



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİNDE
PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK
BACİLLUS SUŞLARININ BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Sezen DEMİRHAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİNDE
PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK
BACİLLUS SUŞLARININ BELİRLENMESİ**

Sezen DEMİRHAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.00

Sunuş Tarihi: 12.05.2022

Bornova-İZMİR

2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotik Olarak Kullanılabilecek *Bacillus* İzolatlarının Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12 / 05 / 2022

İmzası

Sezen DEMİRHAN

ÖZET**SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİNDE
PROBİYOTİK OLARAK KULLANILABİLECEK
BACILLUS TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ**

DEMİRHAN, Sezen

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Mayıs, 2022, 123 sayfa

Çalışmamızda öncelikle probiyotik özellikleri belirlenecek *Bacillus* izolatlarının *V. anguillarum*, *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *Y. ruckeri* gibi balık patojeni test bakterilerine karşı antibakteriyel aktiviteleri karşıt çizgi ve agar kuyucuk difüzyon yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenen 75 izolatın agar disk difüzyon yöntemi ile 9 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik dirençleri taranmıştır. Bu antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlenen 55 adet izolatın mide sıvısı (pH 2,5) toleransı incelenerek 13 adet izolatın mide sıvısına karşı toleransı saptanmış ve bu izolatların asidik pH 'larda optimum büyüme özelliği, yüzey hidrofobiklikliği, safra toleransı ve proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz aktiviteleri, hemolitik aktiviteleri, koagülaz aktiviteleri, bakteriyel tutunma yetenekleri ve biyofilm üretebilme özellikleri belirlenmiştir.

Sonuç olarak incelenen izolatlar arasında en iyi probiyotik özellikleri gösteren *Bacillus spp.* Ö-4-68 seçilerek yüksek miktarda biyokütle üretimi için laboratuvar ölçeğinde istatistiksel deney tasarımı (Yanıt Yüzeyi Yöntemi/Response Surface Methodology, RSM) ile üretim optimizasyonu yapılmıştır. Denemeler sonucunda yüksek biyokütle üretiminin sağlandığı ekonomik bir üretim ortamı içeriği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus spp.*, Antibakteriyel, Probiyotik, Su Ürünleri Yetiştiriciliği.

ABSTRACT**DETERMINATION OF *BACILLUS* SPECIES WHICH CAN BE
USED AS PROBIOTIC IN AQUACULTURE**

DEMİRHAN, Sezen

MSc in Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Rengin ELTEM

May 2022, 123 pages

In our study, the antibacterial activities of *Bacillus* isolates, whose probiotic properties will be determined, against test bacteria that are fish pathogens such as *V. anguillarum*, *A. hydrophila*, *L. garvieae*, *Y. ruckeri* were determined by using cross-line method and agar well diffusion methods. Then, antibiotic resistances of 75 isolates determined to have antibacterial activity were screened against 9 different antibiotics by the agar disc diffusion method. Gastric juice (pH 2.5) tolerance of 55 isolates determined to be sensitive to antibiotics was examined and the tolerance of 13 isolates to gastric juice was determined. Optimum growth characteristics at acidic pH, surface hydrophobicity, bile tolerance and protease, amylase, lipase, and cellulase activities, hemolytic activities, coagulase activities, bacterial adhesion abilities, and biofilm production properties of these isolates were determined.

As a result, *Bacillus* sp. Ö-4-68, with the best probiotic properties was selected from the examined isolates and production optimization was carried out with laboratory scale statistical experiment design (Response Surface Methodology, RSM) for high amount of biomass production. As a result of the trials, an economical production environment content with high biomass production was determined.

Keywords: *Bacillus* spp., Antibacterial, Probiotic, Aquaculture.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılabilecek *Bacillus* izolatları incelenmiştir. Konunun seçiminde özgün, sanayiye yönelik, sürdürülebilir olması, çevreye fayda sağlaması ve bir sonraki çalışmalar için yol gösterici nitelikte olması göz önünde bulundurulmuştur. Çalışma sonuçları ileride konuyla ilgilenecek olan araştırmacılar için yol gösterici niteliğindedir. Laboratuvar ölçekli yapılan bu çalışmanın bundan sonra pilot ölçekli uygulamalarının optimize edilmesiyle balık probiyotiği olarak kullanılabilecek yerli bir ürün elde edilme potansiyeli bulunmaktadır. Böylelikle ülkemizde su ürünleri sektörünü büyük bir katkı sağlanabileceği ümit edilmektedir. Bu çalışmada esnasında kullandığım farklı metotlar ve bakteri izolatları ileriye dönük olarak benim için önemli katkılar sağlayabilecek güzel bir deneyim olmuştur. Bu tez çalışmasının hazırlanması sırasında ilgi ve bilgisini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Rengin ELTEM 'e teşekkürü borç bilirim.

İZMİR

12/05/2022

Sezen DEMİRHAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	..ii
KABUL ONAY SAYFASI	...iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	iv
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ÖNSÖZ	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Tanımı ve Önemi	4
2.2. Dünya’da Su Ürünleri Yetiştiriciliğinin Önemi	4
2.3. Türkiye’de Su Ürünleri Yetiştiriciliğinin Önemi	5
2.4. Balıkların Mikroflorası	9

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.5. Balık Hastalıkları	10
2.5.1. Balıklarda Gözlemlenen Başlıca Bakteriyel Hastalıklar	11
2.6. Balık Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Başlıca Yöntemler.....	13
2.7. Balık Hastalıklarının Tedavisinde Probiyotikler	16
2.8. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar ve Uygulama Yöntemleri	18
2.9. Balık Probiyotiği Olarak Bacillus Türlerinin Kullanılmasının Önemi.....	20
2.10. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Ticari Probiyotik Ürünler.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. GEREÇ	24
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Bakteri İzolatları ve Test Bakterileri.....	24
3.1.2 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	25
3.1.3 Kullanılan cihazlar.....	36
3.2. YÖNTEM	38
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Saflık Kontrolleri ve Aktifleştirilmesi..	38
3.2.2. Dökme Plaka Yöntemi.....	38
3.2.3. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	39
3.2.4. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi	40

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.5. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Mide Sıvısı Toleransının Belirlenmesi	41
3.2.6. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Asidik pH'larda Optimum Büyümesinin İncelenmesi	42
3.2.7. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Hidrofobik Çözgene Adhezyonunun Belirlenmesi	42
3.2.8. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Safra Toleransının Belirlenmesi.....	43
3.2.9 <i>Bacillus</i> İzolatlarının İnhibitör Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	44
3.2.10. Bakteriyel Tutunma Testi	50
3.2.11. Hemolitik Aktivite Belirleme Yöntemi	52
3.2.12. Koagülaz Aktivitesi Belirleme Yöntemi	52
3.2.13. Biyofilm Üretimini Belirleme Yöntemi.....	52
3.2.14. Seçilen <i>Bacillus</i> izolatının Laboratuvar Ölçeğinde Üretim Optimizasyonu.....	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	56
4.1. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	56
4.1.1. Karşıt Çizgi (Cross-Streak) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi.....	57
4.1.2. Agar Kuyucuk Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi.....	60
4.2. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi.....	62
4.3. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Mide Sıvısı Toleransının Belirlenmesi	70

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Asidik pH’larda Optimum Büyümesinin İncelenmesi.....	73
4.5. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Hidrofobik Çözgene Adhezyonunun Belirlenmesi	75
4.6. <i>Bacillus</i> İzolatlarının Safra Toleransının Belirlenmesi.....	77
4.7. <i>Bacillus</i> İzolatlarının İnhibitör Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	80
4.7.1 Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	81
4.7.2 Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi	83
4.7.3. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	86
4.7.4. Selüloz Aktivitesinin Belirlenmesi	87
4.8. Bakteriyel Tutunma Testi	90
4.9. Hemolitik Aktivite Belirleme Yöntemi	92
4.10. <i>Bacillus</i> İzolatlarına Ait Koagülaz Testi Sonuçları	92
4.11. Biyofilm Üretimini Belirleme Yöntemi.....	93
4.12. Seçilen Bir <i>Bacillus</i> izolatının Laboratuvar Ölçeğinde Üretim Optimizasyonu.....	95
4.12.1. Seçilen <i>Bacillus</i> izolatı için inkübasyon süresinin belirlenmesi.....	99
4.12.2. Biyokütle üretim ortam içeriğinin optimizasyonu	100
4.12.3. RSM kullanılarak optimum üretim ortamı içeriğinin miktarının belirlenmesi.....	101

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.12.4. Optimizasyon modelinin doğrulanması.....	104
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	107
TEŞEKKÜR	118
ÖZGEÇMİŞ.....	119

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Dünya avcılık ve yetiştiricilik üretimi	5
Şekil 2.2 Türkiye’de su ürünleri üretimi, 2011-2020	8
Şekil 2.3 En çok yetiştiriciliği yapılan balıklar, 2011-2020	8
Şekil 2.4 <i>Vibrio anguillarum</i> ’un agar üzerindeki morfolojik görüntüsü.....	12
Şekil 2.5 <i>Vibrio anguillarum</i> ’un balıkta oluşturduğu etkinin görüntüsü.....	12
Şekil 2.6 <i>L. Garvieae</i> ’nin kan agar üzerindeki morfolojik görüntüsü.....	12
Şekil 2.7 <i>L. Garvieae</i> ’nin balıkta oluşturduğu etkinin görüntüsü	12
Şekil 2.8 <i>Y. Ruckeri</i> ’nin kan agar üzerindeki morfolojik görüntüsü	13
Şekil 2.9 <i>Y. Ruckeri</i> ’nin balıkta oluşturduğu etkinin görüntüsü.....	13
Şekil 2.10 Probiyotiklerin balıklara sağladığı faydalar	15
Şekil 2.11 Probiyotikleri konağa uygulama yöntemleri	20
Şekil 3.1 Mc. Farland standardına göre bulanıklık görselleri.....	33
Şekil 3.2 Petri plakasında çizgi ekim yöntemi.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.3 Maltoz standart grafiği	46
Şekil 3.4 p-Nitro Fenol standart grafiği	47
Şekil 3.5 Glikoz standart grafiği	49
Şekil 3.6 Faktörlerin Box-Behnken matrisindeki alt-üst limitleri	55
Şekil 4.1 Karşıt çizgi yöntemiyle antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi.....	57
Şekil 4.2 Agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle <i>L. Garvieae</i> patojenine karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenen izolatlar.....	60
Şekil 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi örnekleri	63
Şekil 4.4 <i>Bacillus</i> izolatlarının hidrofobik çözügene bağlanma yetenekleri (% BATS)	75
Şekil 4.5 <i>Bacillus</i> izolatlarının 3. saat Safra toleransı sonuçları.....	79
Şekil 4.6 <i>Bacillus</i> izolatlarının 6. saat Safra toleransı sonuçları.....	79
Şekil 4.7 Katı besiyerinde proteaz enzim aktivitesi sonucu	81
Şekil 4.8 Katı besiyerinde amilaz enzim aktivitesi sonucu	84
Şekil 4.9 Katı besiyerinde selüloz enzim aktivitesi	88
Şekil 4.10 <i>Bacillus</i> izolatlarının Caco-2 hücrelerine tutunma kabiliyetleri.....	91
Şekil 4.11 <i>Bacillus</i> izolatlarının hemolitik aktivite kabiliyetleri	93
Şekil 4.12 <i>Bacillus</i> izolatlarında koagülaz testi sonucu.....	94

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.13 <i>Bacillus</i> izolatlarında biyofilm üretimi sonuçları	95
Şekil 4.14 <i>Bacillus</i> Ö-4-68 izolatının büyüme eğrisi	99
Şekil 4.15 <i>Bacillus</i> Ö-4-68 ile gerçekleştirilen RSM deneme desenine ait deney tasarımı ve elde edilen yanıtlar	102
Şekil 4.15 <i>Bacillus</i> Ö-4-68 ile gerçekleştirilen yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile yapılan üretim optimizasyonuna ait ANOVA değerleri	103

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Türkiye 'nin su potansiyeli.....	6
Tablo 2.2 Türkiye'de yetiştiricilik ile gerçekleştirilen balık üretimi (ton)	6
Tablo 2.3 Türkiye toplam balık üretimi ve % oranları	7
Tablo 2.4 Balıklarda Belirlenen Bakteriyel Hastalıklar... ..	10
Tablo 2.5 Su ürünleri yetiştiriciliğinde farklı probiyotik Uygulamaları	17
Tablo 2.6 Balıklarda için probiyotik Özellikleri ile Kullanılabilecek Bakteri Türleri.....	19
Tablo 2.7 Su ürünleri yetiştiriciliğinde ticari olarak kullanılan probiyotik ürünler.....	22
Tablo 3.1 İzolatların elde edildiği numunelerin alındığı yerler.....	24
Tablo 3.2 Mc. Farland Standardı BaCl ₂ ve H ₂ SO ₄ Karışım Oranlarına Göre Yaklaşık Hücre Sayısı.....	33
Tablo 3.3 Enzim aktivitelerinin petri plağında ölçülen şeffaf zon çaplarına göre değerlendirilmesi	44
Tablo 3.4 Üretim Optimizasyonu için Denenen Üç Farklı Besiyeri.....	54
Tablo 4.1 En az bir patojen tür için antibakteriyel aktiviteye sahip olan <i>bacillus</i> izolatları.....	57
Tablo 4.2 L. garvieae ve Y. ruckeri patojen test bakterileri için antibakteriyel aktivite sonuçları.....	60

TABLOLAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi yorumlama tablosu.....	63
Tablo 4.4 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları	66
Tablo 4.5 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarına göre dağılımı.....	67
Tablo 4.6 Antibiyotik dirence sahip <i>Bacillus</i> izolatları.....	68
Tablo 4.7 Antibiyotik duyarlılık için farklı yorum kriterleri	69
Tablo 4.8 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının mide sıvısı toleransı	70
Tablo 4.9 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının Mc. Farland 0,5'e göre başlangıç canlı hücre sayısı (kob/ml).....	73
Tablo 4.10 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının asidik pH'lardadördüncü saat sonunda % canlılık değerleri.....	74
Tablo 4.11 <i>Bacillus</i> izolatlarının %BATS değerlerinin belirlenmesinde kullanılan absorbans ölçümleri.....	75
Tablo 4.12 <i>Bacillus</i> izolatlarının safra toleransı sonuçları (3 ve 6 saatlik inkübasyonlar için).....	78
Tablo 4.13 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde proteaz aktivitesi.....	81
Tablo 4.14 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde amilaz aktivitesi.....	84
Tablo 4.15 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde lipaz aktivitesi.....	86

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.16 İncelenen <i>Bacillus</i> izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde selülaz aktivitesi.....	89
Tablo 4.17 <i>Bacillus</i> izolatlarının Caco-2 hücrelerine tutunma kabiliyetleri...	90
Tablo 4.18 <i>Bacillus</i> izolatlarının biyofilm üretim testi sonuçları	94
Tablo 4.19 Probiyotik potansiyele sahip <i>Bacillus</i> izolatlarının in vitro deneme sonuçları	98
Tablo 4.20 <i>Bacillus</i> Ö-4-68 izolatının zamana göre canlı hücre sayıları (kob/mL).....	99
Tablo 4.21 <i>Bacillus</i> Ö-4-68 izolatının üç farklı üretim ortamında biyokütle üretimi sonuçları.....	100
Tablo 4.22 <i>Bacillus</i> Ö-4-68 izolatının üç farklı azot kaynağı için biyokütle üretimi sonuçları.....	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
rpm	devir sayısı/dakika (revolution per minute)
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
pH	Hidrojenin gücü
µm	Mikrometre
°C	Santigrat derece
ppm	Milyonda bir
nm	Nanometre
mg	Miligram
L	Litre
g	Gram
%	Yüzde
dk	Dakika
w	Ağırlık (Weight)
v	Hacim (Volume)
sn	Saniye
mm	Milimetre

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cm	Santimetre
km	Kilometre
µm	Mikrometre
kob	Koloni oluşturan birim
α	Alfa
U	Unit
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DNA	Deoksiribo nükleik asit
UV	Ultraviyole
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AB	Avrupa Birliği
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate Buffer Solution)
Abs	Absorbans
SS	Standart Sapma

1. GİRİŞ

Üç tarafı denizlerle çevrili, bir yarımada ülkesi olarak bilinen ülkemizde de tüm dünyadaki gibi su ürünleri yetiştiriciliğine verilen önem geçtiğimiz çeyrek yüzyıl öncesinde çok fazla değildi. Günümüzde bu alanda yapılan çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Ancak su ürünleri üretiminin artması; çevresel etkileşimlerle birlikte bakteriyel, viral, fungal ve paraziter hastalıklarda artışı da beraberinde getirmiştir. Bu sorunların önüne geçilebilmesi için çeşitli çözüm yolları uygulanmaktadır. Bu durum bir yandan canlının büyümesine yardımcı olan, diğer yandan sucul hastalıklara karşı canlıları korumak ve bu hastalıkların kontrolünü sağlamak amacıyla antibiyotik, pestisit ve diğer kimyasal maddelerin kullanımında artışlara sebep olmuştur. Ancak sucul hastalıklara karşı koruyucu olarak antibiyotiklerin kullanılması, hem insan ve çevre sağlığı açısından hem de antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların gelişmesi yönüyle tehlike arz etmektedir. Belirtilen bu tehlikelerin önüne geçebilmek için, ekolojik ve çevreye zarar vermeyen, yeni alternatif koruyuculara gerek duyulmuştur (Akbulut ve Ketin, 2001). Bu amaçla yapılan araştırmalar ve çalışmalar sonucunda, en önemli ve etkili çözüm yolunun probiyotik kullanımı olduğu anlaşılmıştır.

Probiyotikler, konakçı canlının bağırsağındaki yararlı mikrobiyal popülasyonu arttıran yem katkılarıdır. Ayrıca probiyotikler sindirim sisteminin düzenlenmesine, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine, strese dayanıklılığın artırılmasına, büyümenin ve üretimin desteklenmesine yönelik olumlu etkilere de sahiptir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde oluşan sorunları en aza indirebilmek için, özellikle balıkların üretiminde, ürün miktarının ve kalitesinin artırılması, balık üreme ve gelişmesinin teşvik edilmesi, balıklarda meydana gelen hastalıkların engellenebilmesi, bu hastalıkların kişilere taşınmasının önüne geçilebilmesi, ürün lezzetinin korunması/arttırılması vb. alanlarda balık probiyotiklerinin kullanılması en etkili çözüm olarak bilinmektedir. Bu amaçla, bakteri (*Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*) ve fungus (*Saccharomyces cerevisiae* gibi) türlerinden hazırlanan ticari yerli ürünlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir (Altıntaş, et al.,2016). *Bacillus* türleri probiyotik olarak en fazla kullanılan bakterilerdendir.

Dünya üzerinde çok fazla çeşitlilikte mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar patojen olabileceği gibi diğer canlılar için yararlı mikroorganizmalar da olabilir. Balıkların ekosisteminde de balıklar için ‘yarar sağlayan’ ve ‘zarar veren’ olarak iki gruba ayrılmış mikroorganizmalar bulunmaktadır. Sağlıklı bir balık bünyesinde için bu iki grup dengeli bir şekilde dağılım göstererek, yarar sağlayıcı mikroorganizmalar floradaki çoğunluğu oluşturmaktadır (Çakmakçı ve ark., 2002). Probiyotik grubu bakteriler, canlıların bağırsak florasında yer alan ve canlıya yarar sağlayan mikroorganizmalardır. Bu açıdan probiyotikler, insan ve hayvan beslenmesinde fonksiyonel gıda amaçlı olarak ve büyümeyi teşvik edici ve canlıyı koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Probiyotik bakteriler gastrointestinal bölgedeki potansiyel patojenlerle mücadele ederek;

- İmmün sistemin ve vücut kompozisyonunun geliştirilmesinde,
- Sindirimi düzenleyerek hastalıklara karşı direncin artırılmasında,
- Büyüme özelliğinin geliştirilmesinde,
- Mide ve bağırsak yapılarının iyileştirilmesinde,
- Balıklarda görülebilen şekil bozukluklarının azaltılmasında,
- Su kalitesinin ve yemden yararlanma potansiyelinin arttırılmasında kullanılabilmektedirler (Moriarty, 1990, EL-Haroun, et al., 2006, Gatesoupe, JF., 2007, Bagheri, et al., 2008).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, sucul hastalıklara sebep olan faktörlerin varlığı üretimde verim kayıplarına yol açmaktadır. Bu sorunların önüne geçilebilmesi için kullanılan bir yöntemi olan probiyotikler sucul canlıyı hem bu hastalıklara karşı korumada hem de üretimde verim kayıplarının önüne geçilmesinde önemli alternatiflerden bir tanesidir (Meunpol, et al., 2003). Ayrıca yetiştiriciliğe yönelik uygulamalarda antibiyotik ve bazı kimyasalların kullanımının önüne geçilebilmesi için probiyotiklerin kullanımının yaygınlaştırılması hedeflenmektedir.

Probiyotiklerin su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılması farklı sektörlerdeki hayvansal üretilere kıyasla daha yeni bir uygulamadır ve bu sektör için kullanılan probiyotikler diğer hayvansal üretimler için kullanılan probiyotiklerden farklı değildir. Ayrıca, kullanılan bu probiyotiklerin su ürünleri yetiştiriciliği

üzerindeki etkisi ile ilgili bilimsel çalışmalar da yeterli seviyede değildir. Bu eksiklikler sebebiyle, üreticiler bu ürünleri rastgele kullanmaktadır. Bu sebeple su ürünleri yetiştiriciliği sektörüne özgü probiyotik ürünlerin ülkemize kazandırılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada ülkemiz orijinli gen kaynaklarından izole edilmiş, yerli *Bacillus* izolatlarının öncelikle balık patojenlerine karşı antibakteriyel aktivitesinin taranması ile optimal büyüme pH'sı, safra toleransı, hidrofobik çözügene adhezyon, mide sıvısı toleransı, enzim aktivitesi, antibiyotik duyarlılığı, biyofilm oluşturma, patojenite vb. gibi probiyotik potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Daha sonra en iyi probiyotik özellikleri gösteren bir *Bacillus* izolatının laboratuvar ölçeğinde kitlesel üretim optimizasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Böylelikle en iyi probiyotik özelliği gösteren yerli bir *Bacillus* izolatından yüksek canlı hücre sayısına sahip biyokütle üretiminin yapılması ile ticarileşme potansiyeline sahip probiyotik biyopreparat elde edilmesi konusunda önemli veriler sağlanmış olacaktır. Bu biyopreparatın ticarileştirilmesiyle de özellikle ihracat potansiyeline sahip kaliteli su ürünlerinin üretiminde ülke ekonomisine çok büyük katkılar sağlanacağı ümit edilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Tanımı ve Önemi

Su ürünleri yetiştiriciliği, suda yaşayan organizmaların yetiştirme sürecine dışarıdan bir etki olarak müdahale edilip, bu organizmaları geliştirmek için yapılan çalışmalara denir. Balıkçılıkla karşılaştırıldığında, bu aktivite insan tüketimi, endüstri veya spor balıkçılığı için kullanılan türlerin üretiminde seçici bir artışa izin vermektedir. Su ürünleri popülasyonlarının kontrolsüz ve aşırı avlanması nedeniyle, özellikle günümüzde su ürünleri yetiştiriciliği dünya çapında büyük önem taşıyan bir ekonomik faaliyet haline gelmiştir. Bu sektörün; dünya gıda üretimine, endüstriyel ve farmasötik kullanım için hammaddelerin eldesine son yıllardaki katkısı önemli ölçüde artmıştır (Cruz, et al., 2012). Su ürünleri, gıda güvenliğini artırmak için yüksek kaliteli hayvansal protein sunması ve daha ekonomik bir sektör olması sebebi ile büyümesini diğer endüstri sektörlerine göre daha hızlı arttırmıştır. Küresel olarak, sazan balıkları, %72'likten fazla bir oranla toplam tatlı su balığı üretimine katkıda bulundukları için bu sektörde önemi en yüksek görülen tür olarak bilinmektedir (Swapna et al., 2010).

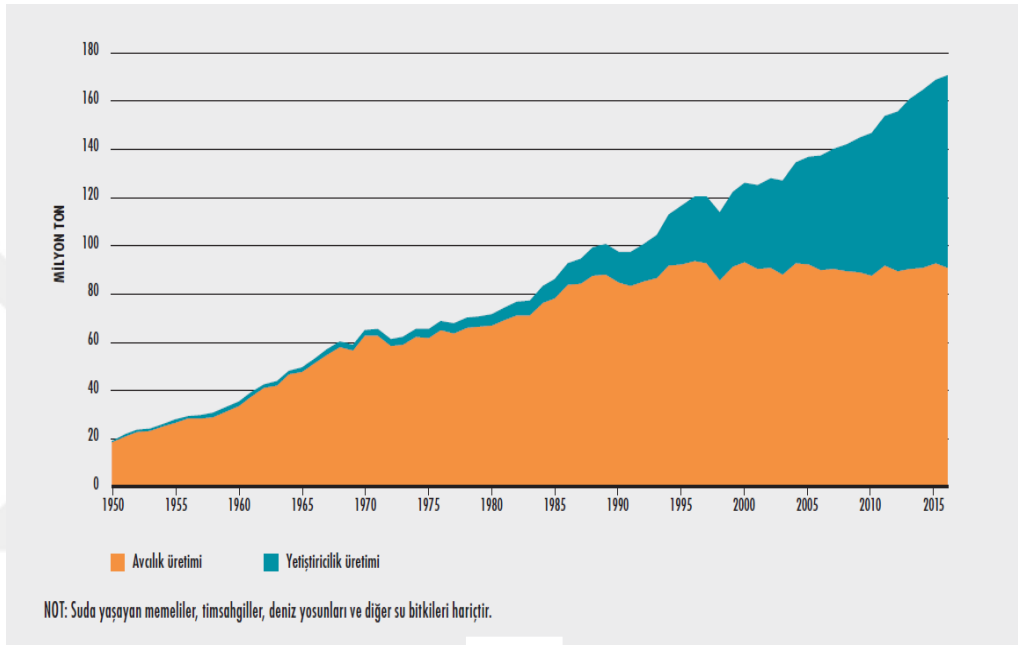
2.2. Dünyada Su Ürünleri Yetiştiriciliğinin Önemi

Dünya Su Ürünleri (2012), yaptığı istatistiki araştırmalar sonucunda; 2006-2011 arasındaki 5 yıllık süreçte su ürünleri yetiştiriciliğinden elde edilen küresel balık üretiminin, yüzde 30'dan da fazla artarak 47,3 milyon tondan 63,6 milyon tona çıktığını belirtmiştir. Av balıkçılığının kontrolsüz bir şekilde yapılması ve çevre kirliliğine yol açması sebebiyle, su ürünlerinin elde edilmesinde su ürünleri yetiştiriciliği, av balıkçılığını geri planda bırakmaya başlamıştır (Cruz, et al., 2012).

Bahsi geçen büyüme oranı birkaç faktörden kaynaklanmaktadır:

1. Birçok balıkçılık, av balıkçılığı vb., maksimum sürdürülebilir noktaya ulaşması,
2. Gıdaların güvenliği ile ilgili tüketicilerde oluşan endişeler,
3. Yüksek kaliteli, yüksek protein kaynağı sağlayan, sağlıklı ve düşük kalorili gıda sektörü talebi,
4. Sucul üreme ile karbondioksit emisyonuna minimum değerlerde etki (Timmons et al., 2002; FAO, 2012).

Su ürünleri yetiştiriciliği, M.Ö. 475 yılında başlayan uzun bir geçmişe sahiptir. Su ürünleri yetiştiriciliği günümüz için kazançlı bir endüstri olarak görülmektedir. Su ürünleri ticaretine ilişkin olarak; 195 ülke ihracat yaparken, 199 ülkede ithalat yapmaktadır. Su ürünleri ithalatının %85'ini gelişmiş ülkeler gerçekleştirirken, toplam ithalatın %25'i Japonya tarafından yapılmaktadır. AB'nin ise su ürünleri talebini karşılamada dışa bağımlılığı artmıştır ve Dünya ithalatından AB'nin aldığı pay %35 olmuştur (Timmons et al., 2002; Cressey, 2009).



Şekil 2.1 Dünya avcılık ve yetiştiricilik üretimi, (FAO, 2018)

Şekil 2.1’de görüldüğü gibi 90’lı yıllarda önem kazanan yetiştiricilikle elde edilen su ürünlerinin miktarı günümüzde de artmaya devam etmektedir.

2.3. Türkiye’de Su Ürünleri Yetiştiriciliğinin Önemi

Türkiye gibi gelişmekte olan ve az gelişmiş olan ülkelerin ortak sorunu, üretimdeki verimin daha düşük olması, beslenme ve tüketim alışkanlıklarını da olumsuz etkilemektedir. Türkiye’de temel ihtiyaç olan beslenme için tüketicilerin talebi bitkisel kaynaklı ürünlere doğru artmaktadır. Bunun sebebi hayvansal kaynaklı besinlerin nispeten daha pahalı olmasıdır.

Türkiye’de ortalama olarak günlük kişi başına 104 g toplam protein tüketilirken, bu tüketimin %70’i bitkisel, %30’u hayvansal kaynaklıdır (FAO,

2015). Bu durum gelişmiş ülkelerde ise Türkiye'nin zıttı bir şekilde hayvansal kaynaklı ürünler yönünden daha yüksektir. Türkiye'de yeterli/dengeli beslenme için eksik olan ve artırılması gereken tüketim maddesi hayvansal kaynaklı proteindir (Sarıözkan ve Akçay, 2014). Çünkü ülkeler bazında gelişmişlik değerlendirilmesi kriterleri arasında hayvansal kaynaklı tüketim de bir madde olarak yer almaktadır. Et, yumurta, yoğurt, süt ve balık en bilinen hayvansal protein içeren besinlerdir. Üç tarafı sularla çevrili ve 8.333 km'lik kıyı şeridinde sahip olan nehir, göl ve barajlar da dikkate alındığında 25 milyon hektarlık zengin bir su kaynağı varlığı olan Türkiye'de balıkçılık hayvansal kaynaklı besin maddeleri arasında önemli bir fırsat ve kaynak olarak kullanılabilirdir. Su ürünleri yetiştiriciliği, dünyada büyüme hızı ile dikkat çeken bir gıda üretim sektörü olarak saptanmış olup, bu sektörün tüm dünyadaki gelişimi her gün daha da artmaktadır (Subasinghe vd., 2009).

Tablo 2.1 Türkiye'nin su potansiyeli (Aydın ve ark., 2006)

Üretim Alanı	Adet	Uzunluk (Km)	Alan (ha)
Göl	200	-	906118
Baraj	206	-	342377
Gölet	953	-	15500
Akarsular	33	177714	-
Denizler	-	8333	24607200
Toplam Alan	1392	186047	25871195

Türkiye'de su ürünleri yetiştiriciliği yıllık yaklaşık olarak %10 büyümektedir. 2005 yılı itibari ile yetiştiricilikteki toplam üretim miktarı kayda değer bir artış göstererek neredeyse iki katına çıkmıştır. En yüksek üretim artışı alabalıkta (%130) daha sonra çipura (%100) ve levrekte (%52) gerçekleşmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 Türkiye'de yetiştiricilik ile gerçekleştirilen balık üretimi (ton), (TÜİK,2015)

Balık Türü	Yıllar									
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Alabalık	49282	57659	61173	68649	80 886	85 244	107936	114569	128059	113593
Çipura	27634	28463	33500	31670	28 362	28 157	32 187	30 743	35 701	41 873
Levrek	37290	38408	41900	49270	46 554	50 796	47 013	65 512	67 912	74 653

Tablo 2.2 Türkiye’de yetiştiricilik ile gerçekleştirilen balık üretimi (ton) (devam)

Diğer	4071	4413	3300	2597	2 927	2 944	1 654	1 586	1 721	5 014
Toplam	118277	128943	139873	152186	158729	167141	188790	212410	233393	235133

Dünyada 2013 yılında toplam 162,8 milyon ton su ürünleri üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu üretimin, 92,6 milyon tonu (% 56,9) avcılık ve 70,2 milyontonu (% 43,1) yetiştiricilik yoluyla elde edilmiştir (TÜİK, 2015).

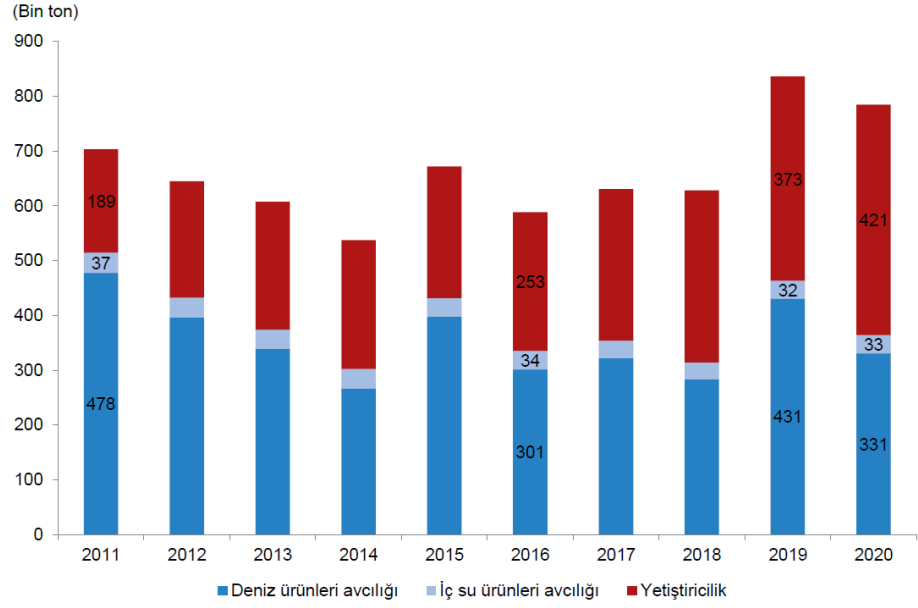
Mevcut üretim değerleri için Türkiye (Tablo 2.3) Avrupada altıncı sırada yer alırken, Dünyada otuzlu sıralarda yer almaktadır. Türkiye’deki yetiştiricilik yoluyla yapılan üretimde devamlı artış görülmektedir.

Tablo 2.3 Türkiye toplam balık üretimi ve % oranları, (GTHB,2015).

Yıllar	Yetiştiricilik (%)	Avcılık (%)	Toplam (ton)
2007	21.3	78.7	658 074
2008	27.8	72.2	547 846
2009	29.4	70.6	539 365
2010	29.5	70.5	566 797
2011	30.4	69.6	621 036
2012	40.2	59.8	528 046
2013	44.2	55.8	528 560
2014	50.4	49.6	466 191

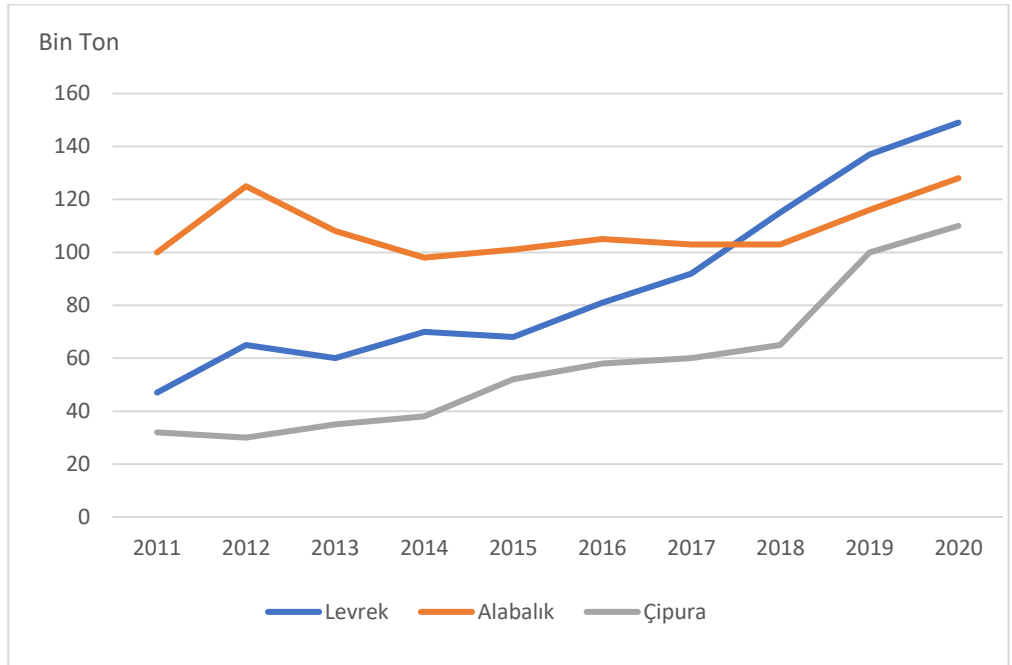
2011-2020 yılı TÜİK verilerine göre;

Su ürünleri üretimi 2020 yılında bir önceki yıla göre % 6,1 azalıp 785 bin 811 ton olarak gerçekleşmiştir. Üretimin % 53,6’sını su ürünleri yetiştiriciliği ürünleri oluştururken, % 37,1’ini avcılık yoluyla elde edilen deniz balıkları, % 4,2’ini avcılık yoluyla elde edilen iç su ürünleri ve % 5’ini avcılık yoluyla elde edilen diğer deniz ürünleri oluşturmaktadır. Toplam üretimin 364 bin 400 tonu avcılık yoluyla yapılan üretimler oluştururken, 421 bin 411 tonu ise yetiştiricilik üretimi ile gerçekleşmiştir. Deniz ürünleri avcılığı bir önceki yıla göre % 23,2 azalmış olup, iç su ürünleri avcılığı % 4,8 artmıştır (şekil 2.2).



Şekil 2.2 Türkiye’de su ürünleri üretimi, 2011-2020, (TÜİK,2020)

2020 yılında, yetiştiricilik yoluyla yapılan üretimin yaklaşık 293 bin 200 tonu denizlerde, 128 bin 240 tonu iç sularda gerçekleştirilmiştir. İç sularda alabalık en önemli balık türü olup yaklaşık 128 bin ton yetiştirilmiştir, denizlerde ise 148 bin 900 ton ile levrek ve 109 bin 750 ton ile çipura alabalığı takip etmiştir.



Şekil 2.3 En çok yetiştiriciliği yapılan balıklar, 2011-2020, (TÜİK,2020)

2.4. Balıkların Mikroflorası

Sağlıklı balıklardan yumurtlama evrelerinde elde edilen yumurtaların neredeyse %99'unun steril olduğu bilinmektedir. Suyu temas eden yumurta kabuğunun suda bulunan bakterilerce kolonize olduğu saptanmıştır (Hansen ve Olafsen, 1999; Ringo ve Birkbeck, 1999). Bu kolonizasyon yumurta gelişimini olumsuz etkilemesinin yanında yumurta içerisinde yer alan embriyonun gelişimini de olumsuz etkilemektedir. Kolonizasyonun artışı ve balık yumurtalarının fiziksel yapısının bozulması arasında doğru orantı olduğu belirlenmiştir. İncelemeler sonucunda suda bulunan patojenlerin bir kısmının yumurta kabuğunda bulunan 'zona radiata' ve 'koriyon' kısımlarını erittiği tespit edilmiştir. Yumurta kabuğundaki glikoproteinlerin, bakterilerin adhezyon ve kolonize olma yeteneği için önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir (Olafsen, 2001). Yumurta kabuğundaki bakteriyel flora ile yumurtadan çıkacak embriyonun arasında da etkileşim olduğu bilinmektedir. Yumurta kabuğundaki flora tarafından sentezlenen, çeşitli metabolitlerin embriyo gelişimini etkilediği bildirilmiştir (Hansen and Olafsen, 1999).

Balıklarda gastrointestinal sistem basit bir kanal şeklindedir, ilk haftalarından itibaren bağırsak gerçekleştirilmesi gereken sindirim fonksiyonlarını tamamlayabilmek için uzar, kıvrımlanarak bir kese haline gelir. Bağırsak hücreleri hızlı bir şekilde, 48-72 saat içinde, çoğalır ve bağırsak yüzeyine yayılır, bağırsak yüzeyi mukozal bir sıvıyla kaplanır. Balıklar larval gelişim döneminde sindirim sisteminin fonksiyonel ve anatomik özellikleri gelişimini tamamlar (Ringo and Gatesoupe, 1998).

Balıkların gastrointestinal mikroflorası için yapılan birçok çalışma sonucunda; Balıkların bağırsak yüzeyinde yaklaşık 10^5 kob/g seviyesinde anaerobik bakteri, 10^8 kob/g seviyesinde aerobik heterotrofik bakteri tespit edilmiştir. Bu sayıların mevsim değişikliğine ve gastrointestinal sistemdeki değişik bölgelere bağlı olarak farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Austin ve Al-Zahrani, 1988). Yapılan birçok çalışmanın sonucuna göre, balıkların içinde yaşadıkları su örneklerinin mikroflorasına bağlı olarak bağırsak mikroflorasının düzenlendiği bildirilmektedir. Deniz balıklarının sağlıklı bağırsak floralarından

izole edilen bakteriler arasında taksonomik açıdan en büyük grubu *Vibrio*, *Pseudomonas* ve *Achromobacter* oluşturmakta, bu grupları *Micrococcus*, *Bacillus* ve *Enterobacteriaceae* izlemektedir (Vine et al., 2004).

2.5. Balık Hastalıkları

Çevre kirliliği birçok alanda olduğu gibi balık yetiştiriciliği alanını da olumsuz yönde etkileyen bir etmen olmuştur. Balık yetiştiriciliğinin ana bileşeni olan su kaynaklarının kirlenmesine bağlı olarak genellikle bakteriyel kökenli olan balık hastalıklarında artışlar meydana gelmiştir.

Uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda dünya genelinde su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe tespit edilen patojen bakteriler; *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Flexibacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Yersinia spp.*, *Renibacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, gibi türlerdir. Günümüzde bu türlere ek olarak *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus difficile*, *Streptococcus iniae*, *Vagococcus salmoninarum*, *Lactococcus piscium* ve *Lactococcus garvieae* gibi türlerin de balık hastalıkları ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Kum et al., 2004).

Bu patojenlerin yol açtığı balık hastalıklarının tedavisinin maliyetinin yüksek olması, tedavi olarak antibiyotiklerin kullanımının artmasına yol açmıştır. Kontrolsüz ve bilinçsizce antibiyotik kullanımına bağlı olarak patojenik ve nonpatojenik mikroorganizmalara karşı direnç oluşumları gözlemlenmeye başlamıştır. Bu antibiyotik direncinin tüketiciler olarak hayvan ve insanlara aktarılması ve bunun bir tehdit oluşturması sebebiyle hastalığın tedavi edilmesinden ziyade hastalığın nasıl önlenebileceği, hastalıktan nasıl korunabileceğinin üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Tablo 2.4 Balıklarda belirlenen bakteriyel hastalıklar

Bakteriler	Hastalığın Görüldüğü Balıklar	Hastalık
<i>Aeromonas spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Vibrio spp.</i>	Tatlı Su Balıklarında Deniz Balıklarında	Hemorajik Septisemi
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Akvaryum Balıklarında, Tatlı Su Balıklarında, Deniz Balıklarında	Akvaryum Balığı Ülseri (Goldfish Ulcer)

Tablo 2.4 Balıklarda belirlenen bakteriyel hastalıklar (devam)

<i>Aeromonas spp.</i>	Akvaryum Balıklarında, Tatlı Su Balıklarında, Deniz Balıklarında	Furunküloz (Furunculosis)
<i>Vibrio spp., Listonella, Photobacterium</i>	Akvaryum Balıklarında, Tatlı Su Balıklarında, Deniz Balıklarında	Vibriyozis (Vibriosis)
	Akvaryum Balıklarında, Tatlı Su Balıklarında, Deniz Balıklarında	Edwardselliozis
<i>Photobacterium damsela</i> <i>subsp. piscicida</i>	Akvaryum Balıklarında, Tatlı Su Balıklarında, Deniz Balıklarında	Fotobakteriyozis
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Tatlı Su Balıklarında, Deniz Balıklarında	Bakteriyel Böbrek Hastalığı
<i>Tenibaculum maritimum</i>	Deniz Balıklarında	Tenasibasillozis
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Tatlı Su Balıklarında	Epiteliyozis (Epitheliocystis)
<i>Streptococcus parauberis, S. iniae, S. difficilis, L. garvieae, Listonella piscium, Vagococcus salmoninarum, Carnobacterium piscicola</i>	Akvaryum Balıklarında, Tatlı Su Balıklarında	Streptokokkozis

2.5.1. Balıklarda Gözlemlenen Başlıca Bakteriyel Hastalıklar

2.5.1.a. Vibriozis

Vibriozis, sıklıkla tatlı su balıklarında görülen, *V. anguillarum*'un türü bakterinin sebep olduğu bilinen en önemli bakteriyel enfeksiyonlardan bir tanesidir (Demircan ve Candan 2006, Woo and Bruno 2003). Hastalığa sebep olan bakteri türü; *V. Anguillarum*, Vibrinocea familyasında vibrio cinsindendir (Şekil 2.7). Mikroorganizmanın morfolojik yapısı genellikle düz veya virgül biçiminde, gram negatif, hareketli, sporsuz, kapsülsüz, aerobik veya fakültatif anaerobik olarak tanımlanır. Mikroorganizma, solungaçlardaki açık bölgelerden, deriden ve sindirim sisteminden balıklara girmektedir. Doğal koşullar altında 7-10 günlük bir inkübasyon süresi olan hastalığın, belirtileri ise birçok bakteriyel hastalıkla benzerlik göstermektedir (Arda ve ark 2002).



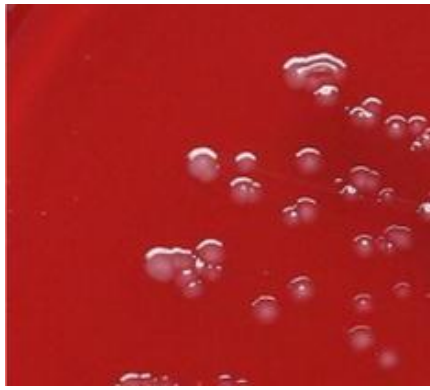
Şekil 2.4 *Vibrio anguillarum*'un agar üzerindeki morfolojik görüntüsü



Şekil 2.5 *Vibrio anguillarum*'un balıkta oluşturduğu etkinin görüntüsü

2.5.1.b. Streptokokkozis

Su ürünleri yetiştiriciliğine verilen önemin artması ve bu sektörün yaygınlaşmasıyla beraber, streptokokal enfeksiyonlarda artarak, yetiştiriciliği ekonomik anlamda olumsuz etkilemiştir (Mata et al., 2004). *L. garvieae* tarafından gözlemlenen streptokokkozis tatlı suda üretilen balıklar için rapor edilmiştir. *L. garvieae*, farklı çevrelerde yaşayan pek çok balıkta oldukça ölümcül etkileri olduğu saptanan ve ayrıca insanlardan da izole edildiğinin bilinmesi ile bu bakteriye ait hastalığın önemini oldukça gün yüzüne çıkartmıştır Eldar et al.,1999). Bu bakteriyel hastalık sıklıkla su sıcaklığının 20 °C'nin üzerinde olduğu durumlarda hızlı bir yayılım göstermektedir (Arda ve ark 2002). Streptokokkozis farklı balıklarda (alabalık, sazangibi) deride kararma, bilateral ve ünilateral ekzoftalmus, operkulumlarda ve yüzgeçlerin tabanında hemorajiler, hemorajik septisemi, bağırsak, dalak, karaciğer ve beyinde konjesyon, vücut yüzeyinde değişik büyüklükte lezyonlar ve ülserasyonlarla karakterize edilen bakteriyel bir balık hastalığıdır (Diler ve ark 2002).



Şekil 2.6 *L. Garvieae*'nin kan agar üzerindeki morfolojik görüntüsü



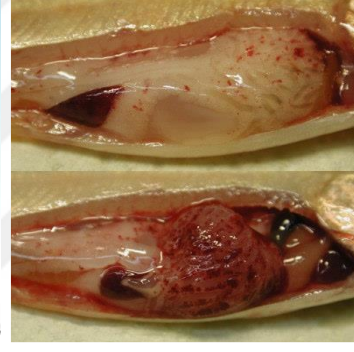
Şekil 2.7 *L. Garvieae*'nin balıkta oluşturduğu etkinin görüntüsü

2.5.1.c. Yersiniozis

Yersiniozis, *Yersinia ruckeri* sebep olduğu sepsis ile seyreden ve ergin döneme kıyasla yavrularda sıklıkla rastlanan ve yavru ölümlerine sebep olan bulaşıcı bakteriyel bir hastalıktır. *Yersinia ruckeri*, gram negatif, hareketli, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik bir özelliğe sahiptir (Arda ve ark 2002). Enfeksiyonun en spesifik belirtileri arasında rengin koyulaşması, vücudun dış yüzeyinde ve yüzgeçlerin tabanında kanamalar, karında şişkinlik, yüze yakın yüzmeye, hareketin kısıtlanması ve özellikle küçük balıklarda anemiden dolayı solungaçlarda solgunluğun dikkat çektiği belirtilmektedir (Carson ve Wilson 2002).



Şekil 2.8 *Y. Ruckeri*'nin kan agar üzerindeki morfolojik görüntüsü



Şekil 2.9 *Y. Ruckeri*'nin balıkta oluşturduğu etkinin görüntüsü

2.6. Balık Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Başlıca Yöntemler

Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde genellikle su kalitesinin kötü olması gibi elverişsiz koşulların yok edilmesi tüm enfeksiyonun kontrolü için gerekli olsa da çoğu bakteriyel hastalıkların tedavisinde antibakteriyel, antiseptik ve dezenfektan kullanımına da gerek olmaktadır. Ancak antibakteriyel seçimi ve kullanımının gerekli testler ve denemelerin yapılmasının ardından gerçekleştirilmelidir (Reed and Francis-Floyd 1996).

Günümüzde, birçok patojen bakterinin sebep olduğu balık hastalıklarının tedavisinde uygulanan farklı yöntemler bilinmektedir. Bunlar; kemoterapetik ajanların kullanımı, aşılama uygulamaları ve antibiyotik kullanımı olarak sıralanabilir. Ancak bu yöntemlerin kullanımı sağlıklı bağırsak florasını da bozarak balıklarda stres oluşmasına sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra kontrolsüz

ve bilinçsiz olarak yapılan ilaç kullanımı; nefrotoksitite, büyüme geriliği, antibakteriyel direncin oluşması, balıklarda kalıntı oluşturarak tüketici olan hayvan ve insanlara bu zararlı etmenlerin aktarılması gibi birçok olumsuzluklara yol açmaktadır. Oluşan antibakteriyel direnç halk sağlığı açısından da büyük problemlere yol açmaktadır. Sucul ortamda oluşan dirençli bakteriler direnç genleri için rezervuar olarak görev yapabilir ve bu genleri insan patojenlerine yayabilirler. Bu durum sucul çevreden insanlara horizontal gen transferi ile antibakteriyel direncin indirekt yayılması olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra vibrio gibi bazı sucul patojenler insan patojeni de olabilirken, diğer bakteriyel türler insanlarda fırsatçı patojenler olarak yer edinebilmektedir (Heuer et al., 2009).

Antibiyotiklere dirençli bakterilerin gelişmesi, çevreden insana çok büyük bir bulaşma riski anlamına gelmektedir. Ayrıca antibiyotik kullanımı, mide-bağırsak sistemindeki mikroorganizmalar için seçici davranmayıp yararlı florayı da yok etmektedir, son tüketici olarak insanı etkileyen organizmalarda da birikmektedir. Dokularda antibakteriyel ilaç kalıntılarının varlığı alerjilere, toksik etkilere, bağırsak mikrobiyal florasında değişikliklere de neden olabilmektedir. İnsanlar tarafından tüketilen gıdalardaki kloramfenikol kalıntıları, kemik iliği hastalıklarına yol açan aplastik anemiye bile neden olabilmektedir. Nitrofuran antibiyotiklerin kansere ve diğer birçok hastalığa neden olduğu bilinmektedir. Bu sorunlardan dolayı, ticari açıdan önemli hastalıklara neden olan patojenleri kontrol etmek için ve aynı zamanda çevre sağlığının da olumsuz etkilenmesinin önüne geçilmesi için büyük bir arayış başlamıştır. Bu arayışlar içinde en etkili ve zararsız yöntem olarak probiyotik kullanımının olacağı saptanmıştır (Shanmugam et al., 2011).

2.7. Balık Hastalıklarının Tedavisinde Probiyotikler

Probiyotik, en temel haliyle “konakçı canlının bağırsak mikrobiyal dengesini sağlayan, faydalı bir şekilde etkileyen canlı mikrobiyal yem/gıda takviyesi” olarak tanımlanmaktadır (Fuller, 1989). Verschuere et al. (2000a), "probiyotik" terimine yeni bir tanım ekleyerek "konakçı ile ilişkili olup ortamdaki mikrobiyal topluluğu değiştirerek, hastalığa karşı konak tepkisini artırarak veya çevre ortamının kalitesini artırarak, yemin daha iyi kullanılmasını sağlayacak ya da besin değerini

artıracak konak üzerinde yararlı bir etkiye sahip olan canlı mikrobiyal yardımcı madde'' olarak önermiştir. Son zamanlarda, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ile probiyotikleri “yeterli miktarlarda kullanıldığında konakçı canlıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalar” olarak tanımlamıştır (FAO/WHO, 2002). Bir başka makale de ise, "probiyotik" teriminin yenilenmiş bir tanımı "patojenik bakterilerin çoğalmasını önleyerek, faydalı bakterilerin büyümesini ve gelişmesini teşvik ederek konakçının bağırsak mikrobiyotasını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalar içeren bir ürün" olarak önerilmiştir (Buruiană et al., 2014).

Probiyotiklerin su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanımında birçok faydası mevcuttur. Bu faydalar tek tek ya da tek bir probiyotik için kombinasyonlar halinde gözlemlenebilir.

Probiyotiklerin başlıca faydalarını sıralamak gerekirse;

- Antagonistik bileşiklerin üretimi yoluyla patojenin inhibisyonu,
- Bağırsaklardaki bağlanma bölgeleri için rekabet,
- Besinler için rekabet,
- Patojenlerin enzimatik aktivitesinin değiştirilmesi,
- İmmün sistemi uyarıcı fonksiyonlar,
- Yem sindiriminde kolaylık sağlama,
- Yemden yararlanmayı iyileştirme gibi besinsel faydaları içerir.



Şekil 2.10 Probiyotiklerin balıklara sağladığı yararlar, (Sayes et al., 2018).

Probiyotiklerin yüksek seviyede etkinlik sağlayabilmeleri için belirli özelliklerin dikkate alınması gerekmektedir.

Bir probiyotiğin başlıca sahip olması gereken özellikler;

- Gastrointestinal sistem içinde tutunması ve kolonize olması,
- Yüksek sayılarda replike olabilme yeteneğine sahip olması,
- Antibakteriyel aktiviteye sahip olması,
- Gastrointestinal sistemin asidik ortamından etkilenmiyor olması,
- Safra sıvısından olumsuz etkilenmiyor olması,
- Antibiyotik dirençliliğinin olmaması,

gerektiği şekilde sıralanabilir (Kesarcodi-Watson et al., 2008).

Bu belirtilen özelliklere sahip mikroorganizmalar su ürünleri yetiştiriciliğinde potansiyel birer probiyotik olarak görülürler.



Ö
N
E
M
D
E
R
E
C
E
S
İ

-Antibiyotik Direnç Genlerinin Olmaması

-Patojen Antagonizesi

- Rekabetçi dışlama: bağırsak sistemini kolonize etmeye yardımcı olarak kolon ve mukozal hücre hatlarına bağlanabilme yeteneğine sahip olma.

-İnhibitör metabolitler üretme yeteneği: proteaz, amilaz, selülaz ve lipaz gibi.

- **Safra ve Düşük pH Toleransı**: probiyotiğin giriş yollarından biri gıdadır.

- Hızlı büyüme

-Yapışma kapasitesi ve yapışma bölgeleri için rekabet kabiliyeti

-Konukçunun immün yanıtını geliştirme yeteneği: Bir patojen vücuda girdiğinde, adaptif bağışıklık sistemi (B hücresi ve T hücresi tepkileri) ve kompleman sistemi aktive olur. Mukoza yüzeyine tutunma üzerine probiyotik, balığın mukozasının bağışıklığını modüle eder. Balık bağışıklık sistemindeki probiyotiklerin kesin mekanizması/çalışma yolu bugüne kadar belirsizdir

-Temel besinleri desteklemek: Vitaminler ve enzimler gibi

- Üreme performansını ve doğurganlığı iyileştirmek için sinyal yollarında yer alan nöropeptitlerin düzenlenmesi

- Probiyotik karışımını uygulamak için iyi etkileşim: Probiyotik türlerinin çeşitliliği, bireyselden daha fazla fayda sağlayabilir.

- Depolama koşullarında canlılık, (Sayes et al., 2018).

Tablo 2.5 Su ürünleri yetiştiriciliğinde farklı probiyotik uygulamaları, (Cruz, et al.,2012)

Kullanım Amacı	Kullanılan Probiyotik	Uygulamanın Yapıldığı Sıcaklıklar
Büyümenin Teşviki	<i>Bacillus</i> sp. S11 <i>Bacillus</i> sp. <i>Carnobacterium divergens</i> <i>Alteromonas</i> CA2 <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> AR21 <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptomyces</i> <i>L. casei</i> <i>Bacillus</i> NL 110, <i>Vibrio</i> NE 17 <i>Bacillus coagulans</i>	<i>Penaeus monodon</i> Catfish <i>Gadus morhua</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Scophthalmus maximus</i> <i>Xiphophorus helleri</i> <i>Poeciliopsis gracilis</i> <i>Macrobrachium rosenbergii</i> <i>Cyprinus carpio koi</i>
Hastalık (Patojen) Kontrolü	<i>Bacillus</i> sp. <i>Enterococcus faecium</i> SF 68 <i>L. rhamnosus</i> ATCC53103 <i>Micrococcus luteus</i> A1-6 <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>P. fluorescens</i> AH2 <i>Pseudomona</i> spp. <i>Roseobacter</i> sp. BS. 107 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>Phaffia rhodozyma</i> <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>V. fluvialis</i> <i>Tetraselmis suecica</i> <i>Carnobacterium</i> sp. Hg4-03 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bacillus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactococcus lactis</i>	Penaeids <i>Anguilla anguilla</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Scallop larvae</i> <i>Litopenaeus vannamei</i> Salmonids <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Salmo salar</i> <i>Hepialus gonggaensis</i> larvae <i>Clarias gariepinus</i> <i>Farfantepenaeus brasiliensis</i> <i>Epinephelus coioides</i>
Sindirimin İyileştirilmesi	<i>L. helveticus</i> <i>Bacillus</i> NL 110, <i>Vibrio</i> NE 17 <i>Carnobacterium</i> sp. Hg4-03 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	<i>Scophthalmus maximus</i> <i>Macrobrachium rosenbergii</i> <i>Hepialus gonggaensis</i> larvae <i>Clarias gariepinus</i> <i>Solea senegalensis</i>
Su Kalitesinin Kontrolü	<i>Bacillus</i> sp. 48 <i>Bacillus</i> NL 110, <i>Vibrio</i> sp. NE 17 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>B. coagulans</i> SC8168 <i>Bacillus</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp.	<i>Penaeus monodon</i> <i>Macrobrachium rosenbergii</i> <i>Clarias gariepinus</i> <i>Pennaeus vannamei</i> <i>Penaeus monodon</i>
Stres Toleransı	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Alteromonas</i> sp. <i>B. subtilis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. cerevisiae</i> <i>L. casei</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	<i>Dicentrarchus labrax</i> <i>Sparus auratus</i> <i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Poecilopsis gracilis</i> <i>Litopenaeus stylirostris</i> Makimaki

Tablo 2.5 Su ürünleri yetiştiriciliğinde farklı probiyotik uygulamaları (devam)

Üremenin İyileştirilmesi	<i>Bacillus subtilis</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Poecilia reticulata</i> , <i>Xiphophorus maculatus</i> <i>Danio rerio</i> <i>Xiphophorus helleri</i>
-----------------------------	--	--

Tablo 2.4'e bakıldığında probiyotiklerin su ürünleri yetiştiriciliğinde pek çok farklı amaç için kullanıldığı (büyümenin teşviki, su kalitesinin artırılması, hastalıkların kontrolü gibi) görülmektedir. Farklı sucul canlılar üzerinde farklı mikroorganizma türlerinin etkili olduğu belirlenmiştir. *Lactococcus* ve *Bacillus* türleri su ürünleri yetiştiriciliğinde yoğun olarak kullanılan probiyotik türlerdir.

2.8. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar ve Uygulama Yöntemleri

İnsanlar başta olmak üzere birçok karasal hayvanda embriyonik gelişimi amnion içerisinde gerçekleşmektedir. Ancak balıklarda ve kabuklularda larval dönem ontogenetik evrede anneden bağımsız dış ortamda gerçekleşmektedir. Bu larvalar, sindirim sistemi mikroflorasındaki düzensizliklerden oldukça fazla etkilenir. Bunun sebebi henüz sindirim sistemi ve immün sistemi gelişmemiş olan larvaların beslenmek için besin almak zorunda olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple su ürünleri yetiştiriciliğinde, probiyotik uygulamaları özellikle larval dönemde gerçekleştirilmelidir (Gatesoupe, 1999). Çoğunlukla *Vibrio*, *Acinetobacter* ve *Enterobacteriaceae* grubunun üyeleri deniz balıklarının bağırsağında yaygın olarak bulunurken genellikle *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., ve *Flavobacterium/Cytophaga* grubuna ait üyeler tatlı su balıklarının bağırsağında yer almaktadır.

Laktik asit bakterileri (*Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp, *Streptococcus* spp.), *Bacillus* spp. (*B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*), *Pseudomonas fluorescens* ve *Vibrio* spp. gibi türler ise sucul yaşam canlılarının doğal olarak sahip oldukları mikrobiyotanın dışında, probiyotik olarak su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan mikroorganizmalardır (Tattersall et al., 2006).

Tablo 2.6 Balıklar için probiyotik özellikli ile kullanılabilecek bakteri türleri (Gomez-Gil et al., 2000)

Bakteri Türleri	Hedef Organizmalar
<i>Bacillus toyoi</i> , <i>Bacillus spp. sporları</i>	Kalkan yemi olarak kullanılan rotiferlerde
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Kalkan yemi olarak kullanılan rotiferlerde
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus lactis</i>	Kalkan yemi olarak kullanılan Artemia'da
<i>Alteromonas spp.</i>	İstiridye (<i>Crassostrea gigas</i>)
<i>Aeromonas media</i>	İstiridye
<i>Roseobacter spp.</i>	Tarak (<i>Pecten maximus</i>)
<i>Vibrio pelagius</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kalkan (<i>Scophthalmus maximus</i>)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Karides (<i>P. vannamei</i>)
<i>Vibrio harveyi</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Nitrobacter spp.</i> , <i>Nitrosomonas spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Thalassobacter utilis</i> (PM-4)	Karides (<i>P. monodon</i> , <i>P. penicillatus</i>)
	Yengeç (<i>Portunus trituberculatus</i>), karides

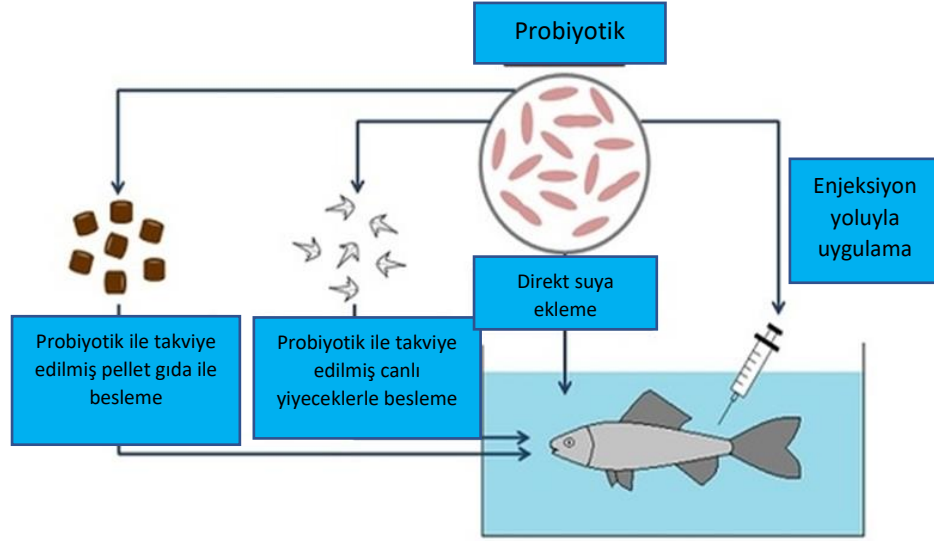
Farklı akuakültür canlılarında gözlemlenen hastalıkların tedavisinde kullanılan probiyotikler, uygulanan canlı türüne göre de değişiklik göstermektedir. *Bacillus spp.*'nin sıklıkla spor formunda kullanılabilir olması bu mikroorganizmayı diğer mikroorganizmalara göre avantajlı konuma getirmektedir. Bakteriler dışında tabloda da görüldüğü üzere *S. cerevisiae* gibi maya türleri de su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmalardandır.

Probiyotikler tarafından oluşturulan koruyucu etki, konakçı canlı tarafından oluşturulan koruyucu etkiden daha yüksek olduğu için, su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotiklerin kullanımı ile hastalıklardan korunma ve bu hastalıkların tedavisinin sağlanması mümkün olmaktadır.

Probiyotikler konağa 4 farklı yolla uygulanabilir;

1. Direk içerisinde yaşadıkları suya ekleme,
2. Balığa enjeksiyon yolu ile uygulama,
3. Probiyotik ile takviye edilmiş canlı yiyeceklerle besleme,

4. Probiyotik ile takviye edilmiş pelet gıda ile besleme (Balcázar et al., 2006).



Şekil 2.11 Probiyotikleri konağa uygulama yöntemleri (Balcázar et al., 2006)

2.9. Balık Probiyotiği Olarak *Bacillus* Türlerinin Kullanılmasının Önemi

Bacillus spp. gibi probiyotikler (Gram pozitif endospor oluşturan bakteri), patojenik bakterileri kontrol etmek, bunlarla rekabet etmek ve ayrıca kültürü yapılan organizmaların büyümesini teşvik etmek için kültür ortamına dahil edilebilir. Ayrıca *Bacillus sp.* suda yaşayan organizmalara uygulandığında istenmeyen yan etkiler taşımayan, patojenik ve toksik olmayan mikroorganizmalardır.

Spor oluşturabilen probiyotikler olan *Bacillus spp.* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* ve *Bacillus licheniformis* gibi) spor oluşturmeyen bakterilere (*Lactobacillus spp.* gibi) göre aşağıdaki gibi bir takım avantajlara sahiptir:

- Spor formu oluşturabildikleri için raf ömürleri uzundur. Sporlar, canlılık üzerinde herhangi bir etki olmaksızın, oda sıcaklığında kurutulmuş bir biçimde saklanabilir,
- Sporlar, gastrik bariyerin düşük pH'sında hayatta kalabilmektedir,
- *Bacillus spp.*'lerin tutunma kabiliyetleri yüksektir,

- Bakteriyosin (antibakteriyel peptitler) üretimi ve bağışıklık sistemini uyarıcı etkileri bilinmektedir (Buruiană et al., 2014).

Su kalitesinin iyileştirilmesinde, özellikle *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. Gram (-) bakterilere göre Gram (+) bakteriler, organik maddeyi CO₂'e, daha iyi dönüştürürler. Üretim döngüsü sürecinde Gram (+) bakteriler, yüksek seviyedeki çözünmüş ve partiküler organik karbonu minimize edebilirler. *Bacillus* türleri, su ürünleri yetiştiriciliğinin yapıldığı sucul ortamdaki patojen mikroorganizmaların sayısını azaltarak ve sudaki mikrobiyal popülasyonun kompozisyonunu etkileyerek su kalitesini arttırmaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* türlerinin, sucul ortamdaki potansiyel patojenlere karşı antagonistik etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Koca,2011).

Bacillus spp. kullanımının bir diğer avantajı, *Vibrio* ve *Aeromonas spp.* gibi Gram negatif organizmalarla genellikle yatay gen transfer süreçlerinde yer almamalarıdır. Bu nedenle bu türlerden antibiyotik direnci veya virülans için genler edinme olasılığı düşüktür. Bu cinsin diğer önemli olumlu özellikleri, hızla çoğalma, çok sayıda çevresel koşulu tolere etme ve su ürünleri verimliliğini artıracabilecek geniş bir yelpazede faydalı etkiler sağlama yeteneğidir. Spor oluşturan birçok *Bacillus*, (*B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. cereus* ve *B. toyoi* dahil olmak üzere) insan ve hayvan kullanımına yönelik ürünlerin bileşenleri olarak dünya çapında satılmaktadır (Nemutanzhela ,200 C.E.).

2.10. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Ticari Probiyotik Ürünler

Su ürünleri yetiştiriciliğine verilen önem son yıllarda nispeten artmıştır. Dünya nüfusunun artışı ile insanların besin kaynaklarına ulaşması ve gerekli olan besin maddelerini tüketebilmesi her geçen gün biraz daha zorlaşmaktadır. Su ürünlerine ait en başta gelen yetiştiricilik balık yetiştiriciliğidir. Şu an dünyada üretilen toplam proteinin neredeyse %7'si, hayvansal kaynaklı proteinin ise %17'si balıklar tarafından sağlanmaktadır.

Tablo 2.6'da su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan ticari probiyotik ürünlere yer verilmiştir. Tabloya bakıldığında birçok ticari ürünün mikroorganizma olarak *Bacillus* izolatlarını içerdiği görülmektedir.

Tablo 2.7 Su ürünleri yetiştiriciliğinde ticari olarak kullanılan probiyotik ürünler, (Olmos, 2014; Hai, 2015; Koca, 2011)

Marka	Üreticisi	İçerik
Naturalle <i>Bacillus subtilis</i>	Wuhan Nature's Favour Bioengineering Co., Ltd, Wuhan City, China http://www.wuhannature.com	<i>Bacillus subtilis</i> (2×10^{10} CFU/g).
Biozyme	Bio-Pharmachemie Joint-Venture Company, Ho Chi Minh, Vietnam http://www.biopharmachemie.com	<i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Fubon <i>B. subtilis</i>	Angel Yeast Co., Ltd. Hubei, China http://www.angelyeast.com	<i>Bacillus subtilis</i> ($\geq 2 \times 10^{10}$ CFU/g).
Bioron	American Pharma International, India http://www.americanpharmainternational.com	Her bir kg için: <i>Bacillus subtilis</i> ($4,5 \times 10^8$ CFU), <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Nitrosomonas sp.</i> , <i>Nitrobacter sp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Aspergillus oryzae</i> .
Lactomin	American Pharma International, India http://www.americanpharmainternational.com	Her bir kg için: <i>Bacillus subtilis</i> ($4,5 \times 10^{10}$ CFU), <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Nitrosomonas sp.</i> , <i>Nitrobacter sp.</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ve <i>Aspergillus oryzae</i> .
Biogen	BIO-GEN LTD, 1 Maja 26, 46-100 Namysłów, Poland	<i>Lactobacillus acidophilus</i> D2/CSL CECT 4529, <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 11181, <i>Pediococcus acidolactici</i> ATCC 8042, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469
Add-B	BioSolv AB Rue Neerveld 107 1200, Brussels Belgium	<i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>Rhodopseudomonas viridis</i> , <i>Rhodopseudomonas palustris</i> ve <i>Rhodomicrobium vannielli</i>
Bioflokulan	Dastgir Saheb Fish And Prawns Company	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>
Oswa B-50	Sanchi Organics Pvt. Ltd.	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus spp.</i> (2 strain), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (2 strain)
BIOMIR	Bio-Tech Grade	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i>
BIOSTART	BIO-CAT Microbials	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus polymyxa</i>

Her ne kadar su ürünleri yetiştiriciliğine verilen önem gittikçe artmış olsa da bu alanda yapılan araştırmalar ve çalışmalar hala yeterli seviyelere ulaşamamıştır. Bu da su ürünleri yetiştiriciliğinde verim kaybına sebep olmaktadır. Hem su ürünleri yetiştiriciliği ile elde edilen ürünler; hem de bu alanda oluşan hastalıkların ve diğer problemlerin önüne geçilebilmesi için çok daha fazla çalışmalar ve araştırmalar yapılması gerekmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri İzolatları ve Test Bakterileri

3.1.1.1. Bakteri İzolatları

Bu çalışmada incelenen mikroorganizmalar, daha önceden izole edilip, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü *Bacillus* Koleksiyonunda yer alan çeşitli *Bacillus* izolatlarıdır.

Tablo 3.1 İzolatların elde edildiği numunelerin alındığı yerler

NO.	Numune Alınan Yer	Numune Çeşidi	Tarih
1	İzmir Kuş Cenneti Gözlem İstasyonu Arkası 3 su birikintisi	Su	15.11.2012
2	İzmir Kuş Cenneti Gözlem İstasyonu 300-400 m. uzağı su kanalı	Su	15.11.2012
3	Bayındır-Tire yolu, Tire çıkışı 5 km çiftlik (yolun sağında)	Su (beklemiş havuz suyu)	-
4	Ödemiş'e gelmeden 2 km sağda çiftlik evi	Su (ölü larvalı beklemiş su)	13.12.2012
5	Bayındır / Bayındır Güney yönü / Zeytin bahçesi	Toprak	21.11.2012
6	Bayındır-Tire yolu Batı Yönü	Toprak (Çiftlik toprağı)	21.11.2012
7	Tire / İzmir Tire Kuzey yönü / Mısır Tarlası	Toprak	21.11.2012
8	Ödemiş Bademli / Bademli Barajı kenarı orman toprağı Batı yönü	Toprak	21.11.2012
9	Ödemiş Bademli Güney Yönü Allah deresi Kestane ormanı	Toprak	21.11.2012
10	Torbalı Çaybaşı köyü Hayvan Çiftliği Hayvan Yıkama Havuzu	Su	21.11.2012
11	Torbalı Çaybaşı Sulama havuzu kenarı su Birikintisi	Su	21.11.2012
12	Torbalı Çaybaşı Hayvan Çiftliği Yıkama suyu	Su	21.11.2012
13	İzmir Kuş Cenneti Gözlem İstasyonu 100-150 m. Çevresi	Çamur	15.11.2012
14	İzmir Kuş Cenneti Gözlem İstasyonu Yaklaşık 1000 m. Uzağı Sulama Kanalı	Çamur	15.11.2012
15	İzmir Kuş Cenneti Gözlem İstasyonu Yaklaşık 500 m. Kara içi	Çamur	15.11.2012

Tablo 3.1 İzolatların elde edildiği numunelerin alındığı yerler (devam)

16	İzmir Kuş Cenneti Gözlem İstasyonu Yaklaşık 500 m. Sazlık Alan Etrafı	Çamur	15.11.2012
17	İzmir Kuş Cenneti etrafı sulama kanalları ve civarı gözlem İstasyonu Yaklaşık 1 km	Çamur	15.11.2012
18	İzmir Kuş Cenneti etrafı sulama kanalları ve civarı gözlem İstasyonu Yaklaşık 3 km	Çamur	15.11.2012
19	Rize, Çayeli, İncesirt Köyü	Toprak	-
20	Rize, Çayeli İncesirt Köyü	Toprak	-
21	Rize, Çayeli Madenli Köyü	Toprak	-
22	Rize, Çayeli Madenli Köyü	Toprak	-
23	Trabzon, Sürmene	Toprak	-
24		Toprak	
25		Toprak	
26			
27			

3.1.1.2 Test Bakterileri

Çalışmada incelenen bakteri izolatlarının antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan balık patojeni dört farklı bakteri türü (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*) Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Çalışmadaki tüm besiyerleri 121°C'de 20 dk olacak şekilde otoklavlama ile steril edilerek kullanılmıştır.

3.1.2.1 Kullanılan Besiyerleri

NA (Nutrient agar)

Bacillus izolatlarının üretimi, saflaştırılması, aktifleştirilmesi ve saklanması için kullanılan ticari formdaki Nutrient Agar (*Merck*, 105450) besiyeri kullanılmıştır. (Swapna et al., 2010).

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar	20,0 g
Distile Su	1000 ml

NB (Nutrient broth)

Bacillus izolatlarının üretimi, saflaştırılması, aktifleştirilmesi ve saklanması için kullanılan ticari formdaki Nutrient Broth (Merck, 105443) besiyeri kullanılmıştır. (Swapna et al., 2010).

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Broth	8,0 g
Distile Su	1000 ml

LB Broth (Luria Bertani Broth)

Çalışma kapsamında antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi basamağındaki agar kuyucuk yönteminde izolatların aktifleştirilmesinde kullanılan besiyeridir (LB Broth (MERCK, 1102850500), (Foda et al., 2010)).

Bileşenin Adı	Miktarı
LB Broth	25 g
Distile Su	1000 ml

MHA (Mueller Hinton Agar)

Çalışma kapsamında antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi basamağındaki agar kuyucuk yönteminde kullanılan besiyeridir (MH Broth (OXOID, CM0405B)), (Haniffa and Kavitha, 2012).

Bileşenin Adı	Miktarı
MH Agar	21 g MH Broth %2 Agar Agar
Distile Su	1000 ml

TSA (Tryptic Soy Agar)

Çalışma kapsamında antibiyotik duyarlılığın belirlenmesi basamağındaki disk difüzyon yönteminde kullanılan besiyeridir (TS Broth (OXOID, CM0405B)), (Aytar ve ark., 2019).

Bileşenin Adı	Miktarı
TS Agar	30 g TS Broth %2 Agar Agar
Distile Su	1000 ml

Kanlı Agar Besiyeri

İncelenen *Bacillus* izolatlarının hayvan patojeni olup olmadığının tespitinde kullanılmıştır. Ticari olarak bulunan Blood Agar Base (Merck, 1.1086) kullanılmıştır. Sterilizasyon sonrası besiyeri sıcaklığı 45-50°C'ye gelince aseptik koşullarda %5 oranında steril kan ilave edilmiştir (Gülcan, 2006).

Bileşenin Adı	Miktarı
Blood Agar Base	39,5 g
Distile Su	1000 ml

Brain Heart Infusion Agar (BHA)

Potansiyel *Bacillus* izolatlarının biyofilm oluşturup oluşturmadığının belirlenmesinde kullanılmıştır. Ticari olarak bulunan Brain Heart Infusion (Merck, 1.1088) kullanılmıştır. Sterilizasyon sonrası besiyeri sıcaklığı 45-50°C'ye gelince aseptik koşullarda Kongo Red İndikatörü ilave edilmiştir. Besiyeri mümkün olduğunca homojenizasyon için karıştırılmalıdır (Gonzalez et al., 2004).

Bileşenin Adı	Miktarı
Kongo Red İndikatörü	8 g
Brain Heart Infusion	37 g
Sükroz	50g
Agar Agar	20 g
Distile Su	1000 ml

Proteaz Aktivitesini Taramak İçin Kullanılan Besiyeri

Probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde proteaz aktivitelerinin incelenmesi amacı ile kullanılmıştır (Gonzalez et al.,2004).

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	10 g
Distile Su	250 ml

Skimmilk çözeltisi

Skim Milk (Oxoid)	2 g
Distile Su	250 ml

Bu yöntemde 500 ml otoklavlanabilir laboratuvar şişesi içinde 250 ml distile su içinde ticari nutrient agar besiyeri 500 ml'lik ölçü için olacak şekilde hazırlanmıştır. Diğer bir 500 ml'lik otoklavlanabilir laboratuvar şişesinde ise 2

gram skim milk 250 ml distile su içinde çözündürülmüştür. Aynı ayrı steril edilen ortamlar, otoklav sterilizasyonundan sonra aseptik şartlarda birleştirilmiştir. Ortamlar birleştirilirken skim milkin homojen bir şekilde karıştırılmasına dikkat edilmiştir. Karıştırılan ortam aseptik koşullar altında steril petrilere döküldükten sonra katılaşması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Amilaz Aktivitesini Taramak İçin Kullanılan Besiyeri

Probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde amilaz aktivitelerinin incelenmesi amacı ile kullanılmıştır (Sanchez- Porro et al., 2003)

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	10 g
Distile Su	500 ml
Çözünebilir Nişasta	(Fluka) 10 g

Bu yöntemde 500 ml'lik laboratuvar şişesi içinde 10 gr nişasta 500 ml distile su ile iyice çözündürüldükten sonra standart nutrient agar besiyeri 10 gr tartılarak şişeye ilave edilmiştir. Otoklavlanan ortam aseptik şartlarda steril petrilere döküldükten sonra katılaşması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Lipaz Aktivitesini Taramak İçin Kullanılan Besiyeri

Probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde lipaz aktivitelerinin incelenmesi amacı ile kullanılmıştır (Gonzalez et al., 2004).

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	10 g
CaCl ₂	0,05 g
Tween 80	5 ml
Distile Su	500 ml

500 ml'lik laboratuvar şişesi içinde 0,05 gr CaCl_2 içeren standart nutrient agar besiyeri hazırlanmıştır. Ayrı olarak 5 ml tween 80 otoklavlanmıştır. Daha sonra ise nutrient agar ve tween 80 aseptik şartlarda birleştirilmiştir. Karıştırılan ortam aseptik koşullar altında steril petrilere döküldükten sonra katılaşması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Selülaaz Aktivitesini Taramak İçin Kullanılan Besiyeri

Probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde selülaaz aktivitelerinin incelenmesi amacı ile kullanılmıştır (Gonzalez et al., 2004).

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	10 g
CMC	1g
Distile Su	500 ml

500 ml'lik laboratuvar şişesi içinde 1 gr CMC (Carboxy Metil Cellulose) içeren standart nutrient agar ortamı hazırlanmıştır.

Otoklavlandıktan sonra aseptik şartlarda steril petrilere aktarılmıştır. Karıştırılan ortam aseptik koşullar altında steril petrilere döküldükten sonra katılaşması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Proteaz Üretim Ortamı

Katı besiyerinde proteaz aktivitesi belirlenen *Bacillus* izolatlarının sıvı ortamda büyütülerek proteaz aktivitelerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır (Puri et al., 2002).

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	5 g
Çözünebilir Nişasta	10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,8 g
KH_2PO_4	0,4 g
NaCl	5 g
Distile Su	1000 ml

Amilaz Üretim Ortamı

Katı besiyerinde amilaz aktivitesi belirlenen *Bacillus* izolatlarının sıvı ortamda büyütülerek amilaz aktivitelerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır (Tanyıldızı ve ark., 2006)

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	2,5 g
Çözünebilir Nişasta	15 g
Yeast Extract	2 g
$MgSO_4$	0,5 g
KH_2PO_4	0,5 g
$CaCl_2$	0,1 g
Distile Su	1000 ml

Lipaz Üretim Ortamı

Katı besiyerinde lipaz aktivitesi belirlenen *Bacillus* izolatlarının sıvı ortamda büyütülerek lipaz aktivitelerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır (Shah et al., 2007).

Bileşenin Adı	Miktarı
Pepton	30 g
Yeast Extract	10 g
Zeytin yağı	10 g
NaCl	25 g
Distile Su	1000 ml

Selüloz Üretim Ortamı

Katı besiyerinde selüloz aktivitesi tayin edilen *Bacillus* izolatlarının sıvı ortamda büyütülerek selüloz aktivitelerinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla kullanılmıştır (Shah et al., 2007).

Bileşenin Adı	Miktarı
Yeast Extract	1,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	10 g
KNO ₃	3 g
FeSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g
NH ₄ SO ₄	1,5 g
CMC	5 g
Distile Su	1000 ml

3.1.2.2 Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.2.1 Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)

Mc Farland standardı ile bakteriyel hücre konsantrasyonlarının belirleme aşamasında, enzim aktivitesi çalışmalarında ve santrifüj esnasında gerekli olan yıkama işlemlerinde kullanılmıştır (Demain, L. and Solomon, N.,1986).

Bileşenin Adı	Miktarı
NaCl	8 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
Distile Su	1000 mL

3.1.2.2.2 Mc Farland 0.5 Standardı

Tez çalışması sırasında kullanılan izolatların gerekli olan başlangıç sayılarının standardizasyonunda kullanılmıştır. Bu standart ile izolatların başlangıç sayısı $1,5 \times 10^8$ kob/ml olarak belirlenmiştir (<https://microbenotes.com/mcfarland-standards/>).

Bileşenin Adı

Miktarı

%1 BaCl₂

0,05 mL

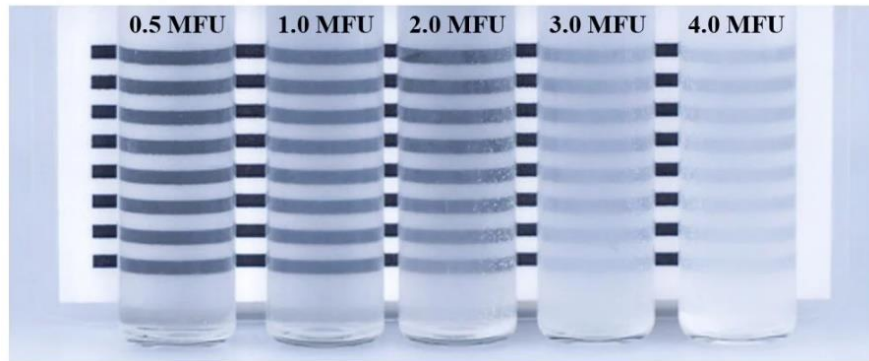
%1 H₂SO₄

9,95 mL

Tablo 3.2 Mc Farland Standardı BaCl₂ ve H₂SO₄ Karışım Oranlarına Göre Yaklaşık Hücre Sayısı

Mc Farland Standard	%1 BaCl ₂ (ml)	%1 H ₂ SO ₄ (ml)	Yaklaşık Hücre Yoğunluğu (kob/ml)
0.5	0.05	9.95	1.5×10^8
1.0	0.1	9.9	3.0×10^8
2.0	0.2	9.8	6.0×10^8
3.0	0.3	9.7	9.0×10^8
4.0	0.4	9.6	12.0×10^8

McFarland Standards



Şekil 3.1 Mc. Farland standardına göre bulanıklık görselleri

3.1.2.2.3 İyodin Solüsyonu

Amilaz enzim aktivitesinin katı besiyerinde tayin edilmesi aşamasında kullanılmıştır (De Moraes, 1995).

Bileşenin Adı	Miktarı
İyodün Stok solüsyonu	1 mL
5 M HCl	5 mL

İyodin Stok Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
I ₂	0,5 g
KI	5 g
Distile Su	100 ml

3.1.2.2.4 %0,05 Kongo Kırmızısı Boyası Çözeltilisi

Selülaz enzim aktivitesinin katı besiyerinde tayin edilmesi aşaması ile biyofilm oluşumunun belirlenmesinde kullanılmıştır.

Bileşenin Adı	Miktarı
Kongo Kırmızısı	0,25 g
Distile Su	500 mL

3.1.2.2.5 DNS ((Dinitro Salisilik Asit)) Çözeltilisi

Enzim aktivitesi tayinlerinde, belirli inkübasyon süreleri sonunda enzim aktivitesinin durdurulması ve spektrofotometrik analiz için gerekli renk skalasının tayini için kullanılan ‘colorstop solution’ olarak adlandırılan çözeltilidir (Demain, L. and Solomon, N.,1986).

Bileşenin Adı	Miktarı
3,5-DNS (Sigma Aldrich)	1 g
Na/K Tartarate Tetra Hidrat	30 g
2 M NaOH	20 mL
Distile Su	50 mL

Karışım, şeffaf renk alana kadar manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılır, şeffaf görünüm aldığı anda karışım distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3.1.2.2.6 Sentetik Mide Sıvısı Çözeltisi

Bileşenin Adı	Miktarı
NaCl	1 g
Pepsin	30 g
HCl	20 mL
Distile Su	50 mL

1L'lik cam şişeye 2 g NaCl ve 3,2 g Pepsin tartılmış, üzerine 7 mL HCl (1 M'lık) eklenmiştir. Son olarak sentetik mide sıvısı saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Sentetik mide sıvısının pH' sı 1 M'lık HCl ile 2,5'a ayarlanmıştır.

Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Diskleri

Antibiyotiklere duyarlılık testinin gerçekleştirilmesinde amoksisilin (25µg), tetrasiklin (30 µg), neomisin (30 µg), gentamisin (10 µg), penisilin (10 U), streptomisin (10 µg), oksitetrasiklin (30 µg) , kanamisin (30 µg), eritromisin (15 µg) olarak 9 farklı antibiyogram diskleri kullanılmıştır.

(<http://www.alkimsaglik.com.tr/urunlerimiz/bioanalyse/antimikrobiyal-duyarlilik-testi-diskleri.html>)

Üretim Optimizasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Seçilen bir Bacillus izolatının üretim optimizasyonunda kullanılan besiyerleridir.

Optimum üretimin sağlanması için farklı kaynaklardan modifiye edilerek belirlenmiştir.

Biyokütle Üretim Ortamı-1 (Saber, F., et al., 2020)	Biyokütle Üretim Ortamı-2 (Cho, J., et al., 2009)	Biyokütle Üretim Ortamı-3 (Cho, J., et al., 2009; Küçük, Ö., ve <i>Korean J.</i> 2006)
Melas	Soya Unu	Nişasta
Mısır Islatma Şurubu (CSL)	Kuru Maya	Kuru Maya
MgSO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄
K ₂ HPO ₄		
KH ₂ PO ₄		

3.1.3 Kullanılan cihazlar

3.1.3.1 Hassas terazi

Mettler Toledo AL204 hassas terazi, kullanılan besiyerlerinin ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.2 Isıticılı manyetik karıştırıcı

Heidolph MR 3001 ısıticılı manyetik karıştırıcı, kullanılan besiyeri ve diğer çözeltilerin istenilen koşullarda ve istenilen özelliklerde olması için homojenizasyonun sağlanmasında kullanılmıştır.

3.1.3.3 Otoklav

Hirayama Hiclave HVE-50 marka ve model numaralı otoklav gerekli besiyerleri ve çözeltilerin, sterilizasyonun sağlanması amacı ile kullanılmıştır.

Ayrıca yapılan analizler sonucunda açığa çıkan, mikrobiyolojik olarak bulaşık haldeki cam materyalin tekrar kullanılabilir hale getirilmesi ve tek kullanımlık materyallerin ise çöpe atılmadan önce tüm mikroorganizmalardan arındırılması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.4 Pastör fırını

Binder marka ısıtıcı fırın, 180 °C’ de 1,5-2 saat tutularak çalışmalar için gerekli olan cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

3.1.3.5 İnkübatörler

Nüve EN 120 inkübatör, 30 °C ‘de petri kültüvasyonları için kullanılmıştır.

3.1.3.6 Çalkalamalı inkübatör

Certomat R-HK marka çalkalamalı inkübatör, sıvı kültürde hücrelerin gelişiminin sağlanması için kullanılmıştır.

3.1.3.7 Santrifüj

Sigma 4K15 marka ve model numaralı santrifüj hücre hasadı için +4 °C’ de farklı rpm değerlerinde kullanılmıştır.

3.1.3.8 pH metre

InoLab WTW pH metre hazırlanan besiyeri ve diğer karışımların pH değerlerinin kontrol edilerek ayarlanması amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3.9 Vorteks:

IKA-WERKE TTS 2 (test tube shaker) vorteks, dökme plaka yöntemi ile canlı hücre sayımları yapılırken seyreltmelerin homojen olabilmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.10 Spektrofotometre

Amersham Biosciences marka Ultrospec 1100 pro (UV/Visible) model numaralı spektrofotometre aşırı kültürlerinin hazırlık aşamasında, hazırlanmış olan aşının absorbansının standardizasyonunda ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi aşamasında kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Bakterilerin Saflık Kontrolleri ve Aktifleştirilmesi

Çalışmada kullanılacak olan tüm *Bacillus* izolatları ve balık patojeni test bakterilerinin her denemeye başlamadan önce çizgi ekim yöntemiyle saflık kontrolleri ve aktifleştirilmesi yapılmıştır. Bu yöntemde NA besiyeri içeren petrilerin bir kenarına öze yardımı ile bakterinin çizimi yapılmıştır (Şekil 3.2). Ardından öze iyice ateşten geçirilerek steril edildikten sonra petrinin bakteri çizilen kenarından petrinin diğer boş bölgesine doğru bakteri seyreltilmiştir. Bu işlem petrinin 4 kenarı için her seferinde bir önceki seyreltmeden olacak şekilde tek koloni morfolojisinin gözlemlenebilmesi için dikkatlice yapılmıştır. Petriler uygun sıcaklık ve süre için inkübe edilmiştir (Ma and Chen, 2008).



Şekil 3.2 Petri plakasında çizgi ekim yöntemi

3.2.2. Dökme Plaka Yöntemi

Yapılan farklı denemelerde canlı hücre sayılarının belirlenebilmesi için probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatları, öncelikle 10 mL NB besiyerinde 30 °C' de 24 saat aktifleştirilmiştir. Ardından izolatlardan 10^{-1} 'den 10^{-8} 'e kadar ardışık seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu dilüsyonların her birinin 1 mL'si steril petri kaplarına alınıp üzerlerine sıcaklığı yaklaşık olarak oda sıcaklığına gelmiş olan NA besiyeri eklenmiştir. Hücre sayısı belirlenecek olan izolatların steril petri kaplarında homojen dağılımını gözlemleyebilmek için çalışmanın gerçekleştirildiği yüzeyde petriler 8 rakamı çizilerek karıştırılmıştır. NA donduğunda petriler ters çevrilerek 30 °C'de 48-72 saat inkübe edildikten sonra bakteri kolonileri 'kob/ml' olarak hesaplanır (Ma and Chen, 2008).

3.2.3. *Bacillus* İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Bacillus izolatlarının antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesinde test bakterileri olarak *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* olmak üzere balık patojeni dört farklı bakteri türü kullanılmıştır.

3.2.3.1 Karşıt Çizgi (Cross-Streak) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Antibakteriyel aktivitenin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen karşıt çizgi yönteminde, bir gün önceden hazırlanmış olan her bir NA plakasının bir kenarına tek bir aşılama çizgisi ile antibakteriyel aktivitesi belirlenmek istenen her bir *Bacillus* izolatı aşılanmıştır. 30 °C' de iki gün inkübasyondan sonra her petri plakasına, *Bacillus* izolatının büyüme çizgisine 90°'lik bir açıda olacak şekilde tek bir çizgi ile patojen bakterilerin (*L. garvieae*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum*, *A. hydrophila*) ekimi yapılmıştır. Mikrobiyal etkileşimler, inhibisyon bölgesinin var/yok oluşuna göre analiz edilmiştir. İşlem üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Lertcanawanichakul and Sawangnop, 2008).

3.2.3.2. Agar Kuyucuk Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Balık probiyotiği özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının her biri öncelikle nutrient broth içeren tüplerde 30°C'de 24 saat aktifleştirildikten sonra 250 ml'lik erlenlerde hazırlanmış 50 ml LB broth besiyerine %2 oranında aşılama yapılarak 30°C'de 150 rpm'de 72 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Inkübasyon tamamlandığında kültür sıvısı 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra supernatant uzaklaştırılarak kalan hücre pelleti 3 kez daha steril fosfat tampon çözeltisi ile yıkanıp santrifüjlenmiştir. En son elde edilen hücre pelleti sıkı kapaklı şişede 50 ml steril Fosfat Tampon çözeltisi ile süspansiyon hale getirilmiştir. 10^5 - 10^6 kob/ml sayısında hücre süspansiyonu elde edebilmek amacıyla hücre süspansiyonlarının ardışık dilüsyonları (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) yapılmıştır. Test bakterilerinin ardışık seyreltilmiş kültür süspansiyonlarının 600 nm dalga boyunda optik densiteleri ölçülmüş ve her bir seyreltmedeki bakteri sayıları (koloni oluşturan birim/ml, kob/ml) 3.2.2 'de anlatıldığı şekilde

belirlenmiştir. Süspanse kültürlerin 600 nm dalga boyunda ölçülen absorbans ile bu absorbanslara karşılık gelen canlı sayımları hesaplanmış ve bir kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır. Bu işlemlerin sonunda tüm denemelerde 10^5 - 10^6 kob/ml hücre süspansiyonu elde edilen seyreltme agar kuyucuk yönteminde kullanılmıştır.

Agar kuyucuk yönteminde Mueller Hinton Agar plakası yüzeyine 10^5 - 10^6 kob/ml sayısında hücre süspansiyonu 100 µl yayılmış, ardından her petriye içi boş steril cam çubuklar kullanılarak 4 adet kuyucuk açılmış, bu kuyucuklardan 3 tanesine karşıt çizgi yönteminde antibakteriyel etkisi gözlemlenen *Bacillus* izolatlarının Mc Farland 0.5'e göre ayarlanmış seyreltmelerinin 100 µl' si şırınga filtreden geçirilerek eklenmiştir. İşlem üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Geriye kalan bir kuyucuğa ise negatif kontrol olarak 100 µl PBS eklenmiştir. İşlemin pozitif kontrolü olarak 100 µg/ml amoksisilin 3 farklı petride her petrinin merkezindeki kuyucuğa 100 µl olacak şekilde doldurulmuştur.

Bu işlemlerin sonunda petriler düz olarak 30 °C'lik inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından zon oluşumu gözlenen her petrideki zon çapları milimetrik olarak cetvel yardımı ile ölçülmüştür (Krishnamoorthy, 2012; Al-Thani, 2014).

3.2.4. *Bacillus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenen *Bacillus* izolatlarının antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için TSB besiyerinde 30 °C'de 24 saatlik inkübasyonunun ardından her bir bakteri süspansiyonu 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına göre ayarlanmıştır. Daha sonra 10^7 kob/ml sayısında hücre süspansiyonu elde edebilmek amacıyla seyreltmesi yapılan hücre süspansiyonlarından TSA plakası yüzeyine 100 µl konarak aseptik koşullarda steril L baget ile yayılmış ve incelenen ticari antibiyotik diskleri her bir *Bacillus* izolatı için için petrilerin her birinde üç farklı antibiyotik diski olacak şekilde yerleştirilmiştir. Çalışma 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemlerin sonunda petriler 30 °C'lik inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, oluşan inhibisyon zonlarının mm cinsinden yarıçaplarının ölçülmesi ile sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen yarıçap değerlerinden çaplar hesaplanmış ve ortalama çap hesabı yapılmıştır (Uma and Rebecca, 2018; Özcan and Önalın).

3.2.5. *Bacillus* İzolatlarının Mide Sıvısı Toleransının Belirlenmesi

Bu yöntemin uygulamasında öncelikle balıkların mide sıvısı yerine kullanılacak olan sentetik mide sıvısı 3.1.2.2.6 'da anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

İncelenen *Bacillus* izolatlarının NB besiyerinde 30 °C'de 24 saatlik inkübasyonunun ardından 0.5 Mc. Farland bulanıklık standardına göre hücre süspansiyonları ayarlanmıştır. Hazırlanmış bakteri süspansiyonlarının her birinden %1 oranında sentetik mide sıvısına aşılanmıştır. %1 oranında bakteri süspansiyonu ile aşılanmış sentetik mide sıvısı vorteksle karıştırılarak homojenizasyonu sağlandıktan sonra 0. saatte örnek alınarak 3.2.2'de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı (kob/ml) yapılmıştır. Ardından bakteri süspansiyonu ile aşılanmış bu sentetik mide sıvısı 3 saat 30 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda vorteksle karıştırılarak homojenizasyonu sağlanan 3. saat örneğinden 3.2.2'de anlatıldığı şekilde tekrar canlı hücre sayımı (kob/ml) yapılmıştır. Sayım yapılacak tüm petriler 30 °C'de 72 saatlik inkübasyonun sonunda 0. ve 3. saat örneklerinin canlı hücre sayıları (kob/ml) ile % Canlılık hesaplamaları yapılmıştır (Tokatlı, et al., 2015; Aşan Özsağlam and Günyaktı, 2020).

$$\% \text{Canlılık} = \frac{N_f \text{ (kob/ml)}}{N_i \text{ (kob/ml)}} \times 100$$

N_f : 3 saatlik inkübasyon sonucundaki canlı hücre sayısı (kob/ml)

N_i : 0. saatteki canlı hücre sayısı (kob/ml)

3.2.6. *Bacillus* İzolatlarının Asidik pH'larda Optimum Büyümesinin İncelenmesi

İncelenen *Bacillus* izolatlarının NB besiyerinde 30 °C'de 24 saatlik inkübasyon ardından, inkübasyonu tamamlanan *Bacillus* izolatları 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Hücre peleti PBS ile üç kez yıkandıktan sonra pelet tekrar PBS içinde çözündürülmüş ve hücre peleti 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına göre ayarlanmıştır. İncelenen her bir *Bacillus* izolatı için pH'sı 1,0, 2,0 ve 4,0 yapılmış 10 mL'lik NB besiyerlerine 0,5 Mc Farland bulanıklık standardına göre ayarlanmış hücre süspansiyonundan 100'er µL aşılanmıştır. Vorteksle karıştırılarak homojenizasyonu sağlanan farklı pH' lardaki hücre kültürlerinde 0. Saatte ve 3. saatte 3.2.2'de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı (kob/ml) yapılmıştır. 0. ve 3. saat örneklerinin canlı hücre sayım (kob/ml) sonuçları ile % Canlılık hesaplaması yapılmıştır. Deneme iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Ramesh et al., 2015).

$$\% \text{Canlılık} = \frac{N_f (\text{kob/ml})}{N_i (\text{kob/ml})} \times 100$$

N_f : 3 saatlik inkübasyon sonucundaki canlı hücre sayısı (kob/ml)

N_i : 0. saatteki canlı hücre sayısı (kob/ml)

3.2.7. *Bacillus* İzolatlarının Hidrofobik Çözgene Adhezyonunun Belirlenmesi

Çizgi ekimi yapıp, 30 °C'de 24 saat inkübe edilen ve saf olduğu belirlenmiş *Bacillus* izolatlarının taze kültürleri, 250 ml lik erlenlerde hazırlanmış 50 ml nutrient broth besiyerine aşılanmış ve ardından 150 rpm'de 30 °C'de 14 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kültür sıvıları 7000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre peleti arka arkaya iki kez PBS solüsyonu (pH 7,4) ile yıkayıp, yine PBS solüsyonu ile süspanse edilmiştir. 540 nm' de ölçülerek 10^7 kob/mL'lik bir konsantrasyon ile absorbansı yaklaşık 0,5 (A0)' e ayarlanmıştır. Daha sonra üç mL bakteri süspansiyonuna bir mL ksilen eklenerek, ksilen ve hücre süspansiyonunun homojen karışması için 30 saniye

vorteksle karıştırılmış ve sıcaklığın dengelenmesi için 30°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Karışım tekrar kısaca vorteksle karıştırıldıktan sonra faz ayrımı için 30°C'de 30 dakika daha inkübe edildikten sonra sulu faz dikkatlice ayrılmış ve sulu fazın 540 nm' de absorbansı ölçülmüştür (Armas et al., 2017; Feng et al., 2017).

Bakterilerin adezyon solvente bağlanma yetenekleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Bakterilerin Adezyon Solvente Bağlanma Yetenekleri (The Bacterial Adhesion to Solvent) (BATS):

$$\text{BATS (\%)} = [(A_o - A_t) / A_o] * 100$$

Burada, At ve A0, sırasıyla karıştırmadan sonra sulu fazın absorbansını ve orijinal süspansiyonun absorbansını temsil etmektedir (Feng et al., 2017)

3.2.8. *Bacillus* İzolatlarının Safra Toleransının Belirlenmesi

İncelenen *Bacillus* izolatlarının 30 °C derecede bir gün inkübasyonunun ardından 0.5 Mc. Farland bulanıklık standardına göre hücre süspansiyonları (10⁸ kob/ml) ayarlanmıştır. Hücre süspansiyonundan %1, %2,5, %5 ve %7,5 oranında safra tuzları içeren 10 mL NB besiyerlerine %2 oranında aşılansak 30 °C'de 3 ve 6 saat inkübe edilmiştir.

0. saatte ve ardından 3 ve 6 saatlik inkübasyonların sonunda örneklerden 3.2.2'de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı (kob/ml) yapılmıştır. Sayım yapılacak tüm petriler 30 °C'de 72 saatlik inkübasyonun sonunda 0. saat, 3. saat ve 6. saat örneklerinin canlı hücre sayıları (kob/ml) ile % Canlılık hesaplamaları yapılmıştır (Thankappan et al., 2015).

$$\% \text{Canlılık} = \frac{N_f \text{ (kob/ml)}}{N_i \text{ (kob/ml)}} \times 100$$

N_f : 3ve 6 saatlik inkübasyon sonucundaki canlı hücre sayısı (kob/ml)

N_i : 0. saatteki canlı hücre sayısı (kob/ml)

3.2.9. *Bacillus* İzolatlarının İnhibitör Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının balıkların yaşadığı sucul çevredeki kirliliklerin giderilmesi ve ihtiyaç duydukları besin maddelerinin alınmasında etkili olduğu bilinen 4 farklı enzim için enzim aktivitesi tayini katı besiyerinde ve sıvı kültür ortamında incelenmiştir.

3.2.9.1. Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Taranması

Proteaz enzim aktivitesi belirlenecek olan *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30 °C’de inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Katı besiyerinde proteaz enziminin belirlenmesi için “**Proteaz Aktivitesini Tarama Besiyeri**” hazırlanarak, aktif kültürden öze yardımıyla bir cm’lik bir çizgi olacak şekilde petri plağına ekim yapılmıştır. 72 saat 30 °C’de inkübasyondan sonra çizgi boyuncabüyüyen ve şeffaf zon oluşturan izolatlar proteaz aktivitesi pozitif olarak kabul edilmiştir. Zon çaplarına bağlı olarak ise sonuçlar gözle değerlendirilerek petriler arasında kıyaslama (-), (+), (++) , (+++) (Tablo 3.3) şeklinde yapılmıştır (Carrim, 2006).

Tablo 3.3. Enzim aktivitelerinin petri plağında ölçülen şeffaf zon çaplarına göre değerlendirilmesi

Yok	-
Çok Az	+
İyi	++
Çok İyi	+++

Sıvı Besiyerinde Proteaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi;

Katı besiyerinde proteaz aktivitesi gösteren izolatların sıvı besiyerinde proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla;

250 ml’lik erlenlerde 100 ml olacak şekilde proteaz üretim ortamı hazırlanmıştır. Bu ortama 24 saat 30°C’de inkübe edilmiş aşı kültürü %2 oranında inoküle edilmiştir. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30°C 180 rpm’de 72 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda, 0,1 M fosfat buffer (pH 7.0), 450 µl azokazein ve 50 µl enzim sıvısı 50 °C, 30 dakika reaksiyona girmesi için bekletilmiştir. Süre sonunda reaksiyonun sonlandırılması için 250 µl trikloroasetik asit eklenmiştir. 5 dakika 8000 rpm’de santrifüjün ardından 600 µl supernatant ve 600 µl NaOH karıştırılmıştır. 450 nm’de absorbans değerine bakılmıştır.

Enzim miktarı, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

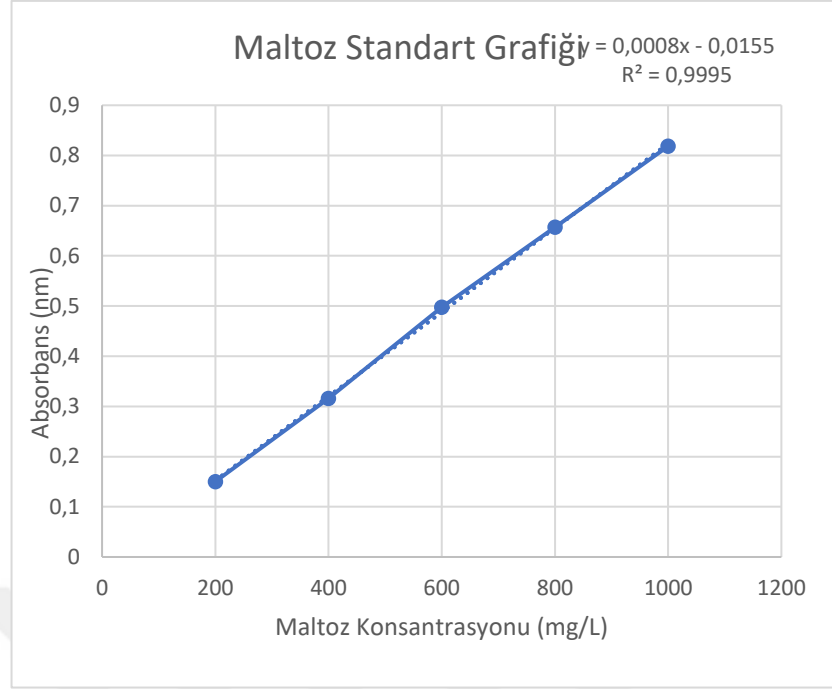
$$1 \text{ U Proteaz} = (\text{Abs} / 0,01) / 30 \times 20 \text{ (Chun et al., 2002).}$$

3.2.9.2. Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Standart Eğrisinin Oluşturulması;

Standart eğrinin oluşturulması için öncelikle, %2’lik Maltoz çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 2 gr Maltoz 100 mL saf suda çözündürülmüştür. Ardından bu çözeltiden 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL, 0.8 mL ve 1 mL’lik konsantrasyonlarda ardışık dilüsyonlar hazırlanmıştır. Örnek vermek gerekirse; %2’lik Maltoz çözeltisinden 1 cam tüpe 0.2 mL (200 µL) alındı üzeri 2 mL’ ye saf su ile tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 200 ppm (mg/L)’dir. Bu işlem diğer dilüsyonlar içinde ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan her farklı konsantrasyondaki 2mL’lik dilüsyonlara 1’er mL DNS çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan her 3mL’lik dilüsyon vorteksle karıştırılıp, 100 °C de su banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından oda sıcaklığına gelen farkı konsantrasyonlardaki maltoz çözeltilerine 9 mL saf su eklenerek tekrar vorteksle karıştırılmıştır. 540 nm de absorbansları belirlenerek konsantrasyona (x) karşılık gelen absorbans (y) değerleriyle standart grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 3.3 Maltoz standart grafiği

Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Taranması;

Hankin ve Anagnostakis (1975), ait metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Amilaz enzim aktivitesi belirlenecek olan *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30 °C’de inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Katı besiyerinde amilaz enziminin belirlenmesi için ‘‘Amilaz Aktivitesini Tarama Besiyeri’’ hazırlanarak, aktif kültürden öze yardımı ile bir cm’lik bir çizgi olacak şekilde petri plağına ekim yapılmıştır. 72 saat 30 °C’de inkübasyondan sonra petriler 10 dakika boyunca iyodin solüsyonu ile muamele edilmiştir. 10 dakikanın sonunda petriler saf su ile yıkanarak sonuçlar kontrol edilmiştir. Mavi siyah renge boyanan petride bakteri kolonisi etrafın oluşan şeffaf zon pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Zon çaplarına bağlı olarak ise sonuçlar Tablo 3.3’te belirtildiği şekilde gözle değerlendirilmiştir.

Sıvı Besiyerinde Amilaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi;

Katı besiyerinde amilaz aktivitesi gösteren izolatların sıvı besiyerinde amilaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla;

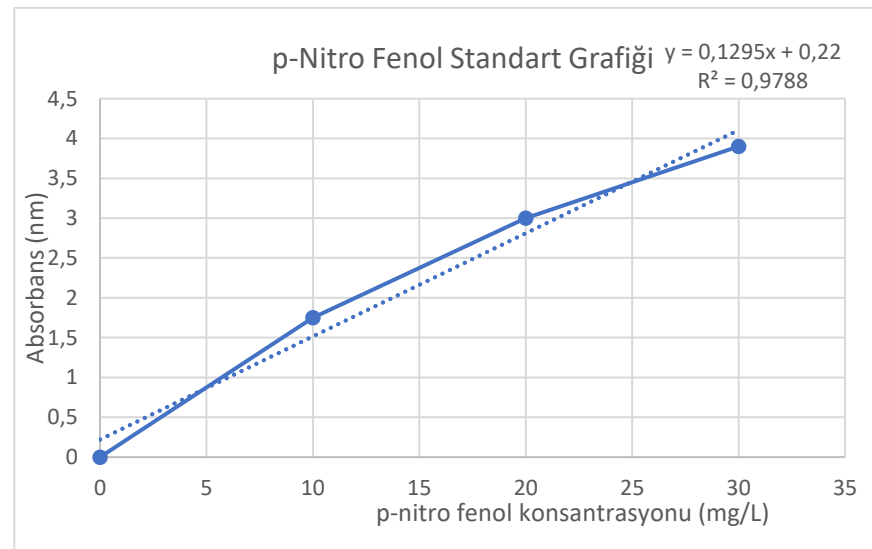
250 ml'lik erlenlerde 100 ml olacak şekilde amilaz üretim ortamı hazırlanmıştır. Bu ortam 24 saat 30°C'de inkübe edilmiş aşı kültürü ile %2 oranında inoküle edilmiştir. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30°C 180 rpm'de 72 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda örneklerden 2 mL santrifüj tüpüne alınarak 3500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Cam tüplere 1'er ml nişasta çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin süpernatant kısmından bu nişasta içeren tüplere 1'er mL eklenmiştir. 1 tüpe örnek yerine kör için kullanılması için 1 mL saf su eklenmiştir. Ardından her bir tüp vorteksle homojen şekilde karıştırılıp, su banyosunda 40 °C' de 3 dk inkübe edilmiştir.

Üç dakikalık inkübasyonun sonunda her bir tüpe durdurucu (colorstop) olarak 1 mL DNS eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır. 100 °C su banyosunda 15 dk bekletilen tüplere sürenin sonunda oda sıcaklığına geldiğinde 9'ar mL saf su eklenmiştir. Vorteksle karıştırılan her bir örneğin absorbansı belirlenmiştir. Sonuçta standart eğrisinin denkleminde absorbans değerleri yerine konularak konsantrasyon hesaplaması yapılmıştır.

3.2.9.3. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Standart Eğrisinin Oluşturulması;



Şekil 3.4 p-Nitro Fenol standart grafiği

Katı Besiyerinde Lipaz Aktivitesinin Taranması;

Lipaz enzim aktivitesi belirlenecek olan *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30 °C’de inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Katı besiyerinde amilaz enziminin belirlenmesi için **“Lipaz Aktivitesini Tarama Besiyeri”** hazırlanarak, aktif kültürden öze yardımı ile bir cm’lik bir çizgi olacak şekilde petri plağına ekim yapılmıştır. 72 saat 30 °C’de inkübasyondan sonra bakteri kolonisi etrafındaki granüler çökeltiler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Zon çaplarına bağlı olarak ise sonuçlar Tablo 3.3’te belirtildiği şekilde gözle değerlendirilmiştir. Granüler çökeltilerin gözlenmesi oldukça dikkatli yapılmalı, koloni morfolojisi ile granüler çökeltiler birbirine karıştırılmamalıdır (Carrim, 2006).

Sıvı Besiyerinde Lipaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi;

Katı besiyerinde lipaz aktivitesi gösteren izolatların sıvı besiyerinde lipaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla;

250 ml’lik erlenlerde 100 ml olacak şekilde lipaz üretim ortamı hazırlanmıştır. Bu ortam 24 saat 30 °C’de inkübe edilmiş aşı kültürü ile %2 oranında inoküle edilmiştir. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30°C 180 rpm’de 72 saat inkübe edilmiştir.

Enzim aktivitesi Sigurgisladottir et al., (1993)’ün metodu modifiye edilerek belirlenmiştir. pH ’ı 7,8 olarak ayarlanmış 0,05 M fosfat tamponunun 0,8 ml ’si ile 0,1 mL örnek ve 0,1 mL 0,001 M p-nitrophenyl laurate karıştırılmıştır. 37 °C de 10 dakika inkübasyonun ardından 0,1 M Na₂CO₃ ‘tan 0,25 mL eklenmiştir. Karışım 7500 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiş ve supernatantın absorpsansı 420 nm’de spektrofotometrede okunmuştur. Toplam enzim aktivitesi U/ml olarak ifade edilmiştir.

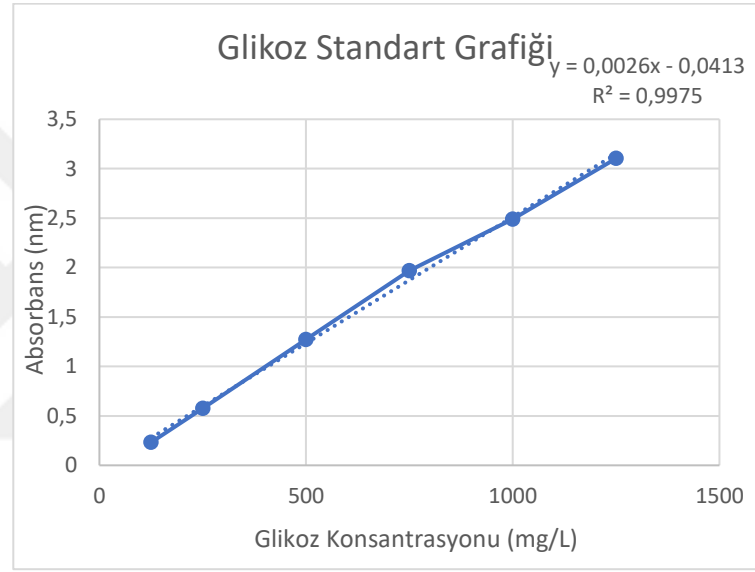
3.2.9.4. Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Standart Eğrisinin Oluşturulması;

Standart eğrinin oluşturulması için öncelikle, %2,5’lik Glikoz çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 2gr. Glikoz 100 mL saf suda çözündürülmüştür. Ardından bu çözeltiden 0.125 mL, 0.25 mL, 0.5 mL, 0.75 mL 1 mL ve 1,25 mL’lik

konsantrasyonlarda ardışık dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan her farklı konsantrasyondaki 2mL'lik dilüsyonlara 1'er mL DNS çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan her 3mL'lik dilüsyon vorteksle karıştırılıp, 100 °C de su banyosunda 15 dk inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından oda sıcaklığına gelen farklı konsantrasyonlardaki glikoz çözeltileri tekrar vorteksle karıştırılmıştır. 540 nm' de absorbansları belirlenerek konsantrasyona (x) karşılık gelen absorbans (y) değerleriyle standart grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 3.5 Glikoz standart grafiği

Katı Besiyerinde Selülag Enzim Aktivitesinin Taranması;

Selülag enzim aktivitesi belirlenecek olan *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30 °C'de inkübe edilerek aktiveleştirilmiştir. Katı besiyerinde amilaz enziminin belirlenmesi için "Selülag Aktivitesini Tarama Besiyeri" hazırlanarak, aktif kültürden öze yardımı ile bir cm'lik bir çizgi olacak şekilde petri plağına ekim yapılmıştır. 72 saat 30 °C'de inkübasyonun sonunda petriler taze hazırlanan 0,05 %' lik Kongo kırmızısı boyası ile 10 dakika muamele edilmiştir. 10 dakika sonra ise boyanın tamamen temizlenebilmesi için petriler 1M NaCl ile üç defa ikişer dakika yıkanmıştır. Pembe kırmızı boyanan petrilerdeki bakteri kolonileri etrafındaki şeffaf zon selülag pozitif olarak kabul edilmiştir. Zon

çaplarına bağlı olarak ise sonuçlar Tablo 3.3'te belirtildiği şekilde gözle değerlendirilmiştir. (Hankin and Anagnostakis, 1975).

Sıvı Besiyerinde Selüloz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi;

Katı besiyerinde selüloz aktivitesi gösteren izolatların sıvı besiyerinde selüloz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla;

250 ml'lik erlenlerde 100 ml olacak şekilde selüloz üretim ortamı hazırlanmıştır. Bu ortam 24 saat 30 °C'de inkübe edilmiş aşı kültürü ile %2 oranında inoküle edilmiştir. Erlenler çalkalamalı inkübatörde 30 °C 180 rpm'de 72 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda örneklerden iki mL santrifüj tüpüne alınarak 8000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Cam tüplere birer ml CMC çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin süpernatant kısmından bu CMC içeren tüplere birer mL eklenmiştir. Bir tüpe örnek yerine kör için kullanılması için 1 mL saf su eklenmiştir. Ardından her bir tüp vorteksle karıştırılıp, su banyosunda 50 °C' de 10 dk inkübe edilmiştir. 10 dk'lık inkübasyonun sonunda her bir tüpe durdurucu (colorstop) olarak bir mL DNS eklenmiş ve vorteksle karıştırılmıştır. 100 °C su banyosunda 10 dk bekletilen tüplere sürenin sonunda oda sıcaklığına gelen ve vorteksle karıştırılan her bir örneğin absorbansı belirlenmiştir. Sonuçta standart eğrisinin denkleminde absorbans değerleri yerine konularak konsantrasyon hesaplaması yapılmıştır.

Enzim Aktivite Miktarının Hesaplamasında Kullanılan Denklem;

$$\Delta A (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}) * \text{Total Volume (13 mL)} * \text{Seyreltme Faktörü (1)}$$

U/mL=

$$\frac{\Delta A (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}) * \text{Total Volume (13 mL)} * \text{Seyreltme Faktörü (1)}}{\text{İnkübasyon Süresi (3 dk)} * \text{Enzim Miktarı (1mL)} * \text{Eğim}}$$

U/mL= 1 dk içinde üretilen mol cinsinden enzim miktarı

3.2.10. Bakteriyel Tutunma Testi

3.2.10.1 Tutunma Testi İçin Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

İncelemesi yapılan *Bacillus* izolatları 24 saat 30 °C'de inkübe edilmiştir. Ardından 7000g'de 5 dakika santrifüj edilip üç kez PBS ile yıkama yapılmıştır. 0.5 Mc. Farland bulanıklık standardına göre ayarlanmış hücre süspansiyonları (10^8 kob/ml) Dulbecco Modifiye Eagle/F12 (DMEM/F12) ortamına aktarılmıştır. DMEM/F12 ortamının hacmi, son eklenen PBS'in hacmi ile eşit olarak kullanılmıştır.

3.2.10.2 Hücre Kültürü Hazırlama

İnsan kolorektal adenokarsinom hücreleri (Caco-2) hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 100 µg/ml streptomisin ile takviye edilmiş DMEM/F12 içerisinde kültüre edilmiştir ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir atmosferde 37 °C' de inkübe edilmiştir.

Hücrelerin bakımı en az bir hafta sürdürülmüş ve ortama adaptasyonları sağlanmıştır. Konfluense ulaşan hücrelerin sayımı Neubauer lamında gerçekleştirilmiştir ve 24 gözlü plate'e 500 µL hacminde, 10^6 hücre/ml hücre konsantrasyonunda ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda ortam uzaklaştırılmış ve antibiyotiksiz %10 serumlu DMEM/F12 ortamı ile ortam değişikliği gerçekleştirilmiştir. 48. saatte, bakteri inokülasyonundan 2 saat önce hücrelerin ortamı uzaklaştırılıp antibiyotiksiz ve serumsuz DMEM / F12 ortamından 450 µL hacim ilavesi ile tazelenmiştir.

3.2.10.3 Bakteri Kültürü ve Hücre Kültürünün co-Kültürü

Birinci bölümünde hazırlanan bakteri kültürü (50 µL), ikinci bölümünde hazırlanmış olan hücre kültürünün (450 µL) üzerine inoküle edilmiştir. Varsayımsal olarak son bakteri konsantrasyonu 10^7 kob/ml olarak kabul edilmiştir.

İnokülasyon sonrası plate 37 °C'de dört saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kontrol kuyucukları direk seri dilüsyonlar hazırlanarak MRS/M17 Agar üzerine yayma plak ile ekilmiştir. Bakteri ve hücre kültürü kuyucuklarında ise inkübasyon sonrası üst faz uzaklaştırılmış ve birer ml'lik PBS (pH 7,4) ile üç defa yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası iki ml %1 (v/ v) Triton X-100 içeren PBS

ilave edilmiş ve 37 °C'de 15-20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası seri dilüsyonlar hazırlanıp örneklerden 3.2.2'de anlatıldığı şekilde canlı hücre sayımı (kob/ml) yapılmıştır. Kontrol grupları için, herhangi bir bakteriyel gelişme olması beklenmemektedir.

3.2.11. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Hemolitik aktivitesi belirlenecek olan *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30 °C 'de inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Taze *Bacillus* kültürleri %5 (ağırlık / hacim) steril insan kanı içeren Columbia agar plakaları üzerinde üç tekrarlı ekilmiş ve 30 °C 'de 30 saat inkübe edilmiştir. Kan agar plakaları β -hemoliz (kolonilerin etrafındaki açık bölgeler), α hemoliz (kolonilerin etrafındaki yeşil renkli bölgeler) veya γ -hemoliz (kolonilerin etrafındaki bölgeleri yok) belirtileri açısından incelenmiştir (Argyri, et al., 2013).

3.2.12. Koagülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Koagülaz aktivitesi belirlenecek olan *Bacillus* izolatları 3.2.1 'de anlatılan yöntemle aktifleştirilmiştir. Çalışma da gerekli olan insan kan serumu için insan kanı 7000 rpm 'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Steril cam tüpte taze kan serumundan 0,5 ml ve aktifleştirilmiş sıvı hücre kültüründen 0,5 ml olacak şekilde eşit hacimlerde birleştirilmiştir. Kan serumu ve hücre süspansiyonunun vorteks ile homojenizasyonu sağlanmıştır. Ardından örnekler 24 saat 30 °C'de inkübe edilmiş, altı saat aralıklarla pıhtı oluşumu incelenmiştir. Denemede pozitif kontrol olarak *S. aureus* kullanılmıştır.

3.2.13. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

Biyofilm üretimini belirlenecek olan *Bacillus* izolatları nutrient broth besiyerinde 24 saat 30 °C'de inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Kongo Kırmızısı Agar (CRA) ortamı hazırlamak için, Brain Heart Infusion, Agar, sükroz ve Kongo kırmızısı indikatörü kullanılmıştır. Kongo kırmızısı indikatörü, diğer bileşenlerden ayrı olarak otoklavlanmış ve kongo kırmızısı, besiyeri sıcaklığı 45-50 °C'ye geldiğinde eklenmiştir. Taze *Bacillus* kültürleri, Kongo kırmızısı agar besiyerine iki tekrarlı olacak şekilde ekilmiş ve 30 °C' de 30 saat inkübe

edilmiştir. Kuru kristal kıvamına sahip siyah koloniler, biyofilm üretimini göstermektedir. Deney iki kopya halinde yapılmış ve üç kez tekrarlanmıştır (Carrim, 2006).

3.2.14. Seçilen *Bacillus* izolatının Laboratuvar Ölçeğinde Üretim Optimizasyonu

Probiyotik olma özellikleri incelenen izolatlardan en iyi sonuçlara sahip olan bir tanesi seçilmiştir. Bu izolat için belirlenen uygun besiyeri kullanılarak üretim süresi belirlenmiştir. Sürenin belirlenmesinin ardından ortamdaki karbon (C) ve azot (N) kaynağını faktör olarak kabul ettiğimiz ekonomik maliyetli bir üretim ortamının belirlenmesi için RSM çalışması yapılmıştır.

3.2.14.1 Seçilen *Bacillus* izolatı için inkübasyon süresinin belirlenmesi

Seçilen *Bacillus* izolatının üretim esnasında maksimum büyümeyi gösterdiği zamanın tam olarak belirlenebilmesi için NB besiyerinde büyüme eğrisi çıkartılmıştır.

Seçilen *Bacillus* izolatının 24 saatlik aktif kültüründen aşılı kültürü elde etmek için steril 250 mL 'lik erlen içerisinde 50 mL NB besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerine *Bacillus* izolatının inokülasyonu yapılmış, ardından 24 saat 30 °C 150 rpm 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 500 mL 'lik steril erlenlerde 100 mL NB besiyeri hazırlanmış ve aşılı kültüründen %2 oranında inokülasyon yapıldıktan sonra 30 °C 150 rpm 'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Deneme iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca bu besiyerinin bulunduğu erlenden 0., 6., 11., 24., 30., 35., 48., 54., 59. ve 72. Saatlerde 3.2.2 'de belirtildiği şekilde canlı hücre sayımı yapmak üzere aseptik koşullarda birer mL örnek alınmıştır. İnkübasyon süresince birer mL alınan kültür sıvıları ile 10^{-9} 'a kadar ardışık dilüsyonlar oluşturulmuştur. 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 'luk seyreltmelerden steril petrilere birer mL aktarıldıktan sonra üzerine 45-50 °C 'ye soğutulmuş NA dökülerek katılaşıp yavaşça karıştırılmış ve 24 saat 30 °C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda canlı hücre sayısı mililitrede koloni oluşturan birim (kob/mL) cinsinden hesaplanmıştır (Kumar vd., 2015).

3.2.14.2 Biyokütle üretim ortam içeriğinin optimizasyonu

Çalışmada, *Bacillus spp.* 'nin biyokütle üretimi amacıyla ucuz karbon (C) ve azot (N) kaynakları kullanılarak ekonomik bir üretim ortamı tasarlanması amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle seçilen bir *Bacillus spp.* izolatu için 3 farklı üretim ortamı denenmiştir (Saber, F. et al., 2020; Arrebola vd., 2019; Cho, J. Et al., 2009).

Tablo 3.4. Üretim optimizasyonu için denenilen üç farklı besiyeri

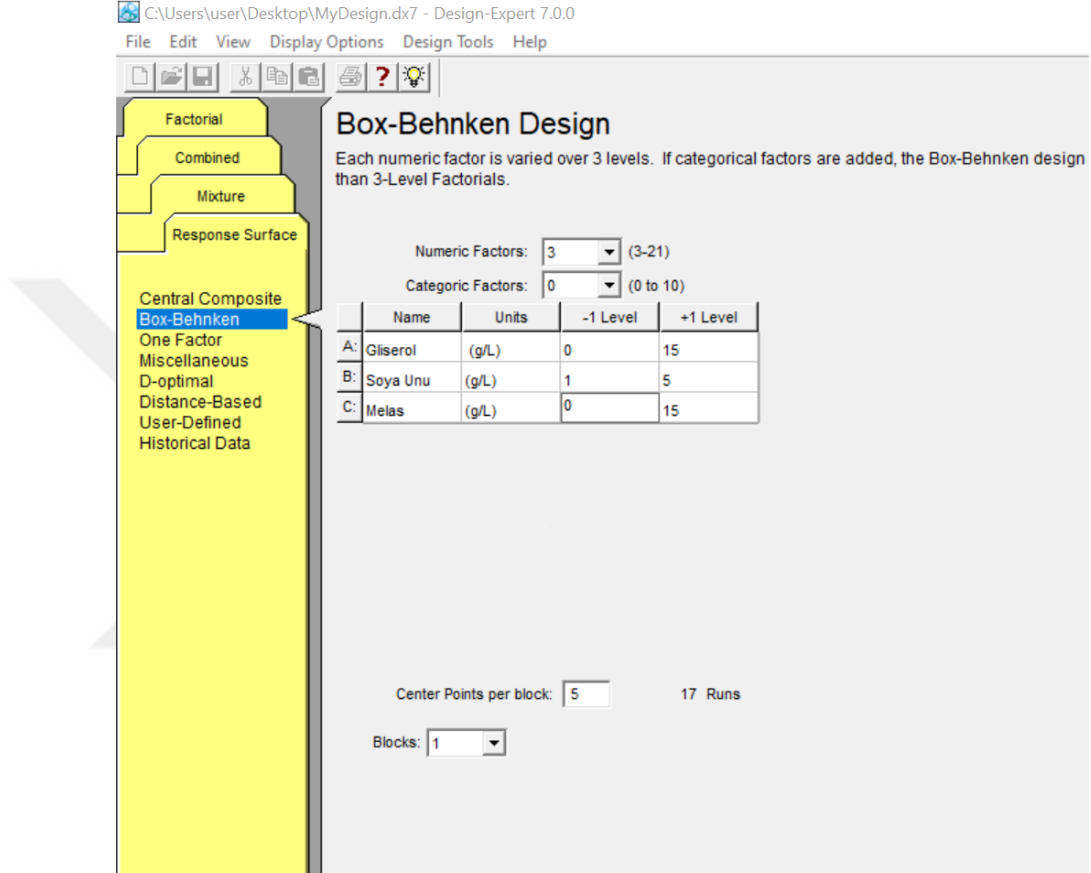
Biyokütle Üretim Ortamı-1	Biyokütle Üretim Ortamı-2	Biyokütle Üretim Ortamı-3
Melas	Soya Unu	Niştasta
Mısır Islatma Şurubu (CSL)	Kuru Maya	Kuru Maya
MgSO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄
K ₂ HPO ₄		
KH ₂ PO ₄		

İncelenen üç farklı besiyerinde kullanılan karbon ve azot kaynaklarının biyokütle üretimine etkileri incelenmiştir. İstatistiksel deney tasarımı için faktör sayısını azaltmak adına en yüksek biyokütle üretiminin gerçekleştiği besiyeri-1 ortamı baz alınıp karbon kaynağı olarak melas seçilmiştir. Hem ucuz hem de temin etmesi kolay olması açısından yüksek biyokütle üretimi sağlayacağı düşünülen soya unu ve gliserol N kaynakları olarak seçilmiştir (Saber, F. et al., 2020; Kumar vd., 2015; Haggag ve El Soud, 2012).

3.2.14.3 RSM kullanılarak optimum üretim ortamı içeriğinin miktarının belirlenmesi

Biyokütle üretimi üzerine etki eden C ve N kaynağı faktörlerinin optimum değerleri, literatürden belirlenen alt ve üst limitleri ile Design Expert (Versiyon 7.0) programının RSM algoritmasında yer alan Box-Behnken tasarımı yardımıyla tespit edilmiştir. Bu algoritma ile biyokütle üretim ortamı için önemli değişkenlerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Üç faktör için formüle edilmiştir (Şekil 3.6). Bu yazılım programı, bu faktörlerin belirlenen alt ve üst limitlerine

göre 17 farklı üretim ortamı ve buna bağlı olarak 17 adet deneme seti elde edilmiştir. Elde edilen deneme setleri verilerinin her biri bir tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Deneme setleri içeriğindeki *Bacillus* izolatının biyokütle üretimi için tasarımın yanıtını bir mL fermentasyon sıvısındaki canlı hücre sayıları (kob/mL) temsil etmektedir.



Şekil 3.6. Faktörlerin Box-Behnken matrisindeki alt-üst limitleri.

3.2.14.4 Optimizasyon modelinin doğrulanması

İstatistiksel deney tasarımı ile elde edilen deneme desenleriyle gerçekleştirilen denemelerle en yüksek biyokütle üretimini sağlayan iki adet deneme seti seçilmiştir. Seçilen bu iki deneme setinin laboratuvar koşullarında her birinin üç tekerrürlü olarak doğrulanması gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Küreselleşme sürecinde, yenilebilir balıkların tüketiminin 2030 yılına kadar 165 milyon tona ulaşacağı projelerle ortaya konmuştur (Ekinci ve ark.,2005). Bu nedenle alternatif balık türlerinin ve balık beslemede kullanılan uygun yem içeriklerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir. Dünya nüfusunun artması ve gün geçtikçe azalan doğal tüketim kaynakları çağımız bilim insanlarını çeşitli arayışlara itmiştir.

Kültür balıkçılığında antibiyotikler yıllardır büyümeyi teşvik etmek, verim artışı sağlamak ve hastalıklardan korunmak amacıyla kullanılmış olup; uzun süre antibiyotik kullanımı ise ortamda dirençli bakterilerin gelişmesine ve üründe kalıntı problemine yol açmaktadır. Bu nedenle hastalıkların etkili bir şekilde kontrolü ve bulaşmanın önlenmesi, balıkların bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi, sindirebilirliğin artması, yem maliyetinin azalması, larval dönemdeki mortalitenin azaltılması, büyümede artışın sağlanması, canlı ağırlık kazancı, stresin olumsuz etkilerinden uzaklaşılması gibi nedenlerden dolayı son yıllarda yemlerde probiyotikler, prebiyotikler ve enzimler gibi katkı maddeleri alternatif olarak kullanılmaktadır.

Balık probiyotikleri, bir veya birkaç yararlı mikroorganizmanın kombinasyonundan meydana gelen, balıklarda sindirim sisteminde bulunan faydalı mikroorganizmaların sayısını arttıran, yemden maksimum düzeyde yararlanmayı sağlayan biyoteknolojik yem katkı maddeleridir (Karademir ve Karademir, 2003). Probiyotikler sindirim sisteminin düzenlenmesinde, büyümenin arttırılmasında, bağışıklık sisteminin ve hastalıklara karşı direncin güçlendirilmesinde büyük öneme sahiptir (Can ve ark., 2011)

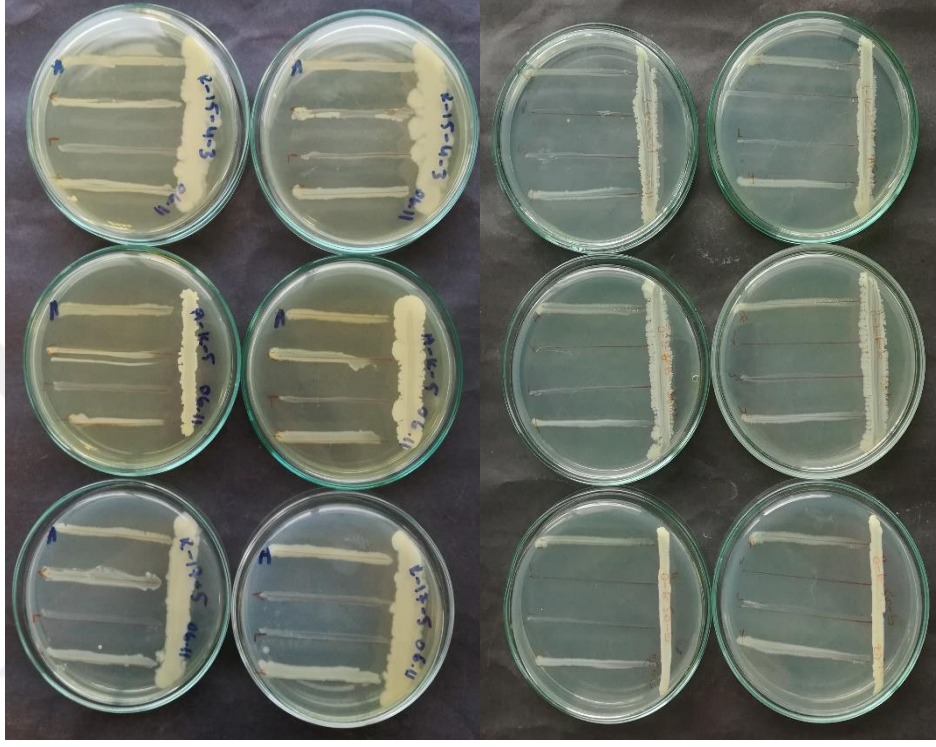
Bu tez çalışması kapsamında çeşitli kaynaklardan izole edilmiş *Bacillus* izolatlarının çeşitli balık patojeni bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olanları belirlendikten sonra bu izolatların, probiyotik olma özellikleri incelenmiştir.

Aşağıda bu özelliklerin incelenmesiyle elde edilen sonuçlar yer almaktadır.

4.1. *Bacillus* İzolatlarının Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

4.1.1. Karşıt Çizgi (Cross-Streak) Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Karşıt çizgi yöntemi, antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde kullanılan basit bir yöntemdir (Şekil 4.1). Bu yöntemde test bakterilerinin inkübasyon süresinin belirlenmesi önemli bir kriterdir.



Şekil 4.1 Karşıt çizgi yöntemiyle antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Tablo 4.1’de, deneme sonucunda antibakteriyel aktivite gösteren *Bacillus* izolatlarına yer verilmiştir. Tabloda da görüldüğü üzere 75 adet *Bacillus* izolatının en az 1 patojene karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus* izolatlarından 6 tanesi, bütün patojen mikroorganizmalar (*A. hydrophila*, *V. anguillarum*, *L. garvieae* ve *Y. ruckeri*) için antibakteriyel aktiviteye sahiptir. *Bacillus* izolatlarının neredeyse hepsi *Y. ruckeri* patojen mikroorganizma için antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Tablo 4.1 En az bir patojen tür için antibakteriyel aktiviteye sahip olan *bacillus* izolatları

Patojenler İzolatlar	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>
Dört Patojen Test Bakterisi için Etkili Olan İzolatlar				
A-K-3	+	+	+	+

Tablo 4.1 En az bir patojen tür için antibakteriyel aktiviteye sahip olan *bacillus* izolatları (devam)

2-K-13-b	+	+	+	+
Ç-3-15-a	+	+	+	+
Ç-3-31	+	+	+	+
Ç-3-23	+	+	+	+
Ç-3-22-a	+	+	+	+
Üç Patojen Test Bakterisi için Etkili Olan İzolatlar				
R-15-2-2		+	+	+
A-K-2		+	+	+
2-K-13-a	+	+		+
K-7-14-1	+	+		+
3-K-S-19	+	+		+
1-K-49-b	+	+		+
4-K-59-a-a	+	+		+
4-K-59-a-b	+	+		+
3-K-10	+	+		+
3-K-S-61	+	+		+
8-4-a	+	+		+
1-K-49-a	+	+		+
T-4-13-a		+	+	+
Ö-4-68		+	+	+
İki Patojen Test Bakterisi için Etkili Olan İzolatlar				
A-K-5		+		+
R-17-6			+	+
A-K-1		+		+
T-3-10-b-b-1	+			+
T-3-12-a		+		+
3-K-S-60-a		+		+
T-4-20-e-a		+		+
Ö-2-55-a		+		+
Ö-4-57-b		+		+
T-4-20-c		+		+
Ç-1-16-a		+		+
Ç-1-16-b		+		+
3-K-S-39-a		+		+
2-K-37		+		+
2-K-5		+		+
3-K-S-1-a		+		+
2-K-35-b		+		+
3-K-S-14		+		+
K-6-22	+			+
B-2-24-a-b			+	+
T-4-14-b			+	+
Ç-3-19	+			+

Tablo 4.1 En az bir patojen tür için antibakteriyel aktiviteye sahip olan *bacillus* izolatları (devam)

Ö-2-55-b	+			+
----------	---	--	--	---

Ö-1-31-b	+			+
Ç-3-23	+			+
3-K-S-31	+			+
10		+		+
Ö-3-21			+	+
T-4-8			+	+
T-3-10			+	+
T-4-9	+			+
T-2-16	+			+
Bir Patojen Test Bakterisi için Etkili Olan İzolatlar				
R-16-1-b			+	
R-15-2-5			+	
R-15-2-6				+
R-17-1-a				+
R-17-1-b				+
R-17-13				+
Ç-3-20-b				+
3-K-S-47-a		+		
Ö-6-50-a		+		
Ö-5-1				+
Ö-2-61-a				+
K-9-37-a				+
Ö-2-38				+
4-Ka-58-1			+	
Ç-2-1-a				+
T-1-18	+			
Ö-4-57-a				+
1-K-49-a				+
Ç-2-30-b				+
T-11-8				+
K-6-22	+			
Ö-4-13-a			+	
T-4-1		+		

Deneme sonunda altı *Bacillus* izolatının patojen test bakterilerinin heisp için antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. *Bacillus* izolatlarından 75 adedinin incelenen dört patojen test bakterisinden en az birine karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

4.1.2. Agar Kuyucuk Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Karşıt çizgi yöntemi kullanılarak antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu kalitatif olarak tespit edilen 75 adet *Bacillus* izolatının agar kuyucuk yöntemi ile antibakteriyel aktivitelerinin kantitatif olarak belirlenmiştir.

30 °C’de aktifleştirilmiş *Bacillus* izolatlarının, LB broth besiyerinde 72 saat üretimi yapılmış ve bu bakterilerin üretmiş olduğu ikincil (sekonder) metabolitlerin antibakteriyel aktiviteleri agar kuyucuk yöntemi ile ölçümlenmiştir. Bu yöntem ile gerçekleştirilen deneme sonucunda patojen mikroorganizmalardan *V. anguillarum* için üç adet *Bacillus* izolatının ve *Y. ruckeri* için iki adet *Bacillus* izolatının kültür sıvılarının antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Aşağıda patojen test bakterilerine karşı etkili olan izolatlar ve bu izolatların oluşturduğu inhibisyon zonlarına ait çap (mm) değerlerine yer verilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 *L. garvieae* ve *Y. ruckeri* Patojen Test Bakterileri için Antibakteriyel aktivite sonuçları

<i>Bacillus</i> İzolat Kodları	<i>L. garvieae</i> için İnhibisyon Zonu (cm)
A-K-3	2,33±0,3
8-4-a	0,86±0,3
Ö-1-31-b	1,8±0,2
<i>Bacillus</i> İzolat Kodları	<i>Y. ruckeri</i> için İnhibisyon Zonu (mm)
Ö-4-68	2,37±0,2
3-K-10	0,93±0,3
Pozitif Kontrol (Amoksisilin 100 µg/ml)	2,53±0,3



Şekil 4.2 Agar kuyucuk difüzyon yöntemiyle *L. garvieae* patojenine karşı antibakteriyel aktivitesi belirlenen izolatlar; a. 8-4-A izolatı, b. Ö-1-31-B izolatı, c. A-K-3 izolatı

Lertcanawanichakul and Sawangnop, (2008) antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi için kullanılan iki yöntemin de bir arada denemelerinin sonuçlarına yer vermişlerdir. Dört *Bacillus* izolatı, iki patojen bakteriye karşı test edilmiştir. Karşıt çizgi yönteminin sonuçlarına göre, tüm *Bacillus* türlerinin iki günlük inkübasyondan sonra inhibitör aktivite sergilediği gözlemlenmiştir. Hatta, bir *Bacillus* izolatının bir günlük inkübasyon sonunda bile, karşıt çizgi yöntemiyle test edildiğinde antibakteriyel aktivite sergileyebildiği verisine ulaşılmıştır. *Bacillus* izolatlarının patojen bakteriler üzerindeki antibakteriyel aktivitesini belirlemede agar kuyucuk difüzyon yönteminin sonuçlarına göre ise; *Bacillus* izolatlarının çoğu 72 saatlik inkübasyondan sonra inhibitör aktivite göstermiştir. Bir izolatın, patojen bakterilerden birine hem karşıt çizgi hem de agar kuyucuk difüzyon yönteminde duyarlı olduğu saptanmıştır. Agar kuyucuk difüzyon yönteminden elde edilen sonuçlar, patojenlerden birinin *Bacillus* izolatlarına diğer patojen bakteriden daha dirençli olduğunu, ancak karşıt çizgi yönteminde bu organizmanın büyümesinin *Bacillus* izolatları tarafından engellendiği gözlemlenmiştir. Agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile 72. saatte 10 mm çapla en yüksek aktivite gözlemlenmiştir.

Santhong et al., (2008) yaptıkları çalışmada da benzer şekilde, *Bacillus* izolatlarından biri, karşıt çizgi yönteminde patojenlerden birine karşı inhibitör aktiviteye sahipken, agar kuyucuk yönteminde bu *Bacillus* izolatının aynı patojen bakteriye daha az inhibisyon aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca antibakteriyel aktivitenin karşıt çizgi yönteminde daha düşük inkübasyon sürelerinde daha yüksek etkinlik gösterdiği, buna karşılık aynı test bakterilerinin inhibisyon etkisinin agar kuyucuk yönteminde daha düşük seviyelerde ve daha uzun inkübasyon süreleri sonunda elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Yapılan tez çalışması sonucunda da literatüre paralel olarak, karşıt çizgi yöntemiyle 75 adet *Bacillus* izolatının dört farklı balık patojeni bakteriden en az birine karşı inhibisyon etki gösterdiği saptanırken, agar kuyucuk yönteminde bu 75 adet *Bacillus* izolatlarından beş tanesinin iki patojen test bakterisine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus* izolatlarından üç tanesinin gram pozitif *L. garvieae* için, iki tanesinin gram negatif *Y. ruckeri* için inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. Agar kuyucuk yönteminde 72 saatin

sonunda saptanan inhibisyon etkileri ayrıca literatürde verilen değerlerden daha düşük olarak hesaplanmıştır.

4.2. *Bacillus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılığının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Antibiyotikler, patojen mikroorganizmaları öldürmek ve büyümesini engellemek için kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar üzerinde hücre zarlarını bozarak, protein veya DNA sentezini engelleyerek ya da enzim aktivitesini inhibe ederek etki göstermektedirler. Düşük toksisitelerine rağmen, yaygın antibiyotik kullanımıyla ilgili önemli çevresel endişeler vardır. Çoğu antibiyotik, vücutta parçalanmayan, vücuttan atıldıktan sonra bile uzun süre aktif kalan kararlı kimyasal bileşiklerdir (Cabello ve diğerleri, 2006).

Birçok sektörde antibiyotiklerin bilinçsizce ve kontrolsüzce kullanılması antibiyotiklere karşı direnç genlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Sıklıkla tarım ve hayvancılık, su ürünleri yetiştiriciliği gibi sektörlerde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin büyümeyi teşvik etme ve hastalıklara karşı canlıları koruma amacıyla uygulandığı bilinmektedir. Bu uygulamaların herhangi bir bilgi ve tecrübeye dayalı olarak yapılmaması antibiyotiklerin bu canlılarda kalıntı oluşturmalarına sebebiyet vermektedir.

Hem gıda ürünlerinin hem de besi hayvanları ve su ürünlerinin insanlar tarafından tüketimi sonucunda bu besinlerden insanlara horizontal gen transferi ile indirek yolla antibiyotik direnç genlerinin aktarılmasına sebep olmaktadır. Bu gen transferi sonucunda insan sağlığı büyük tehlike altına girmektedir. Oluşan direnç genleri insanların antibiyotikler yoluyla uygulanabilecek tedavilerinin başarısız olmasına, hatta bazı insanlarda bu sürecin ölümlerle sonlanmasına sebep olmaktadır.

Antibiyotik kullanımının aşırı olması çevresel sorunlara da yol açmaktadır. Bununla birlikte, su ürünleri yetiştiriciliğindeki antibiyotik kullanımının direnç genlerinin çoğalma hızına etkisi ise su aracılığıyla; ilaç kalıntılarının, mikrobiyal patojenlerin ve direnç genlerinin dağılmasının oldukça kolay bir mekanizmayla gerçekleşmesindendir. Bu sebeple su ürünleri yetiştiriciliğinin antibiyotik direnç

genlerinin oluşması ve taşınmasında tehdit oluşturmaya devam edeceği düşünülmektedir (Done et al., 2015).

Tezin bu aşamasında, probiyotik özellikleri taranan antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş olan 75 tane *Bacillus* izolatının dokuz farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri incelenmiştir.

Tablo 4.3'e göre; disk difüzyon yönteminde zon çaplarına bakılarak, *Bacillus* izolatlarının antibiyotik direnç oluşturup oluşturmadıkları belirlenmiştir. İnhibisyon zon çapının 20 mm ve üzerinde olduğu gözlemlenen izolatların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmedikleri, 15 ve 19 mm zon çapına sahip izolatların antibiyotik direnç genlerinin olduğu ancak bu direncin henüz tolere edilebilir seviyelerde olduğu, zon çapının 14 mm ve daha düşük olduğu belirlenen izolatların ise antibiyotik direnç genlerine sahip olduğu belirlenmiştir (CLSI (n.d.). M02-A11).

Tablo 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarını yorumlama tablosu (CLSI (n.d.). M02-A11)

Etki	İnhibisyon Zon Çapı (mm)
Duyarlı (Susceptible) (D)	≥ 20
Orta Düzey Duyarlı (Intermediate) (OD)	15-19
Dirençli (Resistance) (R)	≤ 14



Şekil 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi örnekleri. a. 1-K-49-B izolatı amoksisilin, tetrasiklin ve neomisine duyarlı; b. Ç-3-20-B izolatı oksitetrasikline karşı orta düzey duyarlı, kanamisin ve eritromisine duyarlı; c. R-17-1-A izolatı amoksisiline dirençli, tetrasiklin ve neomisine duyarlı.

Tablo 4.4 İncelenen *Bacillus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

ANTİBİYOTİKLER* BACİLLUS İZOLAT KODLARI	AMX		TET		NEO		GEN		PEN		STR		O.TET		K		ERY	
	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ	Zon Çapı (mm)	ETKİ
Ö-4-57-b	31,3±1,15	D	29,3±1,15	D	20,6±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	22±2	D	20,6±1,15	D	24±2	D	19,3±1,15	O.D.	32,6±3,05	D
T-3-12-a	28,6±1,15	D	24,6±1,15	D	14,6±1,15	O.D.	24±0	D	24,6±1,15	D	22,6±1,15	D	17,3±1,15	O.D.	25,3±1,15	D	34,6±2,30	D
R-15-2-2	32,6±1,15	D	28±2	S	21,3±2,3	D	22±2	D	23,3±3,05	D	15,3±1,15	O.D.	18,6±1,15	O.D.	16±0	O.D.	13,3±2,3	R
1-K-49-b	34±2	D	24,6±1,15	D	22±0	D	24,6±1,15	D	31,3±1,15	D	21,3±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	24±0	D	30,6±1,15	D
R-17-1-a	0	R	16	O.D.	20±0	D	20±0	D	0	R	22±0	D	12,6±1,15	R	15,3±1,15	O.D.	28,6±1,15	D
B-2-24-a-b	33,3±1,15	D	25,3±1,15	D	18±0	O.D.	23,3±1,15	D	26,6±1,15	D	19,3±1,15	O.D.	14,6±2,30	O.D.	22±2	D	28,6±1,15	D
Ç-3-20-b	30±0	D	24,6±2,3	D	22,6±1,15	D	28±0	D	27,3±1,15	D	26±0	D	16±0	O.D.	23,3±1,15	D	32±2	D
Ç-3-19	31,3±1,15	D	20,6±1,15	D	22,6±1,15	D	27,3±1,15	D	27,3±1,15	D	22±0	D	14,6±1,15	O.D.	26±0	D	31,3±1,15	D
T-1-18	40±0	D	28±2	D	19,3±1,15	O.D.	26,6±1,15	D	32,6±1,15	D	26±2	D	18±0	O.D.	25,3±1,15	D	24±0	D
T-4-8	22±0	D	20±0	D	18,6±1,15	O.D.	28±2	D	24±2	D	21,3±1,15	D	14,6±1,15	O.D.	22,6±1,15	D	26,6±1,15	D
T-4-14-b	27,3±1,15	D	19,3±1,15	IO.D.	23,3±1,15	D	20,6±1,15	D	22,6±1,15	D	18,6±1,15	O.D.	11,3±1,15	R	23,3±1,15	D	29,3±1,15	D
4-Ka-59-a-b	33,3±1,15	D	22,6±1,15	D	22,6±1,15	D	26,6±1,15	D	28,6±1,15	D	20,6±1,15	D	13,3±1,15	R	23,3±1,15	D	32,6±1,15	D
2-K-13-b	31,3±3,05	D	27,3±1,15	D	20,6±1,15	D	26,6±1,15	D	24,6±1,15	D	21,3±1,15	D	16±2	O.D.	24±2	D	31,3±1,15	D
T-2-16	29,3±1,15	D	23,3±1,15	D	21,3±1,15	D	24±0	D	26±0	D	22±0	D	18,6±1,15	O.D.	24,6±1,15	D	31,3±1,15	D
4-Ka-58-1	36±2	D	32±2	D	19,3±1,15	O.D.	22,6±1,15	D	24,6±3,05	D	20±2	D	36,6±1,15	D	21,3±1,15	D	23,3±2,30	D
Ö-2-38	28±2	D	36,6±1,15	D	20±0	D	23,3±2,30	D	25,3±1,15	D	24±2	D	34,6±1,15	D	22±2	D	30±0	D
Ç-2-1-a	24±3,46	D	22±3,46	D	20±0	D	23,3±4,16	D	14,6±3,05	O.D.	18,6±2,30	O.D.	13,3±2,30	R	22,6±1,15	D	30,6±1,15	D
Ö-2-61-a	28±2	D	24,6±1,15	D	20±0	D	24±2	D	15,3±3,05	O.D.	19,3±1,15	O.D.	18,6±2,30	O.D.	22,6±2,30	D	34±2	D

* Antibiyotikler duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: AMX, amoksisilin; TET, tetrasiklin; NEO, Neomisin; GEN, Gentamisin; PEN, Penisilin; STR, Streptomisin; O. TET, Oksitetrasiklin; K, Kanamisin; ERY, Eritromisin

**D: Duyarlı, O.D.: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Tablo 4.4 (Devam)

R-16-1-b	10±0	R	27,3±1,15	D	19,3±1,15	O.D.	20±0	D	0	R	22±0	D	26±0	D	20±0	D	22±0	D
Ö-4-57-a	32±2	D	28,6±2,30	D	17,3±1,15	O.D.	21,3±1,15	D	29,3±2,30	D	20,6±2,30	D	23,3±1,15	D	22±0	D	24,6±1,15	D
Ö-2-55-a	26,6±3,05	D	19,3±1,15	O.D.	17,3±1,15	O.D.	21,3±1,15	D	26,6±1,15	D	20	D	16,6±1,15	O.D.	23,3±1,15	D	29,3±1,15	D
Ö-4-68	30,6±1,15	D	22,6±1,15	D	20,6±1,15	D	22±2	D	24,6±1,15	D	20,6±1,15	D	16±0	O.D.	22,6±1,15	D	30±0	D
Ç-3-15-a	28,6±2,30	D	28±2	D	18±2	O.D.	20,6±1,15	D	28,6±1,15	D	24±2	D	22±2	D	21,3±2,30	D	27,3±1,15	D
T-4-20-c-b	28,6±1,15	D	24,6±1,15	D	20±0	D	24±0	D	28,6±1,15	D	20±0	D	18±3,46	O.D.	24±0	D	28,6±2,3	D
R-17-13	32±2	D	27,3±1,15	D	20,6±1,15	D	22,6±1,15	D	26±2	D	23,3±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	24,6±1,15	D	30±2	D
R-17-1-b	10±2	R	17,3±1,15	O.D.	15,3±1,15	O.D.	15,3±1,15	O.D.	3,33±3,05	R	17,3±1,15	O.D.	14,6±1,15	O.D.	16,6±1,15	O.D.	22±2	D
3-K-S-1-a	34±0	D	32±0	D	22±0	D	20,6±1,15	D	21,3±3,05	D	21,3±1,15	D	26±0	D	26±0	D	24,6±1,15	D
Ö-1-31-b	26,6±4,16	D	23,3±1,15	D	20,6±1,15	D	24±0	D	19,3±3,05	O.D.	20±0	D	16,6±1,15	O.D.	22,6±1,15	D	33,3±2,30	D
Ç-1-16-a	22,6±1,15	D	26±0	D	18,6±1,15	O.D.	20±0	D	18,6±1,15	O.D.	20±0	D	14,6±1,15	O.D.	20,6±1,15	D	28±0	D
T-3-10	33,3±1,15	D	30±0	D	22±0	D	26±0	D	21,3±1,15	D	22,6±1,15	D	18±0	O.D.	24±0	D	31,3±1,15	D
Ö-3-21	32±0	D	25,3±1,15	D	20±0	D	20,6±1,15	D	30±0	D	21,3±1,15	D	20,6±1,15	D	25,3±1,15	D	28,6±1,15	D
Ç-1-16-b	27,3±1,15	D	26,6±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	15,3±1,15	O.D.	21,3±1,15	D	20±0	D	20±0	D	21,3±1,15	D	26,6±1,15	D
T-3-10-b-b-1	35,3±1,15	D	42±0	D	20±0	D	20±0	D	31,3±1,15	D	18±0	O.D.	34,6±1,15	D	23,3±1,15	D	36±0	D
3-K-S-19	28,6±1,15	D	28,6±1,15	D	22,6±1,15	D	24±0	D	25,3±1,15	D	22±0	D	25,3±1,15	D	24,6±1,15	D	30,6±1,15	D
T-4-9	28,6±2,30	D	26±2	D	20,6±1,15	D	20±0	D	15,3±1,15	O.D.	20,6±1,15	D	12±3,46	R	21,3±1,15	D	32,6±1,15	D
Ç-3-22-a	31,3±1,15	D	30,6±1,15	D	18±0	O.D.	20,6±1,15	D	25,3±1,15	D	24±0	D	20±0	D	23,3±1,15	D	28,6±1,15	D
3-K-S-61	32±2	D	27,3±1,15	D	20,6±1,15	D	22,6±1,15	D	26±2	D	23,3±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	24,6±1,15	D	30±2	D
A-K-5	31,3±1,15	D	25,3±1,15	D	20±0	D	20±0	D	22,6±1,15	D	20±0	D	18,6±1,15	O.D.	23,3±1,15	D	30,6±1,15	D
Ö-2-55-b	28,6±2,3	D	22±3,46	D	18,6±2,3	O.D.	24±0	D	24±0	D	20±0	D	25,3±1,15	D	22,6±1,15	D	24,6±1,15	D
Ç-2-30-b	26,6±1,15	D	20,6±1,15	D	14±0	R	19,3±1,15	O.D.	20±2	D	20±0	D	18,6±2,3	O.D.	19,3±1,15	O.D.	22±2	D

* Antibiyotikler duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: AMX, amoksisilin; TET, tetrasiklin; NEO, Neomisin; GEN, Gentamisin; PEN, Penisilin; STR, Streptomisin; O. TET, Oksitetrasiklin; K, Kanamisin; ERY, Eritromisin

**D: Duyarlı, O.D.: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Tablo 4.4 (Devam)

2-K-5	22,6±1,15	D	20±2	D	14±0	R	20±0	D	18±0	O.D.	20,6±1,15	D	14,6±2,3	O.D.	19,3±1,15	O.D.	26±3,46	D
K-9-37-a	25,3±4,16	D	22±0	D	17,3±1,15	O.D.	23,3±1,15	D	23,3±3,05	D	22±2	D	16,6±1,15	O.D.	22,6±1,15	D	29,3±1,15	D
3-K-S-14	22,6±3,05	D	20±0	D	17,3±1,15	O.D.	20±2	D	20,6±3,05	D	20±0	D	16±0	O.D.	22±0	D	28,6±1,15	D
A-K-2	28,6±3,05	D	26±2	D	16,6±1,15	O.D.	20±0	D	24±4	D	20±0	D	21,3±2,3	D	22±0	D	23,3±1,15	D
3-K-S-47-a	26,6±1,15	D	22,6±2,3	D	15,3±1,15	O.D.	22,6±3,05	D	21,3±4,16	D	20±2	D	20±0	D	23,3±1,15	D	23,3±1,15	D
Ö-5-1	33,3±1,15	D	24,6±1,15	D	20±0	D	20,6±1,15	D	31,3±3,05	D	22,6±1,15	D	15,3±1,15	O.D.	24,6±1,15	D	24,6±1,15	D
T-4-15	22±2	D	21,3±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	20±0	D	22,6±1,15	D	18,6±1,15	O.D.	14,6±1,15	O.D.	23,3±1,15	D	29,3±3,05	D
R-15-2-5	9,33±1,15	R	27,3±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	16±0	O.D.	6±0	R	16,6±1,15	O.D.	24±2	D	19,3±1,15	O.D.	22±0	D
Ç-3-23	26±2	D	24,6±1,15	D	22,6±1,15	D	24,6±1,15	D	26±2	D	25,3±2,3	D	20±2	D	20±2	D	30,6±3,05	D
1-K-49-a	20,6±1,15	D	22±0	D	20±0	D	26±2	D	18,6±4,6	O.D.	19,3±1,15	O.D.	16,6±1,15	O.D.	20,6±1,15	D	26,6±2,3	D
K-6-22	18,6±5,03	O.D.	20±0	D	20±0	D	24±0	D	22±3,46	D	20,6±1,15	D	14±3,46	R	22±2	D	25,3±1,15	D
R-15-2-6	4,6±1,15	R	27,3±1,15	D	18,6±1,15	O.D.	20±0	D	0	R	20±0	D	29,3±1,15	D	20±0	D	30±0	D
10	30±4	D	24±4	D	19,3±1,15	O.D.	20±0	D	21,3±1,15	D	20,6±1,15	D	15,3±1,15	O.D.	22±2	D	32,6±3,05	D
3-K-10	32,6±3,05	D	26±2	D	18±0	O.D.	22±0	D	24,6±6,11	D	20,6±3,05	D	18,6±3,05	O.D.	26,6±3,05	D	30,6±1,15	D
8-4-a	30±0	D	26,6±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	16±0	O.D.	27,3±1,15	D	14,6±1,15	O.D.	21,3±1,15	D	20±0	D	30±0	D
A-K-3	29,3±1,15	D	28,6±1,15	D	29,3±1,15	D	24,6±1,15	D	27,3±1,15	D	20,6±1,15	D	24,6±1,15	D	26±0	D	30±0	D
Ö-4-13-a	33,3±3,05	D	26±2	D	20±0	D	17,3±1,15	O.D.	27,3±2,30	D	18±0	O.D.	20±0	D	20±0	D	27,3±2,30	D
3-K-S-39-a	25,3±1,15	D	23,3±1,15	D	16±0	O.D.	19,3±1,15	O.D.	19,3±2,30	O.D.	20,6±1,15	D	17,3±1,15	O.D.	20±0	D	23,3±1,15	D
4-Ka-59-a-a	26,6±1,15	D	23,3±1,15	D	15,3±2,3	O.D.	20±0	D	17,3±4,16	O.D.	20,6±1,15	D	11,3±5,03	R	22±0	D	28±2	D
R-17-6	33,3±1,15	D	35,3±1,15	D	18±0	O.D.	18±0	O.D.	28±0	D	12,6±1,15	R	30,6±1,15	D	16,6±1,15	O.D.	25,3±1,15	D
K-7-14-1	27,3±1,15	D	24,6±1,15	D	20±0	D	23,3±1,15	D	20,6±2,30	D	19,3±1,15	O.D.	16±0	O.D.	24,6±1,15	D	30±0	D
2-K-35-b	25,3±1,15	D	22,6±1,15	D	18±2	O.D.	23,3±1,15	D	20±0	D	18,6±1,15	O.D.	16,6±1,15	O.D.	22±0	D	27,3±1,15	D

*Antibiyotikler duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: AMX, amoksisilin; TET, tetrasiklin; NEO, Neomisin; GEN, Gentamisin; PEN, Penisilin; STR, Streptomisin; O. TET, Oksitetrasiklin; K, Kanamisin; ERY, Eritromisin

**D: Duyarlı, O.D.: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Tablo 4.4 (Devam)

2-K-37	36,6±1,15	D	38±2	D	20±0	D	20±0	D	23,3±7,57	D	21,3±1,15	D	35,3±1,15	D	24±0	D	29,3±1,15	D
T-11-8	28±2	D	25,3±1,15	D	20±0	D	19,3±1,15	O.D.	21,3±2,30	D	20±0	D	18±0	O.D.	22±0	D	24,6±1,15	D
Ö-6-50-a	22,6±1,15	D	25,3±1,15	D	18,6±1,15	O.D.	20,6±1,15	D	21,3±1,15	D	21,3±1,15	D	21,3±1,15	D	22±2	D	27,3±1,15	D
3-K-S-60-a	23,3±3,05	D	22±2	D	19,3±1,15	O.D.	22±0	D	16,6±4,61	O.D.	20,6±1,15	D	14,6±1,15	O.D.	20,6±1,15	D	22,6±3,05	D
Ç-3-31	32±2	D	30±0	D	20±0	D	20±0	D	18,6±1,15	O.D.	21,3±1,15	D	20,6±1,15	D	23,3±1,15	D	29,3±1,15	D
T-4-13-a	31,3±1,15	D	25,3±1,15	D	21,3±1,15	D	22,6±1,15	D	20±0	D	22±0	D	14±0	R	22,6±1,15	D	34,6±1,15	D
3-K-S-31	28±2	D	26,6±1,15	D	20±0	D	20,6±1,15	D	25,3±1,15	D	15,3±1,15	O.D.	26,6±1,15	D	20±0	D	30±0	D
A-K-1	30,6±1,15	D	30±0	D	20±0	D	21,3±2,3	D	23,3±3,05	D	20,6±1,15	D	20,6±3,05	D	22±2	D	32,6±1,15	D
2-K-13-a	26±0	D	20,6±1,15	D	19,3±1,15	O.D.	22,6±1,15	D	23,3±1,15	D	19,3±1,15	O.D.	14±0	R	20±0	D	23,3±1,15	D
T-4-20-e-a	27,3±2,30	D	24±2	D	21,3±2,30	D	22,6±1,15	D	20,6±1,15	D	20±0	D	15,3±1,15	O.D.	24±0	D	27,3±1,15	D

* Antibiyotikler duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: AMX, amoksisilin; TET, tetrasiklin; NEO, Neomisin; GEN, Gentamisin; PEN, Penisilin; STR, Streptomisin; O. TET, Oksitetrasiklin; K, Kanamisin; ERY, Eritromisin

**D: Duyarlı, O.D.: Orta Duyarlı, R: Dirençli

Tablo 4.5 İncelenen *Bacillus* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarına göre dağılımı

ETKİ	İncelenen İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları (n)*								
	AMX	TET	NEO	GEN	PEN	STR	O.TET	K	ERY
Duyarlı	66	68	41	62	56	57	27	64	74
Orta Duyarlı	4	4	32	13	14	17	39	6	0
Dirençli	5	3	2	0	5	1	9	0	1

* Antibiyotikler duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: AMX, amoksisilin; TET, tetrasiklin; NEO, Neomisin; GEN, Gentamisin; PEN, Penisilin; STR, Streptomisin; O. TET, Oksitetrasiklin; K, Kanamisin; ERY, Eritromisin

Tablo 4.6 Antibiyotik dirence sahip *Bacillus* izolatları

ANTİBİYOTİKLER BACİLLUS İZOLAT KODLARI	AMX	TET	NEO	GEN	PEN	STR	O.TET	K	ERY
R-15-2-2									R
R-17-1-A	R				R		R		
T-4-14-B							R		
4-K-59-A-B							R		
Ç-2-1-A							R		
R-16-1-B	R				R				
R-17-1-B	R				R				
T-4-9							R		
Ç-2-30-B			R						
2-K-5			R						
R-15-2-5	R				R				
R-P-15-2		R							
R-15-2-6	R				R				
4-K-59-A-A							R		
R-17-6						R			
T-4-13-A							R		
2-K-13-A							R		
R-P-15-1		R							
K-6-22							R		
R-T-3-A		R							

* Antibiyotik duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: Amoksisilin (AML), Tetrasiklin (T), Neomisin (N), Gentamisin (CN), Penisilin (P), Streptomisin (S), Oksitetrasiklin (OX), Kanamisin (K), Eritromisin

**R:Dirençli

Tablo 4.6.'da görüldüğü gibi, disk difüzyon yöntemi ile 75 adet *Bacillus* izolatında antibiyotik direnç genleri belirlenmiş ve bu izolatlardan 20 tanesinin en az bir antibiyotiğe karşı direnç geni taşıdığı saptanmıştır. 20 izolat arasından dokuz adedinin oksitetrasikline direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu değerler ile en fazla direnç geni oluşturan antibiyotiğin oksitetrasiklin olduğu saptanmıştır. Bu antibiyotiği beş adet izolatın ortak olarak direnç oluşturduğu penisilin ve amoksisilin antibiyotikleri takip etmektedir. Tetrasiklin antibiyotiği için üç adet izolatın direnç oluşturduğu belirlenmiştir. Neomisin antibiyotiği için iki adet izolatın direnç oluşturduğu belirlenmiştir. Streptomisin ve eritromisin antibiyotiklerine de birer adet izolatın direnç oluşturduğu gözlemlenmiştir. Su ürünleri yetiştiriciliği faaliyetlerinde oksitetrasiklin kullanımının yabani ve ticari balıkların solungaçlarından ve bağırsaklarından alınan örneklerin incelenmesi ile antibiyotik direncin oluşmasıyla ilgili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca dirençli bakteri türleri, doğal çevreye daha fazla antibiyotiğin ulaşmasına yol açarak hastalıkları tedavi etmek için daha yüksek dozlama seviyeleri gerektirmektedir (Shanmugam et al., 2011).

Tablo 4.7 Antibiyotik duyarlılık için farklı yorum kriterleri (CLSI ve EUCAST)

	CLSI
	Zon Çapı(mm)
Duyarlı	≥ 20
Orta Duyarlı	15-19
Dirençli	< 14
	EUCAST
	Zon Çapı(mm)
Duyarlı	≥ 20
Dirençli	< 15

Antibiyotik direncine sahip olan izolatların belirlenmesinde CLSI ve EUCAST 'in belirlediği iki farklı değerlendirme kriterleri sınır aralığı değerleri vardır. Tablo 4.7 de görüldüğü gibi bunlardan CLSI üç farklı sınır aralığı belirlemiş ve değerlendirmeleri duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak yapmıştır; EUCAST ise iki farklı sınır aralığı belirlemiş, duyarlı ve dirençli olarak bu değerlendirmeleri yorumlamıştır (Baysallar ve ark., 2019).

Çalışmada, antibiyotik direnç genlerinin oluşmasının büyük problemlere yol açabileceği bilindiği için probiyotik potansiyeli olan *Bacillus* izolatlarından, dokuz antibiyotikten en az birine bile direnç geni taşıyan izolatlar probiyotik olabilme potansiyelleri yönünden elenmişlerdir. Buna göre incelenen 75 adet *Bacillus* izolatından antibiyotik dirençliliği saptanan 20 tanesi elenerek geri kalan 55 tane izolatla çalışmalara devam edilmiştir

4.3. *Bacillus* İzolatlarının Mide Sıvısı Toleransının Belirlenmesi

Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan probiyotiklerin sahip olması gereken en önemli özelliklerden birisi de mide sıvısının asidik pH 'sından ve enzimlerinden (pepsin ve tripsin) etkilenmeden bakterilerin balık bağırsağına ulaşabilmesidir. Balıkların gastrointestinal sistemleri incelendiğinde bir balığın mide sıvısı pH 'sının yaklaşık olarak 2,5 olduğu bilinmektedir. Bu sebeple bu denemede balıkların mide sıvısının taklit edildiği sentetik bir mide sıvısı hazırlanmıştır ve pepsin içeren bu sıvının pH'sı 2,5'a ayarlanmıştır. Probiyotik özellikleri incelenen bir bakterinin, balığın midesinde bir süre kaldıktan sonra bağırsaklara geçmesi için gerekli süre literatüre bağlı olarak üç saat kabul edilmektedir (Thankappan et al., 2015). Çalışmamızda da mide sıvısı toleransının belirlenebilmesi için incelenen *Bacillus* izolatları sentetik mide sıvısı içerisinde üç saat inkübe edilmiş, ardından mide sıvısına konduktan hemen sonra (0. saat) ve üç saatlik inkübasyon sonunda yapılan sayım sonuçlarına göre bakterilerin bağırsağa geçişindeki % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.8 İncelenen *Bacillus* izolatlarının mide sıvısı toleransı (% canlılık)

<i>Bacillus</i> İzolatları	0. Saatteki canlı hücre sayısı (kob/ml)	3. Saatteki canlı hücre sayısı (kob/ml)	% Canlılık
Ç-3-20-b	3,8x10 ²	2,3	0,6
2-K-13-b	1,2x10 ²	3,7	2,97
Ö-2-61-a	2,2x 10 ²	3,7x10 ¹	16,86
T-4-20-c-b	6,3x10 ³	3,1x10 ³	48,57
T-3-12-a	7,0x10 ²	8,8x10 ¹	12,62
Ç-3-19	7,9x10 ²	2,5x10 ²	32,21
T-2-16	4,7x10 ¹	3,5	7,45

Tablo-4.8 Devam

Ö-4-57-a	$1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	22,67
Ç-3-15-a	$1,6 \times 10^2$	$4,8 \times 10^1$	29,60
1-K-49-b	$1,9 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	19,72
T-1-18	$1,9 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$	42,96
Ö-2-38	$2,1 \times 10^3$	$4,4 \times 10^2$	21,74
4-Ka-58-1	$2,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	59,94
3-K-S-31	$2,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	51,23
T-4-8	$2,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	4,88
Ö-4-68	$1,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	61,29
A-K-1	$1,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$	20,28
3-K-S-1-a	$1,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	64,61
T-4-20-e-a	$8,9 \times 10^2$	7,2	0,80
Ö-4-57-b	$9,6 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	13,22
Ö-1-31-b	$2,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	72,19
Ç-3-22-a	$3,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	75,77
Ö-2-55-a	$1,6 \times 10^5$	$1,19 \times 10^5$	75,14
Ç-1-16-b	$3,3 \times 10^4$	$2,60 \times 10^4$	79,66
Ö-3-21	$1,2 \times 10^4$	$5,35 \times 10^3$	43,50
Ç-3-31	$7,4 \times 10^3$	$1,44 \times 10^3$	19,38
Ö-2-55-b	6×10^1	$1,40 \times 10^1$	23,33
T-3-10	$4,3 \times 10^4$	$1,55 \times 10^4$	36,34
3-K-S-61	$1,1 \times 10^4$	$1,33 \times 10^3$	12,49
T-3-10-b-b-1	$3,1 \times 10^4$	$6,05 \times 10^3$	19,64
A-K-5	$1,5 \times 10^3$	$0,98 \times 10^2$	6,41
3-K-S-19	$6,4 \times 10^3$	$2,74 \times 10^2$	4,31
Ç-1-16-a	$1,3 \times 10^4$	$2,23 \times 10^2$	1,78
A-K-2	$2,7 \times 10^5$	$1,43 \times 10^4$	5,40
Ö-5-1	$1,1 \times 10^4$	$3,11 \times 10^2$	2,78
Ç-3-23	$5,5 \times 10^3$	$2,08 \times 10^3$	37,6
K-9-37-a	$1,4 \times 10^4$	$3,70 \times 10^3$	26,04
Ö-6-50-a	$1,1 \times 10^2$	$0,40 \times 10^2$	35,40
3-K-S-47-a	$1,4 \times 10^4$	$4,70 \times 10^3$	34,46
3-K-S-14	$1,3 \times 10^5$	$8,43 \times 10^3$	6,64
3-K-S-60-a	$3,1 \times 10^3$	$1,60 \times 10^1$	0,53
T-11-8	$1,8 \times 10^2$	$1,70 \times 10^1$	9,29
K-7-14-1	$4,3 \times 10^2$	0,3	0,07

Tablo-4.8 Devam

T-4-15	1,1x10 ³	1,2x10 ²	11,93
2-K-35-b	4,3x10 ²	0,7x10 ¹	1,62
1-K-49-a	2,1x10 ²	4,4x10 ¹	20,95
B-2-24-a-b	3,3x10 ²	5	1,51
Ö-2-61-a	6,7x10 ¹	5,3	7,91
A-K-3	2,6x10 ³	7,3x10 ²	28,19
10	8,3x10 ²	3,6x10 ²	43,37
Ö-4-13-a	1,6x10 ²	2,2x10 ¹	13,03
8-4-a	6,3x10 ²	1,1x10 ²	16,35
2-K-37	2,6x10 ³	9,8x10 ²	37,26
3-K-10	5,6x10 ²	2,4x10 ²	42,63
3-K-S-39-a	2,1x10 ²	1,1x10 ¹	5,29

Çalışmamızda incelenen *Bacillus* izolatlarının birçoğu için mide sıvısı toleransı değerleri çok düşük seviyelerde hesaplanmıştır. Tablo 4.8 de yer alan 55 adet *Bacillus* izolatından % canlılık değeri 40 ve üzeri olan 13 adet *Bacillus* izolatı (%42-%80) saptanmıştır. **Ç-1-16-b** izolatı **%79,66** değeriyle % canlılık değeri en yüksek hesaplanan izolat olmuştur. Geri kalan 42 tane izolatın % canlılık değerleri oldukça düşük (%0,07-%38) bulunmuştur. Bunlardan 28 tane izolatın % canlılık değeri %20 ve altında hesaplanmıştır. Thankappan et al., 2015, yaptıkları çalışmada üç farklı probiyotik izolatın mide sıvısı toleranslarını üç saatlik zaman diliminin sonunda sıfıncı dakikadaki kontrol ile karşılaştırmış (%23-%59) ve izolatlarından en yüksek yüzde canlılığı 59,01 olarak hesaplamıştır.

Bir mikroorganizmanın balık probiyotiği olarak kullanılabilmesi için mideden bağırsaklara geçişte canlılığını koruması gerekmektedir. Bu canlılık değerinin %40 ve üzerinde olması mikroorganizmanın başarılı bir probiyotik aday olacağını göstermektedir (Ahire et al., 2011). Bu değer belirlenmesinde en önemli kriterler arasında bağırsağa ulaşan mikroorganizmanın bu bölgede de canlılığını sürdürmesinin oldukça zorlu olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca probiyotik adayı mikroorganizma bağırsakta var olan mikrobiyal flora ve patojenler ile de rekabet edebilir ve bağırsak yüzeyine tutunabilir olmalıdır. (Thankappan et al., 2015; Ahire et al., 2011).

4.4 *Bacillus* İzolatlarının Asidik pH'larda Optimum Büyümesinin İncelenmesi

Probiyotik özellikleri incelenen, mide sıvısı asitliği için toleransa sahip olduğu belirlenmiş yani sentetik mide sıvısında üç saat sonra canlılık yüzde değeri %40 ve üzerinde olan olan 13 tane *Bacillus* izolatının farklı asidik pH (pH;1,0, 2,0 ve 4,0) değerlerinde dört saatlik sürenin sonunda optimum büyüme pH'sının belirlenmesi için yapılmış olan çalışmadır.

Tablo 4.9 İncelenen *Bacillus* izolatlarının Mc. Farland 0,5'e Göre Başlangıç Canlı Hücre Sayısı (kob/ml)

İzolat No	Canlı Hücre Sayısı (kob/ml)
Ö-4-68	1,1x10 ⁸
3-K-S-31	9,3x10 ⁷
T-4-20-C-B	8,6x10 ⁷
3-K-S-1-A	7,4x10 ⁷
4-KA-58-1	8,7x10 ⁷
Ö-2-55-A	7,9x10 ⁷
T-1-18	8,5x10 ⁷
Ç-1-16-B	9,6x10 ⁷
Ç-3-22-A	9,1x10 ⁷
Ö-1-31-B	8,2x10 ⁷
Ö-3-21	8,9x10 ⁷
10	9,7x10 ⁷
3-K-10	9,6x10 ⁷

Tablo 4.10 'da İncelenen *Bacillus* izolatlarının asidik pH'larda optimum büyümesinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmaya ait sonuçlar yer almaktadır. Çalışmamızda asidik pH 'larda optimum büyümenin belirlenmesi için yapılan denemede pH 1,0 ve pH 2,0 de yüzde canlılık yok denecek kadar azdır. pH 2,0 'de % 37,6'lık değerle Ö-1-31-b en yüksek canlılığın (kob/ml) belirlendiği izolat olmuştur. Mide sıvısı pH'ı olan 2,5 için %40 üzerinde canlılık gösteren izolatların, 2,0 ve daha düşük pH 'larda canlılıklarını yitirdikleri saptanmıştır. pH 4,0 'de ise neredeyse bütün izolatlarda yüksek yüzde canlılıklar hesaplanmıştır. pH 4,0 'te en

Tablo 4.10 İncelenen *Bacillus* izolatlarının asidik pH'larda dördüncü saat sonunda % canlılık değerleri

İzolat No	Süre	pH:1		pH:2		pH:4	
		Canlı hücre sayısı (kob/ml)	% Canlılık	Canlı hücre sayısı (kob/ml)	% Canlılık	Canlı hücre sayısı (kob/ml)	% Canlılık
Ö-4-68	0. SAAT	1,4x10 ²	9,6	5,7x10 ³	10,5	3,9x10 ³	110,3
	4. SAAT	1,3x10 ¹		0,6x10 ³		4,3x10 ³	
3-K-S-31	0. SAAT	1,2x10 ³	6,9	5,9x10 ³	8,5	9,3x10 ³	104,9
	4. SAAT	8,6x10 ¹		6,0x10 ²		9,7x10 ³	
T-4-20-C-B	0. SAAT	8,1x10 ²	0,3	1,8x10 ³	4,1	5,7x10 ³	93,9
	4. SAAT	2,5		0,7x10 ²		5,4x10 ³	
3-K-S-1-A	0. SAAT	5,6x10 ³	2	9,1x10 ³	11,6	4,6x10 ³	32,6
	4. SAAT	1,1x10 ²		1,1x10 ³		1,5x10 ³	
4-KA-58-1	0. SAAT	5,8x10 ³	0,3	6,2x10 ³	5,4	1,4x10 ⁴	28,9
	4. SAAT	0,2x10 ²		3,3x10 ²		4,1x10 ³	
Ö-2-55-A	0. SAAT	0,1x10 ³	5	5,8x10 ²	2,3	6,6x10 ³	11,3
	4. SAAT	0,5x10 ¹		1,4x10 ¹		7,5x10 ²	
T-1-18	0. SAAT	1,1x10 ¹	18,2	2,5x10 ¹	8	1,5x10 ¹	170
	4. SAAT	0,2x10 ¹		0,2x10 ¹		2,6x10 ¹	
Ç-1-16-B	0. SAAT	2,2x10 ²	0,5	1,0x10 ³	11	1,0x10 ³	10,8
	4. SAAT	0,1x10 ¹		1,1x10 ²		1,1x10 ²	
Ç-3-22-A	0. SAAT	1,8x10 ⁴	3,1	1,9x10 ⁵	7,4	0,2x10 ⁵	84
	4. SAAT	5,5x10 ²		1,4x10 ⁴		1,7x10 ⁴	
Ö-1-31-B	0. SAAT	1,4x10 ⁴	2,4	1,6x10 ⁴	27,1	1,4x10 ⁴	37,6
	4. SAAT	3,4x10 ²		4,2x10 ³		5,3x10 ³	
Ö-3-21	0. SAAT	5,8x10 ³	0,5	7,8x10 ³	15,7	1,8x10 ³	73,8
	4. SAAT	2,7x10 ¹		1,2x10 ³		1,3x10 ³	
10	0. SAAT	1,7x10 ⁴	5,4	1,6x10 ⁴	14,6	1,4x10 ⁴	275
	4. SAAT	9,3x10 ²		2,4x10 ³		3,9x10 ⁴	
3-K-10	0. SAAT	6,1x10 ³	10,9	6,2x10 ³	9,6	1,5x10 ⁴	25,3
	4. SAAT	6,7x10 ²		5,9x10 ²		3,9x10 ³	

yüksek yüzde canlılık değeri **%170** olarak **T-1-18** izolatında ait hesaplanırken, **%11,3**'lük yüzde canlılık değeriyle **Ö-2-55-a** ise en düşük canlılığa sahip izolat olarak belirlenmiştir.

Literatüre bakıldığında, incelenen *Bacillus* izolatlarının, düşük pH (1,0, 2,0 ve 4,0)'larda yüksek kabul edilebilecek dirence sahip oldukları saptanmış. Asidik pH 2,0 'de dört saatlik inkübasyondan sonra denemesi yapılan izolatlardan bir tanesinin %80 canlılık değeriyle, %62 değere sahip olan diğerine kıyasla daha yüksek canlılık sergilediği bildirilmiş. pH 1,0 'de ise izolatların hiçbirinin hayatta kalamadığı saptanmış (Ramesh et al., 2015).

Çalışmamızda literatüre kıyasla pH 4,0 için yüzde canlılık değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 4.9). Ancak pH 2,0 için hesaplanan yüzde canlılık değerleri literatüre göre çok düşük seviyelerde kalmıştır. Mide sıvısına karşı toleransın belirlenmesi için pH 2,5 'ta %40 ve üzeri canlılık gösteren izolatların pH 2,0 de yüzde canlılıkları yok denecek kadar azdır. Bu bize çalışmamızda kullanılan izolatların asidik pH'larda optimum büyümeleri için gerekli pH değerinin pH 2,5'tan daha yüksek olması gerektiğini göstermiştir.

4.5. *Bacillus* İzolatlarının Hidrofobik Çözgene Adhezyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda benzer van der Waals yüzey gerilimi bileşenleri sergileyen apolar çözücü için *Bacillus* izolatlarının hücre afiniteleri araştırılmıştır. Hidrofobik çözgene adhezyon kabiliyetinin belirlenebilmesi için ksilene (apolar çözücü) yapışma kabiliyetine bakılarak bakterilerin afinitesi değerlendirilmiştir (Armas et al., 2017). İncelenen *Bacillus* izolatlarının ksilenle muamelesi öncesinde ve sonrasında absorbans değerlerine bakılmış (Tablo 4.10) ve yüzde olarak Bakterilerin Çözücüye Bağlanması (% BATS) şeklinde hesaplama yapılmıştır (Şekil 4.4).

Tablo 4.11 *Bacillus* izolatlarının %BATS değerlerinin Belirlenmesinde kullanılan absorbans ölçümleri

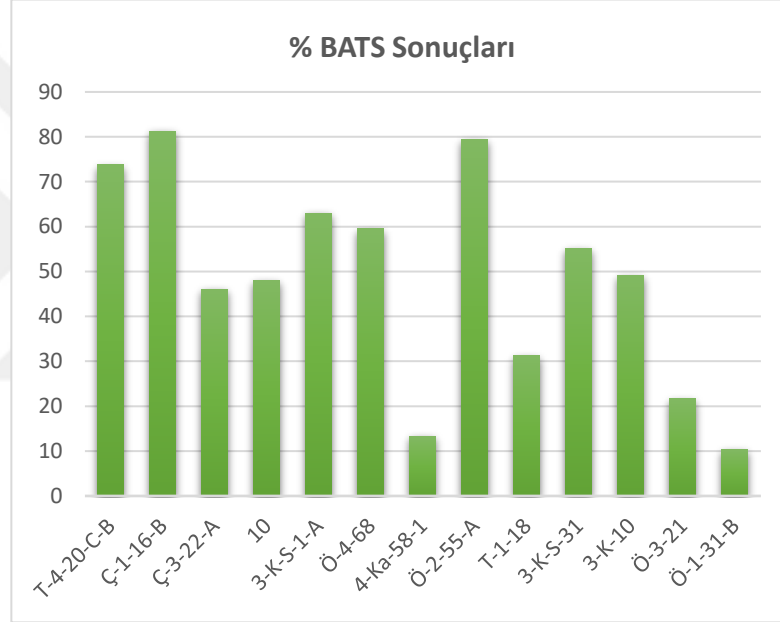
İzolat no	A _{0dk} (540 nm)	A _{30dk} (540 nm)
T-4-20-C-B	0,32	0,084
Ç-1-16-B	2,073	0,388

Tablo 4.11 *Bacillus* izolatlarının %BATS değerlerinin Belirlenmesinde kullanılan absorbans ölçümleri (devam)

Ç-3-22-A	0,66	0,356
10	0,622	0,323
3-K-S-1-A	0,475	0,176
Ö-4-68	0,617	0,25
4-Ka-58-1	0,495	0,429
Ö-2-55-A	0,511	0,105
T-1-18	0,572	0,393
3-K-S-31	0,981	0,44
3-K-10	0,886	0,45
Ö-3-21	0,512	0,401
Ö-1-31-B	0,617	0,553

A_{0dk} : sıfırıncı dakikadaki absorbans

A_{30dk} : Otuzuncu dakikadaki absorbans



Şekil 4.4 *Bacillus* izolatlarının hidroforik çözgene bağlanma yetenekleri (% BATS)

Şekil 4.4'e bakıldığında; **T-4-20-C-B**, **Ç-1-16-B** ve **Ö-2-55-A** izolatlarının sırasıyla **%73,75**, **%81,28** ve **%79,45**'lik apolar çözgene bağlanma afiniteleriyle en yüksek değerlere sahip izolatlar oldukları gözlemlenmiştir. **4-Ka-58-1** ve **Ö-1-31-B** izolatlarının sırasıyla **%13,33** ve **%10,37**'lik değerlerle en düşük bağlanma kabiliyetine sahip oldukları belirlenmiştir.

Literatürde, yüzey hidroforikliğin bakterilerin gastrointestinal kanalda yapışma kabiliyetleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kos ve ark. 2003). Birçok

çalışma, yüzey hidrofobikliğinin patojenlerin önlenmesi için probiyotik izolatların önemli bir özelliği olduğunu doğrulamıştır. Epitel yapışma ve koagregasyon özelliklerine sahip probiyotik izolatların, bağırsak patojenlerinin kolonizasyonunu engelleyen bir bariyer oluşturduğu bildirilmiştir (Anandharaj ve ark. 2015).

4.6. *Bacillus* İzolatlarının Safra Toleransının Belirlenmesi

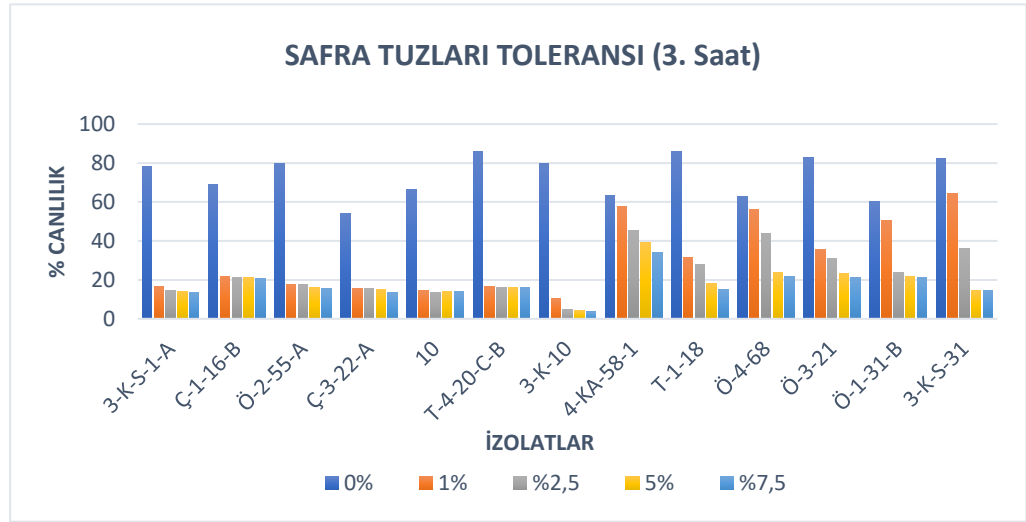
Safra, bağırsak yolunda spesifik ve spesifik olmayan savunma mekanizmaları için önemli bir rol oynamakta ve bağırsak yolunda bulunabilecek patojen mikroorganizmaları inhibe edici etkinin belirlenmesinde temel basamaklar arasında önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle safra toleransı, probiyotik adayı *Bacillus* izolatlarının gastrointestinal sistemde hayatta kalmalarını ve aktivitelerini sürdürmelerini sağlayan önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Argyri et al., 2013).

Sanders ve arkadaşları, 1996 'na; göre normal fiziksel safra konsantrasyonunda büyüeyen ve metabolize edebilen *Bacillus* suşları gastrointestinal geçişte hayatta kalabilir. Bazı suşların safra tuzuna karşı direnci, kombine safra tuzunu hidrolize edebilen ve böylece toksik yan etkilerini azaltabilen safra tuzu hidrolaz aktivitesi ile de ilgilidir. Bazı bakteri suşları, dekonjuge safra asitlerini ve amino asitleri serbest bırakmak için konjuge safra asitlerini hidrolize eden safra tuzu hidrolaz enzimi salgılamaktadır (Franz et al., 2011). Bu tuzlar mide-bağırsak yolundan salgılandığında, kolesterol talebi artmakta ve bu da kolesterol seviyelerini düşürmektedir.

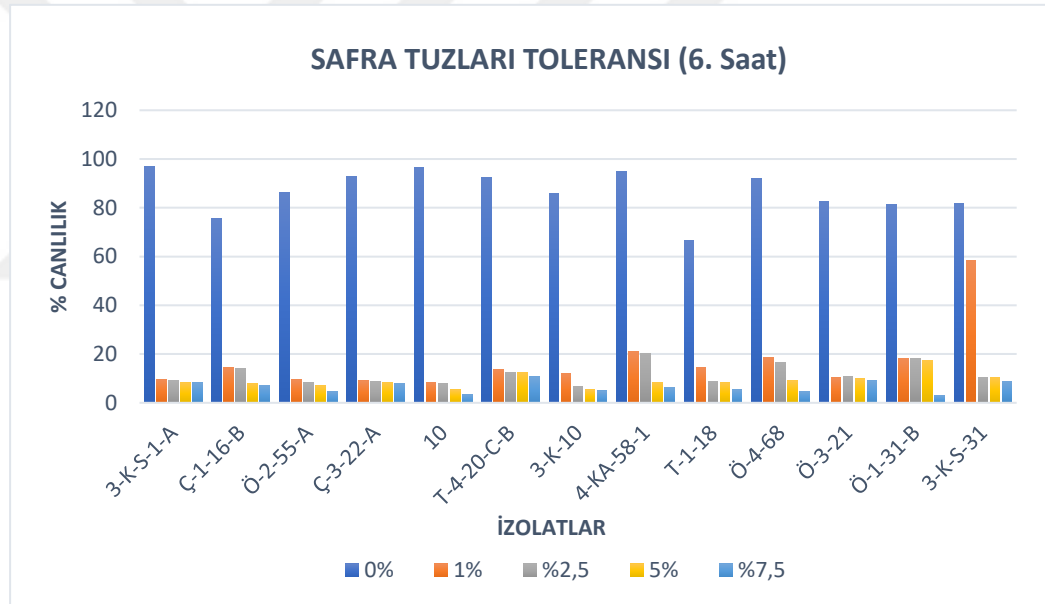
Çalışmamızda probiyotik özellikleri incelenen 13 *Bacillus* izolatının dört farklı safra tuzu konsantrasyonunda (%1, 2,5, 5 ve 7,5) üç ve altı saatlik inkübasyonları için safra tuzu toleransları sonuçlarına bakılmıştır. Bazı *Bacillus* izolatlarının (3-K-S-31, 4-Ka-58-1, Ö-4-68, Ö-1-31-B) %1 safra tuzu konsantrasyonunda üçüncü saatte canlılıklarını yüksek oranda koruduğu, ancak altıncı saatte canlılık değerlerinin düştüğü gözlenmiştir. Safra tuzu konsantrasyonunun %2,5 ve üzerinde olduğu uygulamalarda ise yüzde canlılık için kayda değer sonuçlar elde edilememiştir.

Tablo 4.12 *Bacillus* izolatlarının safra toleransı sonuçları (3 ve 6 saatlik inkübasyonlar için)

% Canlılık Safra Tuzları Miktarı (%) İzolat no	3. saatteki % Canlılık Değerleri					6. saatteki % Canlılık Değerleri				
	Kontrol	1	2,5	5	7,5	Kontrol	1	2,5	5	7,5
3-K-S-1-A	78,30	16,36	14,29	14,17	13,73	96,79	9,59	9,27	8,21	8,17
Ç-1-16-B	69,04	21,74	21,46	21,34	20,93	75,47	14,28	14,13	7,94	7,22
Ö-2-55-A	80,00	17,61	17,53	15,87	15,48	86,08	9,36	8,22	7,02	4,68
Ç-3-22-A	54,18	15,63	15,50	15,05	13,36	92,72	8,98	8,57	8,35	8,05
10	66,55	14,49	13,63	14,16	13,77	96,55	8,37	7,72	5,34	3,47
T-4-20-C-B	86,03	16,84	16,13	16,02	16,31	92,53	13,80	12,52	12,44	10,59
3-K-10	79,78	10,44	4,71	4,27	3,76	85,74	11,97	6,76	5,39	4,87
4-KA-58-1	63,47	57,62	45,44	38,98	33,83	94,91	21,01	20,37	8,42	6,44
T-1-18	85,83	31,30	28,03	17,88	15,29	66,75	14,57	8,87	8,19	5,42
Ö-4-68	62,91	56,22	44,02	23,59	21,50	91,83	18,75	16,46	9,04	4,74
Ö-3-21	83,01	35,81	30,83	23,48	21,03	82,54	10,28	10,70	9,85	9,01
Ö-1-31-B	60,36	50,37	23,61	21,72	21,42	81,44	18,37	18,04	17,55	3,11
3-K-S-31	82,43	64,42	36,27	14,30	14,62	81,75	58,21	10,48	10,34	8,81



Şekil 4.5 *Bacillus* izolatlarının üçüncü saat safra tuzu toleransı sonuçları



Şekil 4.6 *Bacillus* izolatlarının altıncı saat safra tuzu toleransı sonuçları

Şekil 4.5 ve 4.6’da görüldüğü gibi çalışmamızda incelenen *Bacillus* izolatlarının üçüncü saat ve altıncı saatte kontrol gruplarındaki % canlılık değerlerine bakıldığında altı saatlik inkübasyon sonunda izolatların % canlılığının üçüncü saate göre fark edilebilir oranda arttığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebi *Bacillus* izolatlarının logaritmik fazının 6 saatten daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak farklı konsantrasyonlarda (%1, %2,5, %5, %7,5) safra tuzu içeren denemelerdeki izolatların, altıncı saatte neredeyse hiçbir safra tuzu konsantrasyonu için canlılık göstermediği saptanmıştır (Bkz.

Şekil 4.6). Üçüncü saatin sonunda % canlılık hesaplaması sonuçlarının, sadece safra tuzu konsantrasyonunun %1 olduğu denemelerde kayda değer olduğu belirlenmiştir. **3-K-S-31**, **4-Ka-58-1** ve **Ö-4-68** izolatlarının safra tuzu konsantrasyonunun %1 olduğu gruplar için % canlılıkları sırasıyla **64,42**, **57,62** ve **56,22** şeklinde en yüksek değerler olarak belirlenmiştir. Daha yüksek safra tuzu konsantrasyonlarında % canlılığın yok denecek kadar az olduğu gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5).

Thankappan et al.,2015'e göre incelenen üç *Bacillus* izolatının artan safra tuzu konsantrasyonunda izolatlarda büyüme gözlemlenebilmiştir. *Bacillus* izolatlarından birincisi, üç saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla %2,5, 5, 7,5 ve %10 safra tuzunda %78,75, 76,41, 66,86 ve %67,44'lük daha yüksek hayatta kalma oranı kaydetmiştir. Bununla birlikte, 6 saat sonra hayatta kalma, artan safra tuzu konsantrasyonunda sırasıyla %25,71, 25,71, 23,80 ve 25,39'a düşmüştür. Bir diğer *Bacillus* izolatı için, üç saatlik inkübasyondan sonra aynı safra tuzu konsantrasyonlarında sırasıyla %67,43, 55,47, 61,57 ve %60,81 hayatta kalma gözlemlenirken, altı saatlik inkübasyondan sonra %41,12, 34,63, 32,32 ve 31,31 hayatta kalma oranları hesaplanmıştır. İncelenen son *Bacillus* izolat'ının hayatta kalma yüzdesi, artan safra tuzu konsantrasyonunda sırasıyla üç saat sonra %58,05, 49,93, 49,43 ve %47,06 ve altı saat sonra %27,35, 25,06, 20,77 ve %19,68 idi.

Çalışmamızda incelenen 13 tane *Bacillus* izolatının safra tuzu toleransı literatür ile kıyaslandığında hem üç saatlik için hem de altı saatlik inkübasyonlar için yüzde canlılık değerleri oldukça düşük hesaplanmıştır. Bu düşük yüzde canlılık değerleri incelenen *Bacillus* izolatlarının, safra tuzu toleranslarının düşük olduğunu göstermektedir.

4.7. *Bacillus* İzolatlarının Hidrolitik Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

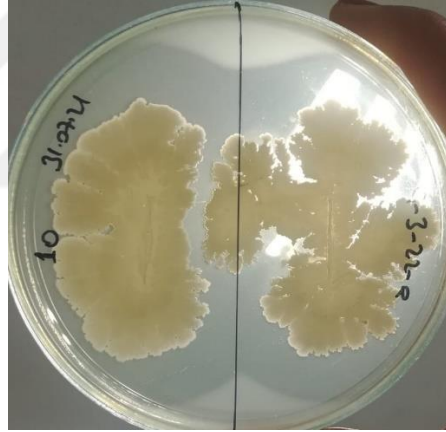
Probiyotik mikroorganizmalarda hidrolitik enzim aktivitelerinin varlığı, balıklar için yaşadıkları sudaki besin maddelerinin enzimler tarafından parçalanarak balıklar tarafından tüketiminin kolaylaşmasında, sucul ortamdaki atıkların parçalanarak su kalitesinin arttırılmasında, antifungal etki sağlayarak

balıklarda hastalık yapıcı patojen funguslarla mücadelede büyük etkinlik sağlamaktadır (Naidu and Devi, 2005, Sayes et al., 2018). Bu sebeple bu çalışmada probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının dört farklı hidrolitik enzim için aktiviteleri belirlenmiştir.

4.7.1 Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı Besiyerinde Proteaz Aktivitesinin Taranması

İncelenen *Bacillus* izolatlarının proteaz aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak skim milk kullanılarak hazırlanan katı besiyerinde tüm izolatlar için petrilerde koloni etrafında şeffaf zon oluşumu gözlenmiş ve kalitatif olarak bu bakterilerin hepsinin proteaz aktivitesine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Enzim aktivitesine bağlı zon çaplarının şekil 4.7 'de de görüldüğü gibi oldukça yüksek oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.7 Katı besiyerinde proteaz enzim aktivitesi sonucu

Sıvı Besiyerinde Proteaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı besiyerinde gözle yapılan değerlendirme sonucunda yüksek proteaz aktivitesi gösteren 16 izolatın sıvı kültürdeki enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde proteaz aktivitesi

İzolat No	Katı besiyerinde proteolitik aktivite	Sıvı kültürde proteaz aktivitesi (U/ml)
T-1-18	+++	137,25

Tablo 4.13 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde proteaz aktivitesi (devam)

3-K-S-1-a	++++	540,56
Ö-2-55-a	+++	34,44
Ç-3-22-a	++++	223,6
10	++++	48,19
Ö-3-21	+++	253,57
Ç-1-16-b	++++	238,85
4-Ka-58-1	+++	191,73
A-K-S²	++++	630,8
3-K-S-31	++++	573,82
T-4-20-C-B	++++	456,39
Ö-4-68	+++	418,64
Ö-1-31-B	+++	633,71
3-K-10	++++	726,16

- aktivite yok; +, zayıf; ++, orta; +++, yüksek. +++++, çok yüksek

İncelenen *Bacillus* izolatlarının hepsi petri plaklarında geniş hidroliz zonları göstermelerine rağmen sıvı kültürde proteaz aktivitelerinde farklılıklar saptanmıştır. Aktivite değerleri arasında **726,16 U/ml** değeriyle 3-K-10 izolatının en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenirken, **34,44 U/ml** değeriyle Ö-2-55-a en düşük aktiviteye sahip izolat olmuştur. (Tablo 4.13)

Proteazlar; gen ifadesi, protein mobilasyonu ve enzim modifikasyon çalışmaları gibi oldukça önemli biyolojik süreçlerde rol almaktadır. Proteaz enzimleri; hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı kalıntıların giderilmesini sağlayarak besin döngüsünün sürekliliğinin sağlanmasında kullanılan önemli bir enzimdir. Canlılığın devamı için bütün organizmalarca yoğun olarak üretilen bu enzimlerin biyoteknoloji açısından önemi oldukça büyüktür.

Biyoteknolojik uygulamalarda yoğun olarak çalışılan *Bacillus* cinsi bakterilerden elde edilen proteaz enzimleri yüksek sıcaklık değerlerinde dahi enzim stabilitelerini koruyabilmekte ve bakteri durgunluk fazındayken dahi enzim üretimi yapabilmeleri açısından birçok sektörde tercih edilen bir enzimdir (El-Gendi et al.,2016).

Günümüzde yüksek miktarlarda ticari olarak üretilen alkalın proteazlar *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir. Çoğu organizma proteazları üretmekte fakat sadece *Bacillus*’lar yüksek miktarlarda ekstraselüler proteazları üretmektedirler (Potumarthi et al., 2007, El-Safey and Abdul-Raouf 2004). *Bacillus subtilis* suşlarından birinin 320 U proteaz aktivitesi belirtilmiştir (Yu et al., 2007). Naidu and Devi, 2005, yaptıkları çalışmada toprak izolatu olan *Bacillus* ile farklı karbon kaynakları için 32-81 ml⁻¹ aktivite bildirmişlerdir.

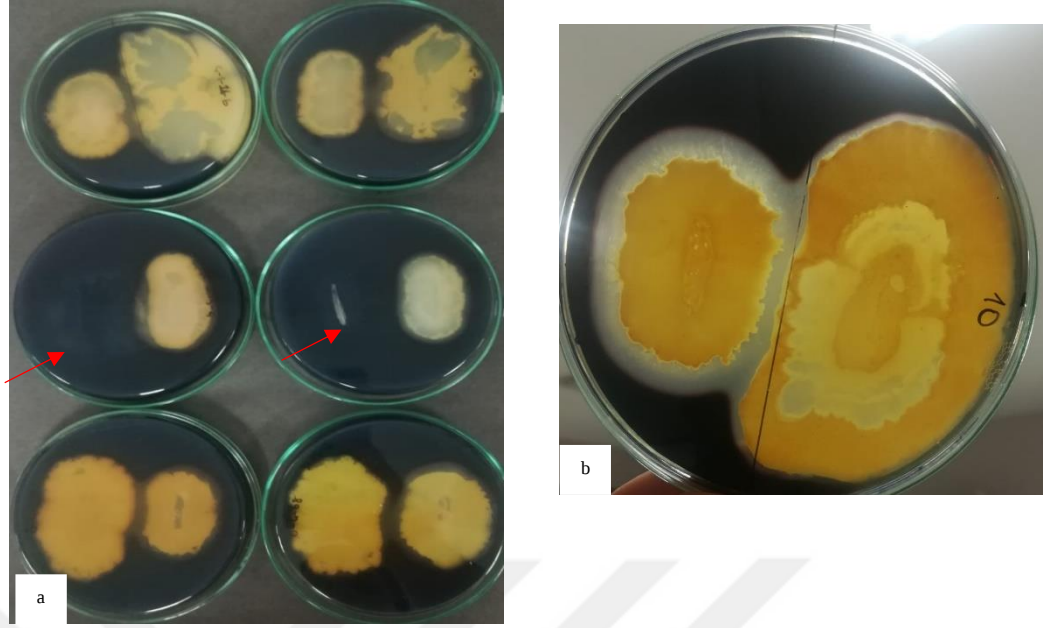
Proteazlar su ürünleri yetiştiriciliğinde balıklarda yem maddesi olarak kullanılan protein içerikli gıdaların parçalanmasında ve bu gıdaların balıklar tarafından tüketiminin sağlanmasında oldukça yüksek önem arz etmektedir. Protein kaynaklı sucul atıkların parçalanarak yok edilip, su kalitesinin ve balıkların yaşam kalitesinin artırılması için proteaz aktivitesi büyük katkı sağlamaktadır (Potumarthi et al., 2007, El-Gendi et al.,2016).

4.7.2 Amilaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı Besiyerinde Amilaz Aktivitesinin Taranması

İncelenen *Bacillus* izolatlarının amilaz aktivitesinin belirlenmesi için substrat olarak çözünür nişasta kullanılarak hazırlanan katı besiyerine test bakterilerinin ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda petriler 10 dakika boyunca iyodin solüsyonu ile muamele edilmiştir. 10 dakikanın sonunda petriler saf su ile yıkanarak mavi siyah renge boyanan petrilerin, bakteri kolonisi etrafında oluşan şeffaf zon kalitatif olarak amilaz aktivitesinin varlığı olarak kabul edilmiştir. Tarama sonucunda sekiz tane *Bacillus* izolatu için katı besiyerinde amilaz aktivitesi belirlenmiştir.

Şekil 4.8.b’de de görüldüğü gibi Ç-3-22-a izolatının 10 izolatına göre amilaz enzim aktivitesi daha yüksektir. Şekil 4.8.a ’da kırmızı oklarla gösterilen 4-Ka-58-1 izolatının amilaz enzimine karşı aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8 Katı besiyerinde amilaz enzim aktivitesi sonuçları

Sıvı Besiyerinde Amilaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı besiyerinde gözle yapılan değerlendirme sonucunda yüksek amilaz aktivitesi gösteren sekiz izolatın sıvı kültürdeki enzim aktiviteleri belirlenmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde amilaz aktivitesi

İzolat No	Katı besiyerinde amilaz aktivitesi	Sıvı kültürde amilaz aktivitesi (U/ml)
T-1-18	++++	1217,14
3-K-S-1-a	+++	1746,66
Ö-2-55-a	++++	1157,14
Ç-3-22-a	++++	1720
10	+++	1598,09
Ö-3-21	+++	1440,47
Ç-1-16-b	+++	1380,95
4-Ka-58-1	-	130,47
A-K-S ²	-	1230
3-K-S-31	++++	1313,81
T-4-20-C-B	-	1251,90

Tablo 4.14 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde amilaz aktivitesi (devam)

Ö-4-68	-	1147,14
Ö-1-31-B	-	1333,81
3-K-10	-	1346,66

- aktivite yok; +, zayıf; ++, orta; +++, yüksek. +++++, çok yüksek

Amilazlar özellikle besin tekstil ve kâğıt endüstrisi gibi farklı alanlarda kullanımlarına bağlı olarak pek çok endüstriyel proseste potansiyel kullanım alanı bulmaktadırlar (Tanyıldızı et al., 2006). *Bacillus* genusuna ait pek çok tür ekstraselüler amilaz üreticisi olarak belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada gıda atıklarından elde edilen amilaz üretici *Bacillus sp.* petri plağında amilaz pozitif olarak bulunduğundan sonra, sıvı kültürde aktivitesi 30 U/ml olarak belirtilmiştir (Sudharhsan, et al., 2007). Yüksek miktarda ekstraselüler amilazın bakteriyel büyümenin stasyonier fazında meydana geldiği belirtilmektedir. *Bacillus* amilazlarına olan ilgi son yıllarda artmıştır ve endüstriyel amaçlı olarak kullanılabilecek farklı özellikteki amilazları belirten çalışmalar vardır (Rajagopalan and Krishnan, 2008).

Amilaz enzimi nişastanın parçalanarak bir besin maddesi olarak balıklar tarafından tüketilmesinin sağlanması adına su ürünleri yetiştiriciliğinde de oldukça yüksek öneme sahip bir enzimdir (Sudharhsan, et al., 2007). Literatürde 30 U/ml amilaz enzim aktivitesine sahip olan izolat ile kıyaslandığında çalışmada incelenen tüm izolatların çok yüksek seviyelerde amilaz enzim aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.14)

İncelenen *Bacillus* izolatlarından yapılan tarama sonucunda katı besiyerinde sadece 8 izolat amilaz aktivitesi göstermiş olsa da sıvı kültürde tüm izolatların amilaz aktivitesi taranmıştır. Petri plaklarında belirlenen pozitif sonuçlara paralel olan amilaz aktiviteleri tespit edilmesinin yanı sıra petri plakalarında aktivite göstermeyen izolatların da sıvı kültürde yüksek amilaz aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. **3-K-S-1-a** ve **Ç-3-22-a** sırasıyla **1746,66 U/ml** ve **1720 U/ml** ile en yüksek aktiviteye sahip türler olarak belirlenmiştir.

4.7.3. Lipaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı Besiyerinde Lipaz Aktivitesinin Taranması

İncelenen *Bacillus* izolatlarının lipaz aktivitesinin taranması için substrat olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan katı besiyerine ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda büyüyen bakteri kolonisi etrafındaki granüler çökeltiler pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Katı besiyerinde incelenen izolatların hiçbirinde lipaz aktivitesi gözlemlenememiştir.

Sıvı Besiyerinde Lipaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipazların çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Bu sebeple ticari olarak bilinen önemli enzim grupları arasında yer almaktadırlar. Lipaz enzimi yağların hidrolizi için kullanılan enzim grubundandır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde lipaz enzimi ile yağların yağ asitlerine parçalanması ile yağ asitlerinin antifungal etkisinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple hem balıkların tüketimi için yağ moleküllerinin parçalanarak tüketime uygun hale gelmesinde hem de funguslarla mücadelede talep edilen bir enzim grubu haline gelmiştir (Tanyıldızı et al., 2006, Abdou, n.d.).

Tablo 4.15 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde lipaz aktivitesi

İzolat No	Katı besiyerinde lipaz aktivitesi	Sıvı kültürde lipaz aktivitesi (U/ml)
T-1-18	-	1,5669
3-K-S-1-a	-	4,0235
Ö-2-55-a	-	2,8096
Ç-3-22-a	-	1,2473
10	-	2,981
Ö-3-21	-	4,838
Ç-1-16-b	-	4,1476
4-Ka-58-1	-	2,3324
A-K-S ²	-	5,9138
3-K-S-31	-	1,3158
T-4-20-C-B	-	1,8644
Ö-4-68	-	2,059

Tablo 4.15 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde lipaz aktivitesi (devam)

Ö-1-31-B	-	3,0218
3-K-10	-	1,2454

- aktivite yok; +, zayıf; ++, orta; +++, yüksek. +++++, çok yüksek

Katı besiyerinde incelenen izolatların hiçbirisi lipaz aktivitesi göstermemiştir, ancak diğer hidrolitik enzim aktivitelerinin incelenmesi sırasında da katı besiyeri taramalarının sıvı kültürle birebir paralellik göstermemesi sebebiyle tüm izolatların sıvı kültürde lipaz aktivitesi incelenmiştir. Fakat petri plakalarında aktivite göstermeyen izolatların, sıvı kültürde de lipaz aktivitesine yok denecek kadar az saptanmıştır. En yüksek aktivite değeri **5,9138 U/mL** değeri ile **A-K-S²** izolatında tespit edilmiştir. Bu da lipaz aktivitesi için katı besiyerinde tarama ve sıvı kültür enzim aktivitesi sonuçlarının az çok paralellik gösterdiği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Literatüre bakıldığında, Abdou, n.d., *Bacillus spp.* için lipaz enzim aktivitesi değerlerinin 10 U/mL ve daha yüksek değerlerde de hesaplandığı gözlemlenmiştir (Abdou, n.d.). Çalışmamızda incelenen *Bacillus* izolatlarının en düşük aktivite gösterdiği enzim lipaz enzimi olarak belirlenmiştir.

4.7.4. Selüloz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katı Besiyerinde Selüloz Enzim Aktivitesinin Taranması

İncelenen *Bacillus* izolatlarının selüloz aktivitesinin taranması için substrat olarak karboksimetil selüloz (CMC) kullanılarak hazırlanan katı besiyerine ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda petriler %0,05'lik Kongo kırmızısı boyası ile 10 dakika muamele edilmiştir. 10 dakikanın sonunda ise boyanın tamamen temizlenebilmesi için petriler 1M NaCl ile üç defa ikişer dakika yıkanmıştır. Pembe kırmızı boyanan petrilerdeki bakteri kolonileri etrafındaki şeffaf zon pozitif olarak değerlendirilmiştir. Katı besiyerinde yapılan tarama sonucunda beş *Bacillus* izolatı için selüloz aktivitesi gözlemlenmiştir (Tablo 4.16).



Şekil 4.9 Katı besiyerinde selülag enzim aktivitesi

Sıvı Besiyerinde Selülag Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki biyokütlesi, hücre duvarlarının ana bileşeni olarak selülag içerir. Selülag, bitki biyokütlesinin kuru ağırlığının %50'sini ve tarımsal atıklar gibi ikincil biyokütle kaynaklarının kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturur. Selülag, hidrolize dirençli ve suda çözünmeyen güçlü lifli, kristal bir polisakkarittir (Haruta et al., 2003; Habibi et al., 2010). Selülag enzimleri, selülagu daha küçük oligosakkaritlere ve nihayetinde glikozu hidrolize edebilir. Selülaglar yıllardır akademik ve endüstriyel araştırmaların hedefi olmuştur ve şu anda birçok endüstride uygulanmaktadır. Mikrobiyal selülaglar birçok potansiyel endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaya sahiptir ve bu nedenle yüksek talep görmektedir (Singh et al., 2007; Kasana et al., 2008).

Bakteriler, hızlı büyümeleri, aşırı sıcaklık ve pH'larda stabilite sağlamaları, daha az geri besleme inhibisyonu ve çeşitli çevresel koşullara dayanma yetenekleri nedeniyle selülag üretimi için geniş çapta araştırılmaktadır. *Bacillus subtilis*, büyük miktarlarda hücre dışı selülagolitik enzim salgılama kapasitesi nedeniyle baskın bir tür olmaya devam etmektedir (Rawat and Tewari, 2012; Kim et al., 2009).

Bir enzim ve bir ürün, enzim-ürün kompleksi oluşturarak vücuttaki kimyasal reaksiyonu katalize eder. Enzim, ürünün daha küçük yan ürünlere ayrılmasına yardımcı olur. Selüloz enzimi sucul ortamda bulunabilecek bitki ve mantarları parçalayarak bunların daha küçük alt moleküllere ayrılmasına ve balıklar tarafından tüketiminin kolaylaşmasına yardımcı. Antifungal aktivite özelliğine de sahip olan selüloz enzimi balıkların fungal hastalıklara karşı savunma mekanizmasında önemli bir yere sahiptir (Rajagopalan and Krishnan, 2008).

Tablo 4.16 İncelenen *Bacillus* izolatlarının katı besiyerinde ve sıvı kültürde selüloz aktivitesi

İzolat No	Katı besiyerinde lipaz aktivitesi	Sıvı kültürde lipaz aktivitesi (U/ml)
T-1-18	-	4,05
3-K-S-1-a	-	59,13
Ö-2-55-a	-	46,28
Ç-3-22-a	-	55,30
10	+++	53,79
Ö-3-21	++	30,19
Ç-1-16-b	-	56,08
4-Ka-58-1	-	3,95
A-K-S ²	-	45,09
3-K-S-31	++	46,83
T-4-20-C-B	-	47,36
Ö-4-68	++++	55,21
Ö-1-31-B	++	45,42
3-K-10	-	45,54

- aktivite yok; +, zayıf; ++, orta; +++, yüksek. +++++, çok yüksek

Katı besiyerinde selüloz enzim aktivitesi gösteren 5 izolat belirlenmiştir. Sıvı kültürde de tüm izolatların aktivitesi taranmıştır. Petri plaklarında belirlenen pozitif sonuçlara paralel olarak sıvı kültürde de enzim aktivitesi bu izolatlar için saptanmıştır. Bunun yanında petri plakalarda aktivite göstermeyen izolatlarında sıvı kültürde yüksek aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. **3-K-S-1-a** ve **Ç-1-16-b** sırasıyla **59,13 U/ml** ve **56,08 U/ml** ile en yüksek aktiviteye sahip türler olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak **3-K-S-1-a**, katı besiyerinde enzim aktivitesi göstermemiş olsa da sıvı kültürde en yüksek aktiviteye sahip tür olarak belirlenmiştir. Bu durum katı besiyerinde enzim aktivitesi tayininin bize bir fikir vermiş olsa da kesin sonuçlar için sıvı kültürde enzim aktivitesinin belirlenmesinin daha sağlıklı sonuçlar elde etmemizde bize yardımcı olacağını göstermektedir.

4.8. Bakteriyel Tutunma Testi

Bacillus izolatlarının insan bağırsak karsinom (Caco-2) hücrelerine bağlanma yeteneklerinin incelendiği denemeye ait sonuçlar tablo 4.17 'de yer almaktadır. Yapılan çalışma sonucunda incelenen *Bacillus* izolatları için elde edilen % tutunma değerleri.

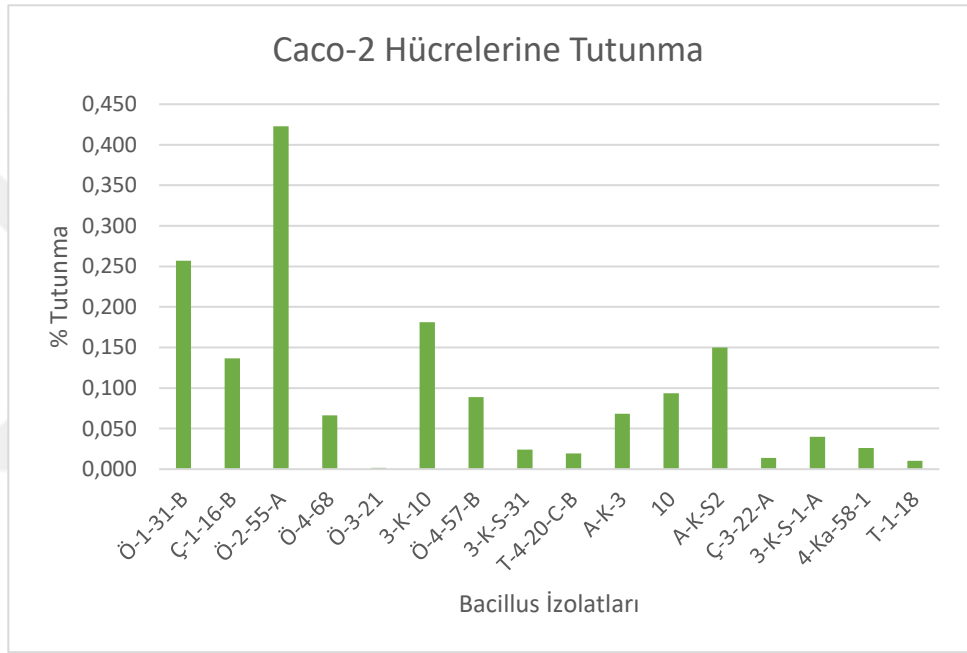
Tablo 4.17 *Bacillus* izolatlarının Caco-2 hücrelerine tutunma kabiliyetleri

<i>Bacillus</i> İzolatları	Başlangıç Hücre Sayısı (kob/ml)	Uygulama Sonrası Hücre Sayısı (kob/ml)	% Tutunma
Ö-1-31-B	2,65X10 ⁷	6,815	0,25
Ç-1-16-B	1,15X10 ⁷	1,57	0,13
Ö-2-55-A	1,75X10 ⁷	7,4	0,42
Ö-4-68	1,12X10 ⁷	0,745	0,06
Ö-3-21	1,23X10 ⁷	2	0,001
3-K-10	2,75X10 ⁷	4,98	0,18
Ö-4-57-B	3,10X10 ⁷	2,755	0,09
3-K-S-31	7,85X10 ⁷	1,905	0,02
T-4-20-C-B	2,33X10 ⁷	4,525	0,02
A-K-3	3,11X10 ⁷	2,13	0,07
10	1,28X10 ⁷	1,2	0,09
A-K-S²	2,14X10 ⁷	3,21	0,15
Ç-3-22-A	4,75X10 ⁷	0,66	0,01
3-K-S-1-A	3,10X10 ⁷	1,235	0,04
T-1-18	2,25X10 ⁷	2,3	0,01
4-Ka-58-1	3,05X10 ⁷	3,425	0,11

Yapılan çalışma sonucuna göre iki paralel olarak gerçekleştirilen denemede incelenen izolatların birbirine çok yakın tutunma değerleri verdiği saptanmıştır. Ö-2-55-A izolatının her iki paralelde de en yüksek % tutunma

değerini sağlayan izolat olduğu saptanmıştır. Her iki deneme sonucuna göre Ö-2-55-A izolatının yüzde tutunma değeri **%0,42** olarak belirlenmiştir. Caco-2 hücrelerine tutunmanın neredeyse yok denecek kadar az olduğu izolat ise her iki paralelde de çok yakın sonuçların hesaplandığı Ö-3-21 izolatı olmuştur.

Şekil 4.10 *Bacillus* izolatlarının Caco-2 hücrelerine tutunma kabiliyetleri

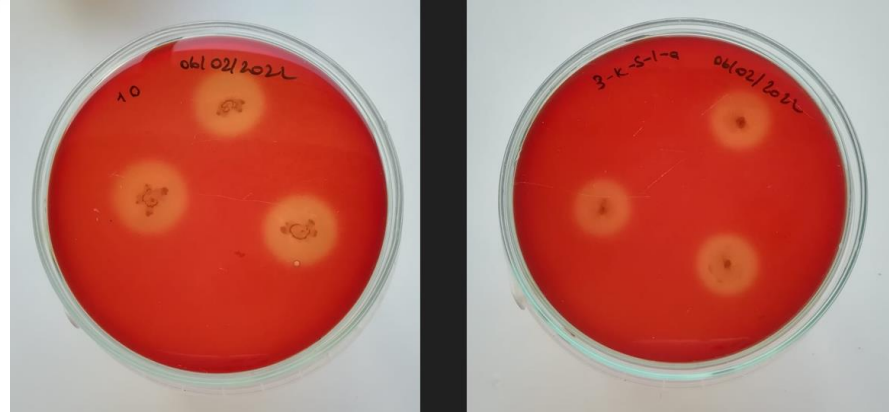


Şekil 4.10 da görüldüğü gibi sonuçlar birbirine yakın olsa da yüzde tutunma değerleri literatüre kıyasla çok düşük seviyelerde hesaplanmıştır. Literatürde, *Lactobacilluslar* için %2-30 aralığında seyreden tutunma değerlerinin, *Bacilluslar* için tutunma değerlerinin %40-60 aralığında olduğu gözlemlenmiştir (Li et al., 2017, Aubin et al., 2005). *Bacillus* izolatları için belirlenen değerler ile literatür değerleri karşılaştırıldığında, literatürdeki değerlere yakın sonucun elde edildiği sadece bir izolat olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada Ö-2-55-A izolatının %0,42 değerle en yüksek yüzde tutunma sağlayan izolat olduğu saptanmıştır. Bu tutunma yüzdesi de yine literatür de belirtilen en düşük tutunma yüzdesi seviyelerindedir. Caco-2

hücrelerine tutunmanın neredeyse yok denecek kadar az olduğu izolat ise %0,001 değeri ile Ö-3-21 izolatı olmuştur.

4.9. Hemolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Probiyotik özellikleri incelenen *Bacillus* izolatlarının patojen olup olmadıklarının belirlenmesi için hemolitik aktiviteleri incelenmiştir. İncelenen tüm izolatların hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak literatüre bakıldığında *Bacillus spp.*'nin geniş bir yelpazede lipopeptit biyosüpfaktanlar ürettiği bildirilmiştir. *Bacillus* suşlarının lipopeptit özleri ayrıca hemolitik aktivite göstererek süpfaktan üretmek için güçlü potansiyellerini ortaya koymaktadır (Banat et al., 2000). Yapılan bir başka çalışmada da biyosüpfaktan üretimi ve hemolitik aktivite arasında paralel bir bağlantı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada incelenen *Bacillus* türlerinde biyosüpfaktan üretiminin yüksek olduğu suşlarda paralel olarak yüksek hemolitik aktivite zonları gözlemlenmiştir (Vater et al., 2003, Ongena and Jacques, 2008).



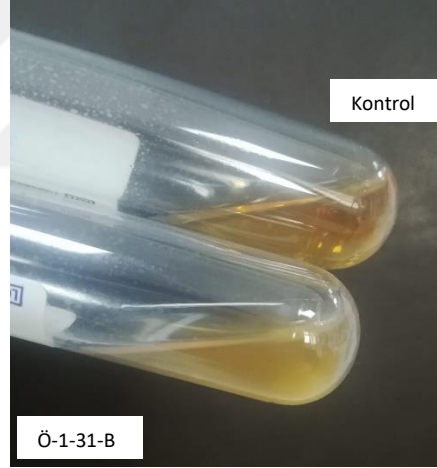
Şekil 4.11 *Bacillus* izolatlarının hemolitik aktivite kabiliyetleri

Çalışmada incelenen bütün izolatlarda beta hemolitik aktivite zon oluşumu gözlemlenmiştir. Bu da bize incelediğimiz *Bacillus* izolatlarının süpfaktan üretimine bağlı bir hemolitik aktivite zonu oluşturma ihtimallerinin olabileceğini düşündürmüş ve patojen olup olmadıklarının teyit edilebilmesi için koagülaz testi yapılmıştır.

4.10. Koagülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Koagülaz enzimi birçok bakteri tarafından oluşturulmaktadır. Koagülaz testi daha çok patojen ve patojen olmayan mikroorganizmaları birbirinden ayırt etmek için kullanılmaktadır. Koagülaz pozitif mikroorganizmalar kan serumu içerisinde proteinleri parçalayarak kanda çökelme (pıhtı) oluşmasına sebep olmaktadır. Bu mikroorganizmalar patojen mikroorganizmalar olarak kabul edilir. Daha çok patojen ve patojen olmayan stafilokokları belirlemek ve ayırmalarını yapmak için kullanılan bir yöntemdir. *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* insanlarla ilişkisi sıkça gözlemlenen stafilokoklardır. *S. aureus* koagülaz pozitif, *S. epidermidis* koagülaz negatiftir (Lebeer et al., 2010).

Çalışmada hemolitik aktivite testi pozitif olduğu belirlenen bütün *Bacillus* izolatlarının patojenite testinin doğrulanması için tüm izolatlara koagülaz testi yapılmıştır.



Şekil 4.12 *Bacillus* izolatlarında koagülaz testi sonucu

Çalışmamızda koagülaz denemesi sonucunda üç izolatın koagülaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar, Ö-1-31-b, 3-K-S-31 ve 4-Ka-58-1 'dir. Bu sonuçlar bize hemolitik aktivitesi pozitif çıkan izolatlardan 13 tanesinin patojen olmadığını, hemolitik aktivite testi sonucunda gözlemlenen zonun sürfektan üretimi sonucunda oluşmuş bir zon olabileceğini göstermiştir.

4.11. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

Biyofilm, mikroorganizmaların bir yüzey üzerine yapışmaları ve kendi ürettikleri polimerik yapıdaki jelimsi bir tabaka içinde yaşamalarıyla oluşturdukları topluluk olarak tanımlanabilir. Laboratuvar dışında, bakteriler nadiren kendilerini kültür ortamı kadar besin açısından zengin bir ortamda bulurlar ve bu ideal olmayan koşullarda, biyofilm büyüme modunun sağladığı bir dizi uygunluk avantajı vardır. Biyofilmler, kan akışı ve tükürük etkisi ile üretilen kesme kuvvetleri gibi fiziksel kuvvetlere karşı dirençlidir (Davies et al., 1993, Loo, C.Y., 2003).

Biyofilm içindeki organizmalar besin yokluğuna, pH değişikliklerine ve antibiyotiklere planktonik organizmalardan daha iyi dayanabilir. Biyofilmler ayrıca fagositoza karşı dirençlidir ve biyofilme saldırmaya çalışan fagositler aslında biyofilmin kendisinden çok çevre dokulara zarar verebilir. Bakterilerin insan vücudunda sabit kalmasını sağlamak için birtakım stratejileri vardır. Fibronektin, fibrinojen, vitronektin ve elastin gibi hücre dışı matris proteinlerine bağlanan bakteriyel yüzey proteinleri, yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşeni olarak adlandırılır ve genellikle bakterilerin konak içindeki katı yüzeylere ilk yapışmasında anahtar rol oynamaktadır (Patti et al., 1994, O'Toole et al., 2000).

Bu sebeplerle probiyotik izolatlardaki biyofilm üretim kabiliyeti bağırsak yüzeyine tutunma ve daha uzun süre patojenlerle rekabet edebilme özelliği sağlaması açısından aranan bir özelliktir. Patojen mikroorganizmaların biyofilm üretebilme özelliğine sahip olması ise gastrointestinal sistem de probiyotik izolatların rekabet gücünü düşürecektir.

Tablo 4.18 *Bacillus* izolatlarının biyofilm üretim testi sonuçları

<i>Bacillus</i> İzolatları	Biyofilm Üretimi
Ö-1-31-B	Güçlü
Ç-1-16-B	Güçlü
Ö-2-55-A	Zayıf
Ö-4-68	Güçlü
Ö-3-21	Zayıf
3-K-10	Güçlü
3-K-S-31	Zayıf
T-4-20-C-B	Zayıf

Tablo 4.18 *Bacillus* izolatlarının biyofilm üretim testi sonuçları (devam)

10	Güçlü
Ç-3-22-A	Güçlü
3-K-S-1-A	Güçlü
4-Ka-58-1	-
T-1-18	-
8-4-A	Güçlü
A-K-3	Güçlü
A-K-S ²	Güçlü

**Şekil 4.13** *Bacillus* izolatlarında biyofilm üretimi sonuçları; a. Güçlü biyofilm üreticisi, b. Zayıf biyofilm üreticisi, c. Biyofilm oluşturmayan

Çalışmada incelenen izolatların 10 tanesi güçlü biyofilm aktivitesi, dört tanesi zayıf biyofilm aktivitesi gösterirken, iki adet izolata ait biyofilm aktivitesi gözlemlenememiştir. Bu da probiyotik olarak kullanılabilir, gastrointestinal sistemde rekabet gücü yüksek olabilecek en az dokuz adet izolatın var olduğunu göstermektedir.

4.12. Probiyotik Özelliklerine Göre Seçilen Bir *Bacillus* izolatının Laboratuvar Ölçeğinde Üretim Optimizasyonu Sonuçları

Probiyotik özellikleri incelenmiş ve probiyotik olarak kullanılabilirliğine in vitro testler sonucunda karar verilmiş olan 16 izolattan bir tanesinin ekonomik karbon ve azot kaynakları ile üretim optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonu gerçekleştirilecek olan izolatın belirlenmesinde yapılan denemeler sonucunda Tablo 4.19’da önem derecesine göre verilmiş olan sonuçlar değerlendirilmiştir. *Bacillus* Ö-4-68 izolatının probiyotik özellikleri diğer 15 suşa göre daha etkin bulunmuştur.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde halen yaygın olarak kullanılan antibiyotikler dirençli genlerin oluşmasına ve bu genlerin balıklardan son tüketici olan

insanlara kadar pek çok canlıya taşınmasına sebep olmaktadır. Probiyotik mikroorganizmaların kullanılmaya başlanması ile antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Bu sebeple probiyotik olarak kullanılacak bir izolatın taşınması gereken en önemli özellik antibiyotik duyarlılığa sahip olmasıdır. Optimizasyon için seçilen Ö-4-68 izolatı su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerden, incelenen dokuz adet antibiyotiğe karşı direnç geni taşımamaktadır. Probiyotik bir izolatın kullanılacağı ortamdaki patojen suşları inhibi etme yeteneği en önemli koşullardan bir diğeridir. Ö-4-68 izolatı incelenen dört farklı balık patojeni izolat içerisinde üç tanesi (*V. anguillarum*, *Y. ruckeri* ve *L. garvieae*) için antibakteriyel aktivite göstermektedir. Hem fungal patojenlerin inhibisyonu hem de balıkların yaşadığı ortamda besin maddelerinin balıklar tarafından tüketilebilmesi için önemli bir kriter olan enzim aktiviteleri için amilaz, lipaz, selüloz ve proteaz olarak dört farklı enzim incelenmiş ve bu enzimler için Ö-4-68 izolatının yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir.

Bir probiyotik mikroorganizmanın işlevini yerine getirebilmesi için balığın sindirim sisteminden zarar görmeden bağırsaklara ulaşabilmesi ve burada patojenlerle rekabet ederek bağırsak yüzeyine bağlanabilmesi gerekmektedir. Bu sebeple mide sıvısı enzimleri ve pH 'sından etkilenmeden probiyotik mikroorganizmanın canlılığını sürdürmesi gerekmektedir. Ö-4-68 izolatı sentetik mide sıvısının içerdiği pepsin enziminden ve 2,5 pH değerinden kabul edilebilir bir etkiyle, %61,29 canlılık değeri göstererek başarıyla bağırsak kanalına geçişini gerçekleştirebileceğini kanıtlamıştır. Ö-4-68 izolatı bağırsak kanalında salgılanan safra tuzlarının artan konsantrasyonlarında oluşacak olumsuz etkilere karşı incelenen diğer izolatlara oranla daha yüksek direnç sağlamıştır.

Canlılığını yüksek oranda koruyarak bağırsağa ulaşabilen izolatın bağırsakta patojen mikroorganizmalarla rekabet edebilmesi için yüzeye tutunması ve yayılması gerekmektedir. Böylece patojen mikroorganizmalar bağırsak yüzeyine tutunamayıp dışkı ile dışarıya atılmış olacaktır. Bunun için izolatın hidrofobik çözügene bağlanabilme yeteneği yüksek olmalı, Caco-2 hücrelerine bağlanabilmeli ve biyofilm oluşturarak koloniler halinde bağırsak

yüzeyinde rekabet gücünü arttırabilmelidir. Bu üç özellik açısından Ö-4-68 izolatı kabul edilebilir sonuçlar göstermektedir. Önem derecesine göre tablo 4.17 de sıralanmış tüm izolatlar arasında her bir incelenen özellik için optimum değerleri sağlayan izolat *Bacillus* sp. Ö-4-68 olmuştur.



Tablo 4.19 Probiyotik potansiyele sahip *Bacillus* izolatlarının in-vitro deneme sonuçları

Bacillus İzolatları	Antibiyotik Duyarlılığı*	Antibakteriyel Aktivite Testleri					Enzim Aktiviteleri (U/ml)				Mide Sıvısı Tolerasansı (4. Saat) (%Canlılık)	Safra Toleransı (3. Saat) (% Canlılık)					Hidrofobik Çözgene Adhezyon (%Canlılık)	Bakteriyel Tutunma (%Canlılık)	Biyofilm Oluşumu
		Karşıt Çizgi Test Yöntemi				Agar Kuyucuk İnhibisyon Zonu (mm)						Safra Tuzu Konsantrasyonları (%)							
		Patojen Bakteriler**					Amilaz	Lipaz	Selüloz	Proteaz		0	1,0	2,5	5,0	7,5			
		A. H.	V. A.	L. G.	Y. R.														
Ö-1-31-B	D	+	-	-	+	1,8±0,2	1333,81	3,02	45,42	633,71	72,18	60,4	50,4	23,6	21,7	21,4	10,37	0,25	Güçlü
Ç-1-16-B	D	-	+	-	+	0	1380,95	4,15	56,08	238,85	79,66	69	21,7	21,5	21,3	20,9	81,28	0,13	Güçlü
Ö-2-55-A	D	-	+	-	+	0	1157,14	2,81	46,28	34,44	75,14	80	17,6	17,5	15,9	15,5	79,45	0,42	Zayıf
Ö-4-68	D	-	+	+	+	2,37±0,2	1147,14	2,06	55,21	418,64	61,29	62,9	56,2	44	23,6	21,5	59,48	0,06	Güçlü
Ö-3-21	D	-	-	+	+	0	1440,47	4,84	30,19	253,57	43,49	83	35,8	30,8	23,5	21	21,68	0,001	Zayıf
3-K-10	D	+	+	-	+	0,93±0,3	1346,66	1,25	45,54	726,16	42,62	79,8	10,4	4,71	4,27	3,76	49,2	0,18	Güçlü
3-K-S-31	D	+	-	-	+	0	1313,81	1,32	46,83	573,82	51,22	82,4	64,4	36,3	14,3	14,6	55,15	0,02	Zayıf
T-4-20-C-B	D	-	+	-	+	0	1251,9	1,86	47,36	456,39	48,56	86	16,8	16,1	16	16,3	73,75	0,02	Zayıf
10	D	-	+	-	+	0	1598,09	2,98	53,79	48,19	43,37	66,6	14,5	13,6	14,2	13,8	48,07	0,09	Güçlü
Ç-3-22-A	D	+	+	+	+	0	1720	1,25	55,3	223,6	75,76	54,2	15,6	15,5	15,1	13,4	46,06	0,01	Güçlü
3-K-S-1-A	D	-	+	-	+	0	1746,66	4,02	59,13	540,56	64,61	78,3	16,4	14,3	14,2	13,7	62,95	0,04	Güçlü
4-Ka-58-1	D	-	-	+	-	0	130,47	2,33	3,95	191,73	59,93	63,5	57,6	45,4	39	33,8	13,33	0,11	-
T-1-18	D	+	-	-	-	0	1217,14	1,57	4,05	137,25	42,96	85,8	31,3	28	17,9	15,3	31,3	0,01	-
8-4-A	D	+	+	-	+	0,86±0,3	-	-	-	-	(-) 16,5	-	-	-	-	-	-	0,09	Güçlü
A-K-3	D	+	+	+	+	2,33±0,3	-	-	-	-	(-) 28,2	-	-	-	-	-	-	0,07	Güçlü
A-K-S ²	-	-	-	-	-	0	1230	5,91	45,09	630,8	-	-	-	-	-	-	-	0,15	Güçlü

* D: Duyarlı, Antibiyotikler duyarlılık testinde kullanılan antibiyotikler: AMX, amoksisilin; TET, tetrasiklin; NEO, Neomisin; GEN, Gentamisin; PEN, Penisilin; STR, Streptomisin; O. TET, Oksitetrasiklin; K, Kanamisin; ERY, Eritromisin)

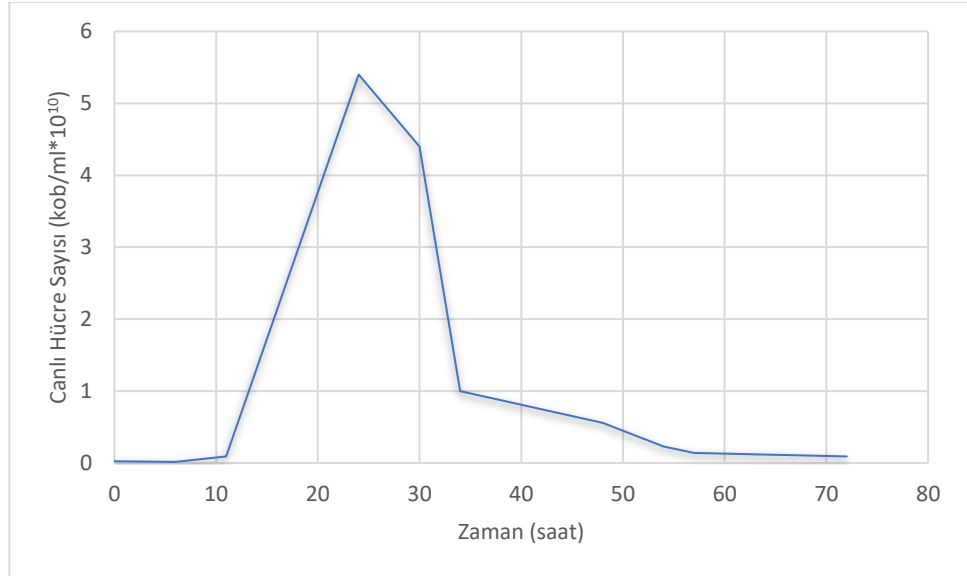
** Patojen Mikroorganizmalar: Aeromonas Hydrophila (A. h.), Vibrio Anglarium (V. a.), Lactococcus Garvieae (L.g.), Yersinia Ruckeri (Y. r.)

4.12.1 Seçilen *Bacillus* izolatı için inkübasyon süresinin belirlenmesi

Bacillus Ö-4-68 izolatının üretim esnasında maksimum büyümeyi gösterdiği zamanın tam olarak belirlenebilmesi amacıyla NB besiyerindeki büyüme eğrisi çıkarılarak büyüme fazları belirlenmiştir. NB besiyerinde elde edilen büyüme hızı eğrisi şekil 4.18 'de görülmektedir. *Bacillus* Ö-4-68 izolatının NB besiyerinde logaritmik fazda en yüksek canlı hücre sayısına ulaştığı inkübasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.20 *Bacillus* Ö-4-68 izolatının zamana göre canlı hücre sayıları (kob/mL)

İnkübasyon Süresi (saat)	NB Besiyerinde Gelişen Canlı Hücre Sayısı (kob/ml)
0	$2,75 \times 10^8$
6	$1,66 \times 10^8$
11	$9,2 \times 10^8$
24	$5,4 \times 10^{10}$
30	$4,4 \times 10^{10}$
34	1×10^{10}
48	$5,6 \times 10^9$
54	$2,3 \times 10^9$
57	$1,4 \times 10^9$
72	9×10^8



Şekil 4.14 *Bacillus* Ö-4-68 izolatının büyüme eğrisi

4.12.2 Biyokütle üretim ortam içeriğinin optimizasyonu

En iyi probiyotik özellikleri sağladığı belirlenen *Bacillus* Ö-4-68 izolatının üretim ortamında kullanılan karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesinde öncelikle literatüre bağlı olarak en iyi sonuçların elde edildiği üç farklı üretim ortamında biyokütle üretimi gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.21’de denenen üç farklı ortama ait biyokütle üretim miktarlarına yer verilmiştir.

Tablo 4.21 *Bacillus* Ö-4-68 izolatının üç farklı üretim ortamında biyokütle üretimi sonuçları

BİYOKÜTLE ÜRETİM ORTAMI 1		BİYOKÜTLE ÜRETİM ORTAMI 2		BİYOKÜTLE ÜRETİM ORTAMI 3	
İÇERİK	MİKTAR (100ML)	İÇERİK	MİKTAR (100ML)	İÇERİK	MİKTAR (100ML)
MELAS	15,0 g	SOYA UNU	2,0 g	NİŞASTA	1,5 g
CSL*	1,50 g	KURU MAYA	1,0 g	KURU MAYA	2,0 g
MgSO ₄	0,40 g	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
K ₂ HPO ₄	0,30 g				
KH ₂ PO ₄	0,30 g				
Biyokütle Miktarı (kob/ml)					
5,0x10 ⁹ ±0,08		2,1x10 ⁹ ±0,25		3,3x10 ⁷ ±0,12	

*CSL; Mısır ıslatma sıvısı

Çalışmamızda, literatürde verilen bu üç ortamda üretilen Ö-4-68 izolatının biyokütle üretim miktarının en fazla olduğu (Tablo 4.21) üretim ortamı (biyokütle üretim ortamı-1) baz alınarak karbon kaynağı (melas) sabit tutulup, besiyerinde 3 farklı azot kaynağı olarak; soya unu, mısır ıslatma sıvısı ve kuru maya ile hazırlanmış üretim ortamlarında biyokütle üretimi incelenmiştir. Deneme sonuçlarına göre tablo 4.22’de de görüldüğü gibi incelenen azot kaynaklarından soya unu ile yapılan deneme sonucunda biyokütle üretiminin en yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.22 *Bacillus* Ö-4-68 izolatının üç farklı azot kaynağı için biyokütle üretimi sonuçları

BİYOKÜTLE ÜRETİM ORTAMI 1		BİYOKÜTLE ÜRETİM ORTAMI 2		BİYOKÜTLE ÜRETİM ORTAMI 3	
İÇERİK	MİKTAR (100ML)	İÇERİK	MİKTAR (100ML)	İÇERİK	MİKTAR (100ML)
MELAS	15	MELAS	15	MELAS	15

Tablo 4.22 *Bacillus* Ö-4-68 izolatının üç farklı azot kaynağı için biyokütle üretimi sonuçları
(devam)

CSL	1,5	SOYA UNU	1,5	KURU MAYA	1,5
MgSO ₄	0,2	MgSO ₄	0,2	MgSO ₄	0,2
K ₂ HPO ₄	0,15	K ₂ HPO ₄	0,15	K ₂ HPO ₄	0,15
KH ₂ PO ₄	0,15	KH ₂ PO ₄	0,15	KH ₂ PO ₄	0,15
Biyokütle Miktarı (kob/ml)					
1,1x10 ⁹ ±0,07 kob/ml		1,2x10 ⁹ ±0,09 kob/ml		9,1x10 ⁸ ±0,13 kob/ml	

Tablo 4.22'deki biyokütle miktarları (kob/ml) ve üretim ortamı içerikleri değerlendirilerek RSM programında Box-Behnken tasarımı ile üç faktörlü optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon için kullanılacak faktörlerin seçiminde kuru mayanın azot kaynağı olarak kullanıldığı üretim ortamında biyokütle üretimi beklenenden düşük olması, mısır ıslatma suyunun temin edilmesinin zor olması ve pahalı bir girdi olması sebebiyle kuru maya ve mısır ıslatma suyu faktör olarak seçilmemiştir (Saber, F., et al., 2020). En iyi biyokütle üretiminin sağlandığı karbon kaynağı olarak melas belirlenmiştir. Azot kaynağı olarak en iyi sonuçların elde edildiği soya unu ve temin edilmesini daha kolay olması, *Bacillus* üretim optimizasyonu çalışmalarında güçlü bir azot kaynağı olarak bilinmesi ve daha ucuz bir hammadde olması sebebiyle gliserol seçilmiştir (Cho, J., et al., 2009; Küçük, Ö., ve *Korean J.* 2006).

4.12.3 RSM kullanılarak optimum üretim ortamı içeriğinin miktarının belirlenmesi

Biyokütle üretim ortamını optimize edebilmek amacıyla yapılan klasik metotlar, iki ya da daha çok sayıdaki faktörün etkileşimlerini tanımlayamadığı için istatistiksel metotlar, klasik metotlara göre daha çok ön plana çıkmaya başlamıştır. İstatistiksel deney modellemeleri, en az sayıda deney gerçekleştirerek pek çok değişkenleri değerlendirmeye imkân sağlamakla birlikte tutarlı sonuçlar için yeterli veri elde edilmesinde yarar sağlamaktadır. RSM, çok sayıda değişkene sahip denemelerin minimum sayıda deney

yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilmesinde etkili bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yararlarından dolayı RSM, daha önceden yapılan çalışmalarda da tutarlı sonuçlar gösterdiğinden farklı biyolojik prosesler açısından iyi şekilde kurulmuş bir teknik olmaktadır (Cheng vd., 2012).

Çalışmamızda karbon kaynağı ve azot kaynaklarının minimum ve maksimum değer aralıklarının literatüre göre belirlendiği üç faktörlü Box-Behnken tasarımının kullanılarak gerçekleştirildiği RSM deneme deseni oluşturulmuştur. Karbon kaynağı olarak melasın ve azot kaynağı olarak soya ununun tasarım deseni için minimum ve maksimum değer aralığı 0-15 g/L olarak, diğer bir azot kaynağı olan gliserolün minimum ve maksimum değer aralığı 1-5 g/L olarak belirlenmiştir (Cho, J., et al., 2009, Saberi, F., et al., 2020). Bu değer aralıkları doğrultusunda elde edilen 17 farklı deneme deseni şekil 4.15'te görülmektedir.

Std	Run	Block	Factor 1 A:gliserol g/L	Factor 2 B:soya unu g/L	Factor 3 C:melas g/L	Response 1 Toplam canlı hü CFU/ml
1	10	Block 1	0.00	1.00	7.50	9.11394
2	12	Block 1	15.00	1.00	7.50	8.65321
3	8	Block 1	0.00	5.00	7.50	9.23045
4	4	Block 1	15.00	5.00	7.50	9.64345
5	2	Block 1	0.00	3.00	0.00	8.95904
6	11	Block 1	15.00	3.00	0.00	7.49136
7	1	Block 1	0.00	3.00	15.00	9.14613
8	16	Block 1	15.00	3.00	15.00	8.75587
9	15	Block 1	7.50	1.00	0.00	8.32222
10	9	Block 1	7.50	5.00	0.00	9.38021
11	7	Block 1	7.50	1.00	15.00	9.53148
12	5	Block 1	7.50	5.00	15.00	9.81954
13	17	Block 1	7.50	3.00	7.50	9.11394
14	14	Block 1	7.50	3.00	7.50	9.04139
15	3	Block 1	7.50	3.00	7.50	9.32222
16	6	Block 1	7.50	3.00	7.50	9.27875
17	13	Block 1	7.50	3.00	7.50	9.11394

Şekil 4.15 *Bacillus* Ö-4-68 ile gerçekleştirilen RSM deneme desenine ait deney tasarımı ve elde edilen yanıtlar (Toplam Canlı Hücre (CFU/ml)).

Şekil 4.16’da ise üç faktör ile yapılan varyans analizi (ANOVA) sonucu gösterilmiştir. RSM deneme deseni sonucunda elde edilen ve Yanıt 1’i ilgili bağımsız değişkenlerle ilişkilendirilen model, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Response	1	Toplam canlı hücre sayısı				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	4.20	9	0.47	6.81	0.0096	significant
A-gliserol	0.45	1	0.45	6.63	0.0368	
B-soya unu	0.75	1	0.75	10.98	0.0129	
C-melas	1.20	1	1.20	17.54	0.0041	
AB	0.19	1	0.19	2.79	0.1390	
AC	0.29	1	0.29	4.24	0.0785	
BC	0.15	1	0.15	2.16	0.1847	
A ²	0.50	1	0.50	7.30	0.0306	
B ²	0.46	1	0.46	6.73	0.0358	
C ²	0.25	1	0.25	3.58	0.1002	
Residual	0.48	7	0.068			
Lack of Fit	0.42	3	0.14	9.74	0.0261	significant
Pure Error	0.058	4	0.014			
Cor Total	4.68	16				

Sum of Square, kareler toplamı; DF, serbestlik derecesi; Mean Square, kareler ortalaması.

Şekil 4.16 *Bacillus* Ö-4-68 ile gerçekleştirilen yanıt yüzeyi yöntemi (RSM) ile yapılan üretim optimizasyonuna ait ANOVA değerleri.

Şekil 4.16’da görülen modelde F değeri (6,81) denemeye ait modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 9,74 olan uyum eksikliği F değeri, bu uyumsuzluğun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya göre büyük olduğunu ve bu uyumsuzluğun anlamlı olmadığını göstermektedir. Uyum eksikliği değerinin (Lack of fit) anlamlı çıkması istenen bir sonuç olmamıştır. Programda transform yapmadan quadratic modelde gliserol minimize edilip, diğer faktörler maksimize edilirse hedeflenen yanıtta (toplam canlı hücre sayısı (CFU/ml)) artış olması beklenmektedir.

4.12.4 Optimizasyon modelinin doğrulanması

RSM deneme deseni sonucuna göre üç faktör için minimum ve maksimum değer aralıklarında maksimum biyokütle üretiminin gerçekleşmesi için yapılan üretim sonucunda $1,28 \times 10^9 \pm 0,05$ kob/ml biyokütle üretimi sağlanmıştır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda, 154 adet *Bacillus* izolatından 75 tanesinin balık patojeni test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği karşıt çizgi ve agar kuyucuk difüzyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Bu 75 adet izolatın incelenen balık probiyotiği özellikleri, önem sırasına göre, incelenerek, 13 adet *Bacillus* izolatının balık probiyotiği olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Bir mikroorganizmanın balık probiyotiği olarak kullanılabilmesi için bu mikroorganizmanın öncelikle antibakteriyel aktiviteye sahip olması gerekmektedir. Antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirlenen izolatların probiyotik olarak değerlendirilebilmesi için ise en önemli kriterlerden biri antibiyotik direnç geni taşımamasıdır. Yapılan çalışmada incelenen 75 adet antibakteriyel aktiviteye sahip izolattan 20 tanesinin dokuz farklı antibiyotikten en az birine karşı direnç geni taşıdığı gözlemlenmiştir.

Geriye kalan 55 adet izolatın gastrointestinal kanaldan geçip bağırsaklara ulaşabilmesi için öncelikle mide sıvısının asitliğinden (pH 2,5) etkilenmemesi gerekmektedir. Bunun için yapılan mide sıvısı toleransı denemesinde sadece 16 adet izolatın mide sıvısının asidinden etkilenmeden bağırsaklara ulaşabileceği tespit edilmiştir.

Çalışmada probiyotik aday olan ve en kritik aşamaları başarıyla tamamlayan 16 izolatın asidik pH toleransının belirlenmesi denemesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için üç farklı pH'dan (pH 1,2 ve 4) pH 1 için *Bacillus* izolatlarında canlılık saptanamamıştır, pH 2 için çok düşük canlılık değerleri elde edilmiştir, pH 4'te neredeyse tüm izolatların canlılık değerleri %70 ve üzerinde saptanmıştır.

Bağırsağa ulaşan probiyotik aday izolatların yarar sağlayabilmeleri için bağırsakta kolonize olabilmeleri gerekmektedir. Bu kolonizasyon yeteneğinin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen yüzey hidrofobikliği denemesinde izolatların yarısına yakınının %50'nin üzerinde yüksek kolonizasyon yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir.

İzolatların gastrointestinal sistemden geçişlerinde maruz kaldıkları bir diğer zorlayıcı etmen ise safradır. Gastrointestinal sistemde bir savunma mekanizması olarak bilinen safra, probiyotik adayı izolatların etkilenmemesi gereken bir salgıdır. Bu sebeple çalışmada kullanılan ve en son mide sıvısından başarı ile gastrointestinal sisteme geçebilen 16 izolatın safra tuzlarına karşı toleransları belirlenmiştir. Bunun için dört farklı safra tuzu konsantrasyonunun (%1, 2,5, 5 ve 7,5) etkisi incelenmiş ve sadece safra tuzu konsantrasyonunun %1 olduğu çalışmada izolatların canlılıklarını yüksek oranlarda koruyabildikleri belirlenmiştir. 16 adet izolatın enzim aktiviteleri (proteaz, amilaz, lipaz ve selüloz) belirlenmiştir. İncelenen 16 adet izolatın lipaz enzimi dışında diğer üç enzim için yüksek seviyelerde enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. İthal edilen probiyotik biyopreparatların son yıllarda özellikle kalite ve içeriğindeki mikroorganizma sayılarının azlığı, ürün temininin gecikmesi, üreticiye ulaşana kadar girdi maliyetlerinin artması gibi dezavantajlarının olduğu bilinmektedir. Bu sebeple çalışmamızda ülkemiz topraklarından izole edilen özgün suşların kullanımıyla elde edilen potansiyel probiyotik izolatların hem ülke ekonomisi hem de yerel çevre koşullarına adaptasyon yönünden daha verimli performans gösterecekleri ümit edilmektedir.

Çalışmamızda probiyotik özellikleri belirlenmiş 16 tane Bacillus izolatı ile özellikle ekonomik değeri yüksek, ihracat potansiyeline sahip probiyotik preparatların geliştirilmesi mümkün görünmektedir. Bu tip yerli ürünlerin sektörde kullanılan kimyasallara ve antibiyotiklere alternatif olarak umut verici olduğu düşünülmektedir. İn-vitro denemeleri gerçekleştirilen 16 izolattan, üreticilerin en önemli taleplerinden biri olan kültür balıkçılığında kalite ve verimini arttıracak, maliyeti düşük, yüksek ve uzun süreli etkinliğe sahip, çevre-dostu bir ürün elde edilmesini sağlamak için in-vivo çalışmalarının da gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Günümüzde seçilen bakteriyel probiyotik suşların ticari safhaya getirilememesinin en büyük sebebi ekonomik kitlesel üretim proseslerinin belirlenmemesi ile doğru formülasyonlarının oluşturulamamış olmasıdır. Laboratuvar ölçeğinde kitlesel üretim optimizasyonu yapılan izolatın, ayrıca formülasyon çalışmasının da gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

1. **Abdou, M.**, Bacillus sp. Suşlarından Lipaz Taranması, Lipaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Kısmi Saflaştırılması, Karakterizasyonu Ve Deterjan Endüstrisindeki Potansiyel Uygulamaları.
2. **Ahire, J. J., Patil, K. P., Chaudhari, B. L., & Chincholkar, S. B.** (2011). Food Chemistry, 127(2), 387–393.
3. **Akbulut S., Keten A.**, 2001, Düzce yöresindeki alabalık yetiştiriciliği üzerine bir çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 2: 49-60.
4. **Al-Thani, R. F.-M.** (2014). Graphene oxide as antimicrobial against two gram-positive and two gram negative bacteria in addition to one fungus.
5. **Altıntaş, L., Tutun, H., Sevin, S., Yarsan, E.**, 2016, Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Prebiyotik ve Probiyotik Kullanımı, Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics. Ankara, 2(1):29-37
6. **Anandharaj M, Sivasankari B, Santhanakaruppu R, Manimaran M, Rani RP, Sivakumar S** (2015) Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing Lactobacillus and Weissella strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. Res Microbiol 166:428–439
7. **Arda M, Seçer S, Sarıeyyüpoğlu M** (2002) Balık hastalıkları, Medisan Yayın Serisi, 1. Baskı, Ankara.
8. **Argyri A.A., Zoumpopoulou G., Karatzas K.A., Tsakalidou E., Nychas G.J., Panagou E.Z. and Tassou C.C.**, Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests, *Food Microbiol.*, 33 (2013) 282-291.
9. **Armas, F., Camperio, C., & Marianelli, C.** (2017). In vitro assessment of the probiotic potential of Lactococcus lactis LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS ONE*, 12(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169543>
10. **Aşan Özüsağlam, M., & Günyaktı, A.** (2020). Investigation of Lactobacillus gasseri MA-2 as Probiotic Candidate. *Cumhuriyet Science Journal*, 41(1), 228–234. <https://doi.org/10.17776/cs.654353>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

11. **Austin, B., Al-Zahrani, A.M.J.** (1988). The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*,33:1-12
12. **Austin B, Austin DA** (1993) Bacterial fish pathogens disease in farmed and wild fish, Ellis Horwood, London.
13. **Aydın F, Köksal G, Demir N, Bekcan S, Kırkagaç M, Gözgözoglu E, Erbas S, Deniz H, Matlas Ö, Arpa H** (2006) Su ürünleri yetiştiriciliği ve politikalar, [<http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/039fikriaydin.pdf>], Erişim Tarihi: 15.12.2006.
14. **Aytar, M., Oryaşın, E., Başbülbul, G., Bozdoğan, B.,** Araştırma Merkezi, R., Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, F., Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji, T. A., & Adnan Menderes Üniversitesi, A. (n.d.). Agar Well Difüzyon Yönteminde Standardizasyon Çalışması. In *Research Article Araştırma Makalesi Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences JONAS* (Vol. 2, Issue 2).
15. **Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M. And Farzanfar, A.** (2008) Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turk J Fish Aquat Sci* 8, 43–48.
16. **Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L.,** 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186.
17. **Bondad, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur J. R.,** “Disease and health management in Asian aquaculture,” *Veterinary Parasitology*, vol. 132, no. 3-4, pp. 249–272, 2005.
18. **Bradford, M. M.,** 1976, A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding, *Anal. Biochem.*,72, 247-252 pp.
19. **Buruiană, C. T., Profir, A. G., & Vizireanu, C.** (2014). Effects of probiotic bacillus species in aquaculture – An overview. *Annals of the*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI: Food Technology, 38(2), 9–17.

20. **Cabello FC** (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8: 1138-1142.
21. **Can E, Kurtoğlu İZ, Kayım M, Akhan S, Kızak V, Kocabaş M, Köse Ö, Demirtaş N, Delihasan Sonay F, Othan A.** 2011. Alabalıklarda probiyotik uygulamalarının bugünü ve geleceği. *Türk Bilimsel Derg.*, 4: 45-52. <http://www.nobel.gen.tr/Makaleler/Derleme-Issue%204-5-2011.pdf> (01.07.14).
22. **Carrim, A. J I., Barbosa, C.E., and Vieira, J.D.G.,** 2008, Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (*Carobinha-docampo*) 49: 352-357 pp.
23. **Carson J, Wilson T** (2002) Yersiniozis in fish, Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedures, p: 3-10.
24. **Chun, D, S., Kang, D, K., Kim, H, K.,** 2002, Isolation and Enzyme Production of a Neutral Protease-Producing Strain, *Bacillus* sp. DS-1.Kor., *J. Microbiol Biotechnology*, 30(4),346-350 pp.
25. **Clsi.** (n.d.). *M02-A11: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition.* www.clsi.org.
26. **Cressey, D.,** “Aquaculture: future fish,” *Nature*, vol. 458, no. 7237, pp. 398–400, 2009.
27. **Çakmakçı, L., Karahan, A.G., Çakır, İ.,** 2002, Probiyotikler ve etki mekanizmaları. *Gıda mühendisliği dergisi*, 12; 15-19.
28. **Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E. ve Okumuş, İ.,** 1999. Türkiye Su Ürünleri Sektörü ve Avrupa Birliği ile Entegrasyonu, İstanbul Ticaret Odası. Yayın No: 1999-63, 533s., İstanbul.
29. **Demircan D, Candan A** (2006) Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30: 305-310.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

30. **De Rodas, B.Z., Gilliland, S.E., Maxwell, C.V.,** 1996. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypocholesterolemia induced by diet. *J. Dairy Sci.* 79, 2123-2127.
31. **Diler O, Altun S, Adiloglu AK, Isıklı B** (2002) First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22: 20-25.
32. **Done, H. Y., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U.** (2015). Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? *AAPS Journal*, 17(3), 513–524.
<https://doi.org/10.1208/s12248-015-9722-z>
33. **Eldar A, Gorla M, Ghittino C, Zlotkin A, Bercovier H** (1999) Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3): 1005-1007.
34. **El-Gendi, S.M., Helal, S.F., Nagem, S.A.** (2016) Mismatch repair protein expression status in Egyptian colorectal carcinoma: a single-centre study. *Egyptian Journal of Pathology*. 36(2), pp.185-193.,
<https://doi.org/10.1097/01.XEJ.0000504540.12465.b7>
35. **El-Haroun ER, Goda AS, Kabir Chowdhury AM** (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*. 37: 1473-1480.
36. **FAO**, The State of World Fisheries and Aquaculture, 2012.
37. **FAO**, The State of World Fisheries and Aquaculture, 2018.
38. **Feng, Y., Qiao, L., Liu, R., Yao, H., & Gao, C.** (2017). Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- mucosa of healthy piglets. *Annals of Microbiology*, 67(3), 239–253.
<https://doi.org/10.1007/s13213-017-1254-6>
39. **Foda, M.S., El-Beih, F. M., Moharam, M. E. and El-Gamal, N. N.A.,** 2010, High efficiency production of mosquitocidal toxin by a novel *Bacillus sphaericus* isolate from Egyptian soils on local agroindustrial by products, *Journal of American Science*, 6(11)pp.
40. **Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A.,** 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151 (2), 126-138.
41. **Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365-378
42. **Gatesoupe FJ** (2007). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*.
43. **Gomez-Gil, B., Roque, A., Turnbull, J.F.,** 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191, 260–268.
44. **Gonzalez, J.A., Gallardo, C. S., Pombar, A., Rego, P., and Rodriquez, L. A.,** 2004, Determination of Enzymatic Activities in ecotypic *Saccharomyces* and Non- *Saccharomyces* yeasts. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 1582- 4374 pp.
45. GTHB. (2015). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.
<http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>
46. **Habibi, Y., Lucia, L. A. and Rojas O. J.:** Cellulose nanocrystals, chemistry, self- assembly and applications. *Chem. Rev.*,110 (6), 3479-3500, (2010).
47. **Hai, N. Van.** (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 592–597. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.026>
48. **Haniffa, M. A., & Kavitha, K.** (2012). Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. In *Journal of Agricultural Technology* (Vol. 8, Issue 1). <http://www.ijat-aatsea.com>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

49. **Hankin, L., and Anagnostakis, S.L.**, 1975, The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi *Mycologia* 67: 598-605pp.
50. **Hansen, G.H., Olafsen, J.A.** (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.*, 38: 3-25
51. **Haruta, S., Kato, S., Cui, Z., Ishii, M. and Igarashi, Y.:** *Cellulose degrading microbial community*, In Proc. JSPSNRCT/ DOST/LIPI/VCC Multilateral Cooperative Research Program in the Field of Biotechnology, 287-291, (2003).
52. **Heuer OE., Kruse H., Grave K., Collignon P., Karunasagar I., Angulo FJ.**, 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1248-1253.
53. **Karademir G, Karademir B.** 2003. Yem katkı maddesi olarak kullanılan biyoteknolojik ürünler. *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 43(1): 61-74. <http://abs.kafkas.edu.tr/upload/129/D11.pdf>. (01.07.14).
54. **Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. and Gulati, A.:** A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57, 503-507, (2008).
55. **Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L.** (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. In *Aquaculture* (Vol. 274, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>
56. **Kim, B. K., Lee, B. H., Lee, Y. J., Jin, I. H., Chung, C. H. and Lee, J. W.:** Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzym. Microb. Technol.*, 44, 411-416, (2009).
57. **Koca, S. B.** (2011). Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik uygulamaları. *Journal of Fisheries Sciences.Com.* <https://doi.org/10.3153/jfsc.com.2011037>
58. **Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S** (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- acidophilus M92. J Appl Microbiol 94:981–987. doi:10.1046/j. 1365-2672.2003.01915.x
59. **Krishnamoorthy, K. U.** (2012). Antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. 4(11) (1111-1117).
60. **Kum C, Gökbulut C, Akar F, Kırkan S, Sekkin S** (2004) Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve Etkili Antibakteriyel Sağaltım Seçeneğinin Belirlenmesi, Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 75 (3): 47-53.
61. **Lertcanawanichakul, M., & Sawangnop, S.** (2008). A Comparison of Two Methods Used for Measuring the Antagonistic Activity of *Bacillus* Species. In *Walailak J Sci & Tech* (Vol. 5, Issue 2).
62. **Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C.** (2012). Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology*, 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
63. **Mata AI, Gibello A, Casamayor A, Blanco MM, Dominguez L, Fernandez-Garayzabal JF** (2004) Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water Streptococcosis in fish, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (5): 3183-3186.
64. **Meunpol, O., Lopinyosiri, K., Menasveta, P.,** 2003. The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 220, 437–446.
65. **Moriarty, D.J.W.,** 1990. Interactions of microorganisms and aquatic animals, particularly the nutritional role of the gut flora. In: Le´sel, R. Ed., *Microbiology in Poecilothers*
66. **Munro ALS** (1982) The pathogenesis of bacterial diseases of fish, *Microbial Disease of Fish*, Academic Press, London, p: 131–149.
67. **Nemutanzhela, M. E., Roets, Y., Gardiner, N., & Lalloo, R.** (200 C.E.). *The Use and Benefits of Bacillus Based Biological Agents in Aquaculture*. www.intechopen.com
68. **Olafsen, J.A.** (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200(1-2): 220-245

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

69. **Olmos, J.** (2014). *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 06(07), 361–365. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000169>
70. **Özcan, D., & Önalın, Ş.** (n.d.). Antibiotic Resistance of Some Probiotic Strains in Aquaculture. *Eastern Anatolian Journal of Science*, III, Issue I, 22–26.
71. **Potumarhti, R., Subhakar, Ch., Jetty, A.,** 2007, Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes, *Biochemical Engineering Journal*, 34: 185-192 pp.
72. **Puri, S., Beg, K. Q., Gupta, R.,** 2002, Optimization of Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. *Current Microbiology* 44: 280-284 pp.
73. **Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K., & Vignesh, V. S.** (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.018>
74. **Rawat, R. and Tewari L.;** Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles*, 16(4), 637-644, (2012).
75. **R, C. K.** (n.d.). In-vitro antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya. In *African Health Sciences* (Vol. 9).
76. **Reed PA, Francis-Floyd R** (1996) *Vibrio* infections of fish, Erisim: [http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA03600.pdf], Erisim Tarihi: 11.06.2021.
77. **Ringo, E., Birkbeck, T.H.** (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquacult. Res.*, 30: 69-92
78. **Ringo, E., Gatesoupe, F.J.** (1998). Lactic acid bacteria in fish, review, *Aquaculture*, 160: 175-201

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

79. **Sanchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., and Ventosa, A.,** 2003, Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolitic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* 94, 295- 299.
80. **Sanders, M.E., Walker, D.C., Walker, K.M., Aoyama, K., Klaenhammer, T.R.,** 1996. Performance of commercial cultures in Fluid milk applications. *J. Dairy Sci.* 79 (6), 943e955.
81. **Sarıözkan, S, Akçay, A.,** 2014, Protein tüketim-leri bakımından Türkiye ve Avrupa Birliği ülkelerinin kümeleme analizi ile karşılaştırılması, 1.Ulusal Hayvancılık Ekonomisi Kongresi, 17-20 Ekim, Antalya, Türkiye, s.179-188.
82. **Sayes, C., Leyton, Y., & Riquelme, C.** (2018). Probiotic Bacteria as an Healthy Alternative for Fish Aquaculture. In *Antibiotic Use in Animals*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71206>
83. **Shanmugam, K. B., Vignesh, R., Karthikeyan, B. S., Periyasamy, N., & Devanathan, K.** (2011). Knowledgebases for Drug Discovery and Systems Toxicology View project Endocrine Disrupting Chemicals and their biological systems-level perturbations View project Antibiotics in aquaculture: An overview. *South Asian J Exp Biol*, 1(3). <http://www.sajeb.org>
84. **Shah, K. R., Patel, P. M., and Bhatt, S. A.,** 2007, Lipase Production By *Bacillus* sp. Under Different Physio-Chemical Conditions. *Journal of Cell and Tissue Research* 7(1): 913-915.
85. **Singh, A., Kuhad, R. C. and Ward O. P.:** Industrial application of microbial cellulases. In R. C.Kuhad, and A. Singh, *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, New Delhi, India: I. K. International Publishing House, 345-358, (2007).
86. **Subasinghe, R.Soto,D,Jia, J.**(2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1, 2-9.
87. **Swapna, H.C., Amit, K.R., Bhaskar, N., Sachindra, N.M.,** 2010. Lipid classes and fatty acid profile of selected Indian fresh water fishes. *J. Food Sci. Technol.* 47, 394–400.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

88. **Tanyıldızı, M. S., Elibol, M., Özer, D.,** 2006, Optimization of growth medium for the production of α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* using response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 618-621 pp.
89. **Tattersall-Sheldrake, A.R., Miller, K.M.** (2006). Bacterial diversity in a marine hatchery: Balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains. *Aquaculture*, 256(1-4). 52-70
90. **Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., & Anbarasu, K.** (2015). Characterization of *Bacillus* spp. From the Gastrointestinal Tract of *Labeo rohita*—Towards to Identify Novel Probiotics Against Fish Pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 340–353. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1270-y>
91. **Timmons, M., Ebeling, J., Wheaton, F., Summerfelt, S. and Vinci, B.,** Recirculating Aquaculture Systems, Cayuga Aqua Ventures, 2nd edition, 2002
92. **Tokath, M., Gülgör, G., Bağder Elmac, S., Arslankoz İşleyen, N., & Özçelik, F.** (2015). In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Lactic Acid Bacteria Originating from Traditional Pickles. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/315819>
93. **Uma, A., & Rebecca, G.** (2018). Antibiotic Resistance in Bacterial Isolates from Commercial Probiotics Used in Aquaculture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(1), 1737–1743. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.210>
94. **Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W.,** 2000, Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Review* 64, 656–668.
95. **VINE, N.G., LEUKES, W.D., KAISER, H.** (2004). In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus *FEMS Microbiol. Lett.*, 231: 146-150

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

96. **Woo PTK, Bruno DW** (2003) Fish disease and disorders volume 3 viral, bacterial and fungal infections, CABI Publishing, Great Britain.
97. TÜİK, 2020
98. (TÜİK, 2015)
99. (FAO/WHO, 2002).
100. (FAO, 2015). İstatistik2. Makalenin kaynakçasına göre yap kırmızıları
101. <https://www.indiamart.com/proddetail/500ml-biofloc-probiotics-21066176991.html> Erişim Tarihi:24/11/2020
102. <https://www.indiamart.com/proddetail/oswa-b-50-probiotic-for-biofloc-small-ponds-21197471873.html> Erişim Tarihi:24/11/2020
103. <https://www.indiamart.com/proddetail/probiotics-aquaculture-3915689255.html> Erişim Tarihi:24/07/2019
104. <https://microbenotes.com/mcfarland-standards/> (Erişim Tarihi:30.12.2021)
105. http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf (Erişim Tarihi:30.12.2021)
106. <http://www.alkimsaglik.com.tr/urunlerimiz/bioanalyse/antimikrobiyal-duyarlilik-testi-diskleri.html> (Erişim Tarihi:28.12.2021)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgilerini ve vaktini her zaman bana sunan, zor zamanlarımda yanımda olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Rengin ELTEM'e;

Her zaman bana karşı sonsuz sevgi ve şefkat sunan, bana güvenen ve güven veren, hayattaki en değerli varlığım olan Annem ve Anneanneme;

Hayatımın her anında idol edindiğim, bana hep yol gösterici olan, bana güvenen ve güven veren, desteklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim biricik Ablalarım;

Hayatımın son 10 yılında hep yanımda olan, desteğini hissettiren ve benimle aynı kaderi paylaşan canım arkadaşım Sevgi İŞLEK'e;

2021 yılının bana kazandırdığı, hiç bıkmadan beni dinleyen ve beni motive eden Onur YAZICI'ya;

Başta Kemal KARACA olmak üzere yardımlarından dolayı yeri doldurulamayacak tüm laboratuvar arkadaşlarıma;

Tez çalışmam süresince kendi laboratuvarımdan çok kullandığım Proses Laboratuvarı'ndan yardımlarından dolayı başta Dr. Ahmet DÜZEL olmak üzere tüm Proses Laboratuvarı ailesine;

Yüksek lisans eğitimim sırasında hak kazandığım "2210-D Yurt içi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı" ile beni destekleyen TÜBİTAK'a;

FYL-2020-21681 proje kodlu Bilimsel Araştırma Projeleri ile tezime mali destek veren E.Ü. Rektörlüğü BAP Komisyonu'na;

Çalışmalarım maddi ve manevi katkılarından dolayı Sayın Erman POLAT ve Sayın Dr. Nazenin EFTEKHARİ başta olmak üzere tüm Supersol Biyoteknoloji Anonim Şirketi Ailesine;

ve "Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Ailesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Sezen DEMİRHAN

İzmir, 2022

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET BİLGİ

Sayın ilgili:

Eğitim sürecim içerisinde biyomühendislik temeli altındaki birçok alanda teorik bilginin yanı sıra Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünün sunduğu geniş ve donanımlı alt yapıya sahip laboratuvarlarında, alanında en iyi hocalarla birlikte başta Tübitak projeleri olmak üzere çeşitli projelerde çalışma imkânı buldum. Bu alanlardan bazıları; endüstriyel mikrobiyoloji, bitki hücre, doku ve organ kültürü, biyoproses, biyoproses ayırma işlemleri, biyoyakıt, endüstriyel mikrobiyoloji, hayvan hücre, doku ve organ kültürü ve kromatografi alanlarıdır.

Bu disiplinlerden Bitki Hücre ve Doku Kültürü laboratuvarında gönüllü olarak bir yaz dönemi boyunca etkin bir şekilde çalıştım. Bu laboratuvarında çalışmalar için gerekli besin ortamlarının hazırlanması, alt kültür işlemlerinin gerçekleştirilmesi, doku kültürü çalışmalarının uygulanması ve sonuç olarak doku kültürü ile elde edilen bitkilerinin aklimatizasyonunun sağlanması için çalışmaları gerçekleştirdim.

Uygulamalı lisans tezimde farklı fungus türleri ile melasın (karbon kaynağı) ana materyal olarak kullanıldığı, sıvı kültürde bitki büyüme hormonlarından biri olan gibberellik asit üretimi üzerine çalıştım.

Yüksek lisans tezimde yine sürdürülebilirlik kapsamında olan farklı alana yöneldim. Dünya genelinde devletlerin artık bir politika olarak benimsediği su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik kullanılması ilkesi ile antibiyotik kullanımının zararlarını azaltmak ve gelecek kuşaklara daha sağlıklı bir dünya bırakmak amacıyla su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılabilecek Bacillus türlerinin belirlenmesi ve üretilmesi üzerine çalışmalara başladım.

İŞ TECRÜBESİ

SUPERSOL BİYOTEKNOLOJİ A.Ş. (Aralık 2020- Devam ediyor): Organik ve mikrobiyal gübre üretimi yapan Supersol Biyoteknoloji şirketinde hem Ar-Ge personeli pozisyonunda hem de ruhsatlandırma/ tescillendirme departmanı ve ihracat departmanında eş zamanlı olarak çalışmaktayım. Ar-Ge laboratuvarımızda, üretilen mikrobiyal ürünlerimizin, sahadan gelecek ürünlerin numune kabulünün yapılması, laboratuvarında hazırlığının yapılması, sonuçların değerlendirilmesi ve raporlama sürecinin koordine edilmesi. Hazırlanan Ar-Ge raporlarının dosya ve sistemsal kayıtlarının tutulması ile izlenebilirliğinin sağlanması. Ar-Ge laboratuvarında, raf ömrünün uzatılması ve yüksek hücre yoğunluğuna sahip yeni ürünlerin üretilmesi için çalışmalar gerçekleştirmenin yanında ürünlerimizin ruhsatlandırılması/ tescillendirilmesi için gerekli işlemlerin Bakanlıkla yürütülmesini sağlamaktayım. Bunun yanında ürünlerimizin Özbekistan ve Azerbaycan'a ihracatının sağlanması için ihracat departmanında gerekli işlemlerin sağlanabilmesi için çalışmaları yürütmekteyim.

STAJ

Temmuz-Ağustos 2017: World Medicine İlaç Şirketi AR-GE Laboratuvarı, İstanbul

Haziran-Ağustos 2016: Bitki Hücre Doku Kültürü Laboratuvarı, Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi.

BİTİRME TEZİ

Eylül – Temmuz 2018: Biyoproses Laboratuvarı – Giberellik asit üretimi (GA3)

Lisans bitirme tezimi proses mühendisliği laboratuvarında 'Karbon kaynağı olarak melasın kullanıldığı giberellik asit üretimi' üzerine gerçekleştirdim.

ÖĞRENİM DURUMU

2018- : Ege Üniversitesi - Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyomühendislik ABD (Devam ediyor.)

Yüksek lisans tezimi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği kapsamında 'Su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılabilecek Bacillus türlerinin belirlenmesi' üzerine gerçekleştiriyorum.

Tübitak 2210-D Yurtiçi Sanayiye Yönelik Yüksek Lisans Burs programı bursiyeriyim.

2013 – 2018 : Ege Üniversitesi - Mühendislik Fakültesi – Biyomühendislik Bölümü (Not Ort: 3,13/4)

2009-2013 : Ödemiş Anadolu Lisesi (Not Ort: 83,87/100)

YABANCI DİL VE DÜZEYİ

İngilizce

- Okuma, anlama : Çok iyi
- Yazma : Çok iyi
- Konuşma: Çok iyi
- 2014-2015 yılında Work and Travel programına katıldım.
- YÖKDİL Sınavı : 82.5
- Ales: 80,53

BİLGİSAYAR BECERİLERİ

Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint); çok iyi

KURS VE SERTİFİKALAR

- 23/08/2019 4. Teorik ve Uygulamalı Doku Mühendisliği Kursu (Hacettepe Üniversitesi)
- 17/07/2017 III.Temel Yönetim Becerileri Sempozyumu'Sosyal Mühendislik Eğitim Programı' –'Problem Çözme Teknikleri Eğitim Programı '
- 16/07/2016 III.Temel Yönetim Becerileri Sempozyumu ' Zaman Yönetimi Eğitim Programı' – 'Temel Yönetim Becerileri Eğitim Programı'
- 20-21/02/2016 4.Genetik ve Biyomühendislik Günleri (Yeditepe Üniversitesi)
- 02/05/2015 EGEKÖK Temel Kök Hücre Öğrenci Sempozyumu
- 12-13/03/2015 3.Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi(Marmara Üniversitesi)
- 06/11/2014 Ege Üniversitesi Girişimcilik Semineri
- 12/03/2013 2.Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi (Ege Üniversitesi)

REFERANSLAR

- **Prof. Dr. Rengin ELTEM**
Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü– Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Sorumlusu
- **Doç. Dr. Sait SARGIN**
Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü- Proses Laboratuvarı Sorumlusu
- **Cüneyt AKICI**
World Medicine AR-GE Şefi
- **Harun ERGEN**
World Medicine AR-GE Uzmanı
- **Murat DURAN**
Biofarma Ar-Ge Şefi