credible PGPR: a Novel IAA-producing Bacteria Isolated from Saline Desert. *J. Plant Interact.*, 9: 566-576.
- Gökoğlu, N., 2002. Su Ürünleri İşleme Teknolojisi, Su Vakfı Yayınları, İstanbul, s 157.

- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T. F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3): 969-973.
- Grandis, S. A. ve Stevenson, R. M. W., 1985. Antimicrobial Susceptibility Patterns and R Plasmid-Mediated Resistance in the Fish Pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 27: 938-942.
- Griez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J., Ollevier, F., 1997. Dominant Intestinal Microflora of Sea Bream and Sea Bass Larvae, From Two Hatcheries, During Larval Development. *Aquaculture*, 155 (1-4): 391-403.
- Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan, P., Ouarne, F., Theodorou, V., Roques, C., 2010. In vitro Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Prebiotic Glucooligosaccharides to Select Effective Synbiotics. *Anaerobe.*, 16 (5): 493-500.
- Halami, P. M., Chandrashekar, A., Joseph, R., 1999. Characterization of Bacteriocinogenic Strains of Lactic Acid Bacteria in Fowl And Fish Intestines and Mushroom. *Food Biotechnol.*, 13: 121-136.
- Hamid, A., Sakata, T., Kakimoto, D., 1978. Microflora in the Alimentary Tract of Gray Mullet. *Bulletin Of Japanese Society of Scientific Fishers*, 44 (1): 53-57.
- Hansen, G. H. ve Olafsen, J. A., 1999. Bacterial Interactions in Early Life Stages of Marine Cold Water Fish. *Microb*, 38: 1-26.
- Heikkinen, R. K., Luoto, M., Araujo, M. B., Virkkala, R., Thuiller, W., Sykes, M. T., 2006. Methods and Uncertainties in Bioclimatic Modelling under Climate Change. *Progress in Physical Geography*, 30: 751-777.
- Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielsen, J., Melchiorson, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H., Gram, L., 2004. Selection and Identification of Autochthonous Potential Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units. *System. Appl. Microbiol.*, 27: 360-371.

- Horne, M. T., 1982. The Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* (Bergman), Microbial Diseases of Fish, Academic Press, London, s 171-189.
- Huss, H. H., 1988. Fresh Fish Quality and Quality changes, FAO, s 131.
- Ibrahim, M. D., 2015. Evolution of Probiotics in Aquatic World: Potential Effects, the Current Status in Egypt and Recent Prospectives. Journal of Advanced Research, 6: 765-791.
- Inglis, V. , Yimer, E. , Bacon, E. J., Ferguson, S. , 1993. Plasmid Mediated Antibiotic Resistance in *Aeromonas salmonicida* Isolated from Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., in Scotland. J. Fish Dis., 16: 593-599.
- Irianto, A. ve Austin, B., 2002. Probiotics in Aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25: 633-642.
- İbrahim, F., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., 2004. Effect of Temperature on in vitro Adhesion of Potential Fish Probiotics. Microbial Ecology in Health and Disease, 16: 222-227.
- Kelly, M. T., 1982. Effect of Temperature and Salinity on *Vibrio vulnificus* Occurrence In a Gulf Coast Environment. Appl Environ Microbiol., 44: 820.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. L., Gibson, L., 2008. Probiotics in Aquaculture: The Need, Principles and Mechanisms of Action and Screening Processes. Aquaculture, 274: 1-14.
- Kim, D. H., Brunt, J., Austin, B., 2007. Microbial Diversity of intestinal Contents and Mucus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Microbiology, 102: 1654-1664.
- Koçak, Y., Fındık, A., Çiftçi, A., 2016. Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 27 (2): 118-122.
- Kozasa, M., 1986. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) As Growth Promotor for Animal Feeding. Microbiol. Aliment. Nutrition, 4: 121-135.
- Liston, J., 1956. Quantitative Variations in the Bacterial Flora of Flatfish. J. Gen. Microbiol., 15: 305-314.

- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., Tsakalidou, E., 2006. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated From Dairy Products. *International Dairy Journal*, 16 (3): 189-199.
- Marshall, B. M. ve Levy, S. B., 2011. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (4): 718-733
- Mc Phearson, R. M., Paola, A., Zywno, S. R., Motes, Jr. M. L., Guarino, A. M., 1991. Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria From Cultured Catfish and Aquaculture Ponds. *Aquaculture*, 99: 203-211.
- Merrifield, D. L, Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker R. T. M., Bogwald, J., Castex, M., Ringo, E., 2010. The Current Status and Future Focus of Probiotic And Prebiotic Applications For Salmonids. *Aquaculture*, 302: 1-18.
- Munro, P. D., Barbour, A., Birkbeck, T. H., 1995. Comparison of the Growth and Survival of Larval Turbot in the Absence of Culturable Bacteria with Those in the Presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 6 (12): 4425-4428.
- Muroga, K., Lida, M., Matsumoto, H., Nakai, T., 1986. Detection of *Vibrio anguillarum* From Water, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 52: 641-648.
- Muthukumar, P. ve Kandeepan, C., 2015. Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Organisms from Intestine of Fresh Water Fishes. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 4: 607-616.
- Nami, Y., Haghshenas, B., Abdullah, N., Barzegari, A., Radiah, D., Rosli, R., Khosroushahi, A. Y., 2015. Probiotics or Antibiotics: Future Challenges in Medicine. *Journal of Medical Microbiology*, 64: 137-146.
- Navarrete, P., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2008. Oxytetracycline Treatment Reduces Bacterial Diversity of Intestinal Microbiota of Atlantic Salmon. *J. Aquat. Anim. Health*, 20: 177-183.
- Nayak, S. K., 2010. Role of Gastrointestinal Microbiota in Fish. *Aquac. Res.*, 41, 1553-1573.

- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G., 2001. Protection of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198: 229-236.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A. C., 2001. Characterization of the Properties of Human- and Dairy-Derived Probiotics for Prevention of Infectious Diseases in Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (6): 2430-2435.
- Noga, E., 2000, *Fish Diseases, Diagnosis and Treatment*, Iowa State Press, Iowa, 0-8138-2558-X. S 220.
- Novik, G.I., Samartsev, A. A., Astapovich, N. I., Kavirus, M.A., Mikhalyuk A. N., 2006. Biological Activity of Probiotic Microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 166–172.
- Onarheim, A. M., Ragnhild, W., Burghardt, J., Stackebrandt, E., 1994. Characterization and Identification of Two *Vibrio* Species Indigenous to the Intestine of Fish in Cold Sea Water; Description of *Vibrio iliopiscarius* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 17 (3): 370-379.
- Özşavlı, A., Şahin, F., Sadak, M., Çaktü Güler, K., 2018. Türk Tarım Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6 (1): 65-68.
- Öztürk, F. Y., 2007 The Use of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) as the Effect on Performance. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, s 1.
- Paola, A., Mc Leroy, S., Mc Manus, G., 1997. Distribution of *Vibrio vulnificus* Phage in Oyster Tissues and Other Estuarine Habitats. *Appl EnvironMicrobiol.*, 63: 2464-2467.
- Parker, R. B., 1974. Probiotics. The Other Half of the Antibiotics Story. *Anim Nutr Health*, 29: 4-8.
- Pavlovic, N.,Stankov, K.,Mikov, M.,2012. Probiotics-interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. *Appl Biochem Biotechnol.*, 168 (7): 1880-1895.

- Perez-Sanchez, T., Balcazar, J. L., Garcia, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., 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*. J. Fish Dis., 34: 499-507.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R., Gill, H. S., 2005. Modulation of the Microbial Ecology of the Human Colon by Probiotics, Prebiotics and Synbiotics to Enhance Human Health: An over view of Enabling Science and Potential Applications. FEMS Microbiol Ecol., 52: 145-152.
- Reda, R. M., Selim, K. M., El-Sayed, H. M., El-Hady, M. A., 2017. *in vitro* Selection and Identification of Potential Probiotics Isolated from the Gastrointestinal Tract of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Probiotics & Antimicro. Prot., 10: 692-703.
- Reed, A. P. ve Francis-Floyd, R., 1996. Vibrio Infections of Fish, (Online), Edis, University of Florida, USA, s 3.
- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., Piyatiratitivorakul, S., 2008. Evaluations of Lactic Acid Bacteria as Probiotics for Juvenile Seabass *Lates calcarifer*. Aquaculture research, 39: 134-143.
- Reuter, G., 2001. Probiotics Possibilities and Limitations of Their Application in Food, Animal Feed, and in Pharmaceutical Preparations for Men and Animals. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 114: 409-410.
- Ringo, E. T., Birkbeck, H., Munro, P. D., Vadstein, O., Hjelmeland, K., 1996. The Effect of Early Exposure to *Vibrio pelagius* on the Aerobic Bacterial Flora of Turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) Larvae. J. Appl. Bacteriol., 81: 207-211.
- Ringo, E. ve Gatesoupe, F. J., 1998. Lactic Acid Bacteria in Fish: a Review. Aquaculture, 160: 177-203.

- Ringo, E. ve Vadstein, O., 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in Early Developing Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) Larvae. *Journal of Applied Microbiology*, 84 (2): 227-233.
- Ringo, E. ve Holzapfel, W., 2000. Identification and Characterization of Carnobacteria Associated With The Gills of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *System. Appl. Microbiol.*, 23: 523-527.
- Ringo, E., Sernewesmajervi, M., Rogn Bendiksen H., Berg, A., Olsen, R. E., Johnsen, T., Mikkelsen, H., Seppola, M., Strom, E., Holzapfel, W., 2001. Identification and Characterization of Carnobacteria Isolated from Fish Intestine. *System. Appl. Microbiol.*, 24: 183-191.
- Ringo, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S., Krogdahl, A., 2006. Characterisation of The Microbiota Associated With Intestine of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.): The Effect of Fish Meal, Standard Soybean Meal And A Bioprocessed Soybean Meal. *Aquaculture*, 261: 829-841.
- Romero, J. ve Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-Based Analysis of Dominant Bacterial Populations Associated with Early Life Stages of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbial Ecology*, 51: 422-430.
- Ross, A. E., Martin, J. E., Bressler, V., 1968. *Vibrio anguillarum* from an Epizootic in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) in the U.S.A., *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 69: 1139-1148.
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N., 2014. Characterization of Intestinal Bacteria in Wild and Domesticated Adult Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *PLoS ONE* 9(3): e91853.
- Saka, Ş. ve Fırat. K., 2008. Çipura (*Sparus aurata* Lin., 1758) Balığının Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, İzmir, 88-92 s.

- Sakata, T., Nakaji, M., Kakimoto, D., 1978. Microflora in the Digestive Tract of Marine Fish. I. General Characterization of the Isolates from Yellow Tail. Mem. Fac. Fish, 27: 65-71.
- Sanders, J. E. ve Fryer, J. L., 1988. Bacteria of Fish, Methods in Aquatic Bacteriology, John Wiley and Sons Ltd., England, s 115-143.
- Sansawat, A. ve Thirabunyanon, M., 2009. Anti-*Aeromonas hydrophila* Activity and Characterisation of Novel Probiotic Strains of *Bacillus subtilis* Isolated from the Gastrointestinal Tract of Giant Freshwater Prawns. Maejo Int J Sci Technol., 3 (1): 77-87.
- Savaş, S., Kubilay, A., Basmaz, N., 2005. Effect of Bacterial Load In Feeds on Intestinal Microflora of Seabream (*Sparus Aurata*) Larvae and Juveniles. The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh, 57 (1): 3-9.
- Scarano, C., Pirasa, F., Virdisa, S., Ziinob, G., Nuvolonic, R., Dalmassod, A., Santisa, E. P. L., Spanua, C., 2018. Antibiotic Resistance of *Aeromonas* ssp. Strains Isolated from *Sparus aurata* Reared in Italian Mariculture Farms. International Journal of Food Microbiology, 284: 91-97.
- Schochetman, G. ve Jones, K. W., 1988. Polimerase Chain Reaction. J. Infect. Dis., 158; 1154-1157.
- Schulze, A. D., Alabi, A. O., Tattersall-Sheldrake, A. R., Miller, K. M., 2006. Bacterial Diversity in a Marine Hatchery: Balance Between Pathogenic and Potentially Probiotic Bacterial Strains. Aquaculture, 256: 50-73.
- Sharifuzzaman, S. M., Abbass, A., Tinsley, J. W., Austin, B., 2011. Subcellular Components of Probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 Induce Protective Immunity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Against *Vibrio anguillarum*. Fish Shellfish Immunol., 30: 347-353.
- Sharifuzzaman, S. M., Rahman, H., Austin, D. A., Austin, B., 2018. Properties of Probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 Isolated from Fish Guts. Probiotics & Antimicro. Prot., 10: 5345-42.

- Sharma, K. K., Soni, S. S., Meharchandani, S., 2006. Congo Red Dye Agar Test as an Indicator Test for Detection of Invasive Bovine *Escherichia coli*. *Vet Arhiv.*, 76: 363-366.
- Shin, S. H., Lim, Y., Lee, S. E., Yang, N. W., Rhee, J. H., 2001. CAS Agar Diffusion Assay for the Measurement of Siderophores in Biological Fluids. *Journal of Microbiological Methods*, 44 (1): 89-95.
- Silva, F. C. P., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Kaushik, S., Gatesoupe, F. J., 2011. Influence of the Diet on the Microbial Diversity of Faecal and Gastrointestinal Contents in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and Intestinal Contents in Goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 78: 285-296.
- Sitja-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M. J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2003. Immunological and Pathological Status of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.) Under Different Long-Term Feeding Regimes. *Aquaculture*, 220(1-4): 707-724.
- Skjermo, J. ve Vadstein, O., 1999. Techniques for Microbial Control in the Intensive Rearing of Marine Larvae. *Aquaculture*, 177: 333-343.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., 2007. Enzymatic Activity of Intestinal Bacteria in Roach *Rutilus rutilus* L.. *Fisheries Science*, 73: 964-966.
- Smith, L. S., 1980. Digestion in Teleost Fishes. In: *Fish feed technology*, FAO/UNDP aquaculture development and coordination Programme, ADCP/REP/SO/11. FAO/UNDP, Rome, 3-17 s.
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Roman, L., Grasso, V., Vega, J., Real, F., 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Against Vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, 155: 369-373.
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K. F., Gram, L., 2000. The Microflora of Rainbow Trout Intestine: a Comparison of Traditional and Molecular Identification. *Aquaculture*, 182: 1-15.

- Strom, E. ve Ringo, E., 1993. Changes in Bacterial Flora in Developing Cod, *Gadus morhua* (L.), Larvae After Inoculation of *Lactobacillus plantarum* in the Water. In: Walther B, Fyhn HJ (eds) Physiological and Biochemical Aspects of Fish Larval Development. University of Bergen, Norway, 226-228 s.
- Sugita, H., Tsunohara, M., Ohkoshi, T., Deguchi, Y., 1988. The Establishment of an Intestinal Microflora in Developing Goldfish (*Carassius auratus*) of Culture Ponds. Microbial Ecology, 15: 333-344.
- Sung, H. H., Hsu, S. F., Chen, C. K., Ting, Y. Y., Chao, W. L., 2001. Relationships Between Disease Outbreak in Cultured Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) and The Composition of *Vibrio* Communities in Pond Water and Shrimp Hepatopancreas During Cultivation. Aquaculture, 192: 101-110.
- Surgalla, M. J. ve Beesley, E. D., 1969. Congo Red-Agar Plating Medium for Detecting Pigmentation in *Pasteurella pestis*. Appl. Micro., 18 (5): 834-837.
- Süzer, C., Çoban, D., Kamacı, H. O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., Küçüksarı, H., 2008. *Lactobacillus* spp. Bacteria as Probiotics in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*, L.) Larvae: Effects on Growth Performance and Digestive Enzyme Activities. Aquaculture, 1 (4): 140-145.
- Tancioni, L., Mariani, S., Maccaroni, A., Mariani, A., Massa, F., Scardi, M., Cataudella, S., 2003. Locality-Specific Variation in the Feeding of *Sparus aurata* L.: Evidence From Two Mediterranean Lagoon Systems. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 57: 469-474.
- Timmerman, H.M., Koning, C.J.M., Mulder, L., Rombouts, F.M., Beynen, A.C., 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics- A comparison of functionality and efficacy, International Journal of Food Microbiology, 219– 233.
- Timur, G. ve Timur, M., 2003. Balık Hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Rektörlük Yayın No: 4426.

- Tittlemie, S. A., Riet, J. V. D., Burns, G., Potter, R., Murphy, C., Rourke, W., Pearce, H., Dufresne, G., 2007. Analysis of Veterinary Drug Residues in Fish and Shrimp Composites Collected During the Canadian Total Diet Study, 1993-2004. Food Addit. Cont., 24: 14-20.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F., 2015. *in vitro* Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles. Hindawi Publishing Corporation biomed Research International: 1-8.
- Topal, M., Uslu Şenel, G., Arslan Topal, E. I., Öbek, E., 2015. Antibiyotikler ve kullanım alanları. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31 (3): 121-127.
- Turabian, K. L., 1996. A manual for writers of term papers, theses, and dissertations. 6th ed. Chicago: University of Chicago Press.
- Türkyılmaz, S. ve Esendal, Ö., 2002. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. Kafkas Ün. Vet. Fak. Derg., 8 (1): 71-76.
- Uddin, G. M. N., Larsen, M. H., Christensen, H., Aarestrup, F. M., Phu, T. M., Dalsgaard, A., 2015. Identification and Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Probiotic Products Used in Shrimp Culture. PLoS One 10(7):e0132338.
- Vaseeharan, B. ve Ramasamy, P., 2003. Control of Pathogenic *Vibrio* by spp. *Bacillus subtilis* BT23, a Possible Probiotic Treatment For Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon*. Applied Microbiology, 36: 83-87.
- Verner-Jeffreys, D. W., Shields, R. J., Bricknell, I. R., Birkbeck, T. H., 2003. Changes in the Gut-Associated Microflora During the Development of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) Larvae in Three British Hatcheries. Aquaculture, 219 (1-4): 21-42.
- Vine, N. G, Leukes, W. D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in Marine Larviculture. FEMS Microbiology Reviews, 30 (3): 424-427.

- Walker, J. ve Dounan, G., 1989. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. J. Appl. Microbiol., 67: 229-230.
- Wang, Y. B. ve Han, J. Z., 2007. The Role of Probiotic Cell Wall Hydrophobicity in Bioremediation of Aquaculture. Aquaculture, 269: 349-354.
- Wassef, E. ve Eisawy, A., 1985. Food and Feeding Habits of Wild and Reared Gilthead Bream *Sparus aurata* L. International Journal of Ichthyology, 9 (3): 233-242.
- Yan, F. ve Polk, D. B., 2004. Commensal Bacteria in the Gut: Learning Who Our Friends Are. Current Opinion in Gastroenterology, 20: 565-571.
- Yaşar, B. ve Kurdaş, O. Ö., 2009. Probiyotikler ve Gastrointestinal Sistem. Güncel Gastroenteroloji, 13-1.
- Yiğit, T., 2009. Süt ve Süt Ürünlerinden Probiyotik Bakterilerden İzolasyonu, Anadolu Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Yoshimizu, M. ve Kimura, T., 1976. Study on the Intestinal Microflora of Salmonids. Fish Pathology, 10 (2): 243-259.
- Yoshimizu, M., Kimura, T., Sakai, M., 1980. Microflora of the Embryo and the Fry of Salmonids. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 46, 967-975.
- You, J. L., Cao, L. X., Liu, G. F., Zhou, S. N., Tan, H. M., Lin, Y.C., 2005. Isolation and Characterization of Actinomycetes Antagonistic To Pathogenic *Vibrio* spp. From Nearshore Marine Sediments. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21: 679-682.
- Yufera, M., Fernandez-Díaz, C., Vidaurreta, A., Cara, J. B., Moyano, F. J., 2004. Gastrointestinal pH and Development of the Acid Digestion in Larvae and Early Juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei) Marine Biology, 144: 863-869.
- Yüngül, M. ve Özdemir, Y., 2017. Balıklarda Sindirim, Sindirim Enzimleri ve Salgılar. Int. J. Pure Appl. Sci., 3 (2): 20-32.

Zhang, W., Mingqi, L., Xianjun, D., 2013. Biological Characteristics and Probiotic Effect of *Leuconostoc lactis* Strain Isolated from the Intestine of Black Porgy Fish. Brazilian Journal of Microbiology, 44 (3): 685-691.





ÖZGEÇMİŞ

23/04/1983 yılında Düziçi’nde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2002 yılında başladığı Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretimi Anabilim Dalı’ndan 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü’nde yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi oldu ve yüksek lisansa Yetiştiricilik Anabilim Dalı’nda devam etti. 2011 yılında yüksek lisansını tamamladı. 2012 yılında aynı bölümde doktora çalışmasına başladı. Halen Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk annesidir.



EKLER



**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL
ETİK KURULU**

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
2	26.02.2016	Ç.Ü.T.F.-DETAUM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

KARAR NO 9- Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalı Başkanlığı'nda Öğretim Görevlisi Doç.Dr.Aysel ŞAHAN'ın sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen, **"İskenderun Körfezinde Yetiştiricilik ve Doğal Koşullar Altındaki Çipura (Sparus aurata linnaeus 1758)'ların Bağırsak Florasında Bulunan Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Karşılaştırmalı Genotipik İdentifikasyonu ve Karakterizasyonu"** başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Araştırmacı Uzman Üye
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

ÜYELER Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU
Veteriner Hekim
ÇÜTF-DETAUM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Araştırmacı Uzman Üye
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE
Araştırmacı Uzman Üye
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gülşah SEYDAOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Biyostatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bertan YILMAZ
Araştırmacı Uzman Üye
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Mehmet Ali AKGÜL
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

