ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ERGÜVEN

BAZI DENİZ VE TATLI SU BALIK TÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İZOLASYONU VE BUNLARIN FERMANTASYON YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ
ANABİLİM DALI

ADANA-2018

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI DENİZ VE TATLI SU BALIK TÜRLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ İZOLASYONU VE BUNLARIN FERMANTASYON YETENEKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Merve ERGÜVEN NAZLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Bu Tez /2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile Kabul Edilmiştir.

……	……	……...
Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT DANIŞMAN	Doç. Dr. Esmeray KÜLEY BOĞA ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Esra BALIKÇI ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No : FYL-2014-3496

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat EserleriKanunundakihükümleretabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI DENİZ VE TATLI SU BALIK TÜRLERİNDEN LAKTİK ASİT BAKTERİ İZOLASYONU VE BUNLARIN FERMANTASYON YETENEKLERİN ARAŞTIRILMASI

Merve ERGÜVEN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ AVLAMA VE İŞLEME TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT
Yıl: 2017, Sayfa: 59
Jüri : Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT
: Doç. Dr. Esmeray KÜLEY BOĞA
: Dr. Öğr. Üyesi Esra BALIKÇI

Bu çalışma bazı deniz ve tatlı su balık türlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin (LAB) fermantasyon yeteneklerini araştırmak amacıyla yapılmıştır Bu amaçla 2 farklı tatlı su balığı (sazan ve yayın) ve 3 farklı deniz balığı (çipura, levrek ve kefal) türünün kas, deri ve iç organlarından izolasyonlar yapılmıştırÇalışmada toplam 61 bakteri izolasyonu gerçekleşmiştir. API test sonucunda toplam 56 izolat ön tanımlanmış, 5 izolat tanımlanamamıştır. Alışmada API testi ile ön tanımlanan 61 türden *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris ve Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* moleküler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca API testi ile ön tanımlanamayan 5 izolattan ise *Lactobacillus brevis, Pediococcus acidilactici, Enterococcus gallinarum* ve *Streptococcus spp.* olmak üzere 4 tür tanımlanmıştır. Tanımlanan bu bakterilerden *Streptococcus* spp., *Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum, Pediococcus acidolactici* ve *Enterococcus gallinarum* türlerinin 72 saat sonunda pH'ı 4'ün altına indirdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu araştırmada *Enterococcus gallinarum* türünün fermente ürünlerin üretiminde kullanılabileceği ilk kez ortaya konmuştur. Bu laktik asit bakterilerinin fermente balık ürünleri üretimi için uygun starter kültürler olabileceği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Laktik asit bakterisi, PCR, Fermantasyon, Starter kültür, Balık silajı

ABSTRACT

MSs THESIS

LACTIC ACID BACTERIA IN SOME SEA AND FRESH WATER FISH INSULATION AND INVESTIGATION OF THEIR FERMENTATION ABILITIES

Merve ERGÜVEN

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FISHING AND FISH PROCESSINGTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT
Year: 2017, Pages: 59
Jury : Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT
: Assoc Prof. Dr. Esmeray KÜLEY BOĞA
: Asst. Prof. Dr. Lecturer Esra BALIKÇI

This study was conducted to investigate the fermentation abilities of the lactic acid bacterias (LAB) which are isolated from a number of salt water fish and fresh water fish. For this aim, the isolation was made from the muscle, skin and visceras of two different type of fresh water fish (carp and catfish) and three different type of sea water fish (sea bream, sea bass, grey mullet). A total of 61 isolates of bacteria were detected in the study.) As a result of the API test, 56 isolates were predefined, 5 isolates were not identified.) In the study, 61 strains of Lactobacillus lactis subsp. lactis, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris and Lactobacillus delbrueckii subsp. is defined as lactis molecular) In addition, from 5 isolates that could not be identified by API test were Lactobacillus brevis, Pediococcus acidilactici, Enterococcus gallinarum and Streptococcus spp. 4 species of them are defined.) .(it was determined that Streptococcus spp., Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum, Pediococcus acidolacticide and Enterococcus gallinarum species lowered the pH to below 4 after 72 hours.

Moreover, in this study it has been firstly shown that the species of Enterococcus gallinarum can be used in production of fermented products. It has been demonstrated that lactic acid bacteria may be suitable starter cultures for the production of fermented fish products.

Key Words: Lactic acid bacteria, PCR, Fermentation, Starter culture, Fish silage

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada, fermente su ürünlerinde kullanılmak üzere, özellikle de ülkemizdeki bazı balıklarda bulunan doğal laktik asit bakterilerinin izole edilmesi, tanımlanması ve bu bakterilerin fermantasyon yeteneklerinin araştırılması planlanmıştır. Çalışmada laktik asit bakterileri (LAB) üyeleri izolasyonu için materyal olarak Adana Bölgesi balıkçılarından her bir türden 15'er örnek olmak üzere tatlı su türleri olan yayın balığı (*Siluris glanis*), sazan (*Cyprinus carpio*) ve deniz balıklarından levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*) ve kefal (*Mugil cephalus*) temin edilmiştir. LAB izolasyonu için balıkların kas, deri ve iç organlarından örneklemeler yapılmıştır. Deri örneklemesi steril swaplar kullanılarak steril salin solüsyon içerisinde yapılmıştır. Kas ve iç organlardan aseptik olarak yapılan örneklemeler ise yine steril salin sölüsyon içerisine alınarak stomaker yardımıyla 2 dk homojenize edilmiştir. Elde edilen örnekler seyreltilerek 1 ml alınmış MRS agar içerisine aşılama yapılmıştır. Petri kutuları 48-72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kolonilerin saflaştırılması aşamasına geçilmiş olup, morfolojik olarak bakteri kolonileri rastgele seçilerek saf kültür elde edilene kadar MRS agar üzerine aşılama işlemi gerçekleştirilmiştir (Leisner ve ark., 1997). Saflaştırılan LAB üyeleri MRS broth içerisinde 24 saat inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra, elde edilen izolatlar biyokimyasal (katalaz ve oksidaz test) ve kültürel özelliklere bakılarak ön tanımlama gerçekleştirilmiştir. MRS Broth içerisinde gelişen kolonilere gram boyama testi yapılmış (Salle, 1954), morfolojik görünüşlerine, rengine ve şekillerine bakılarak ön değerlendirilmiştir. İzolatlara katalaz (Hammes ve Vogel, 1995) ve stokrom oksidaz testi uygulanmıştır. Sonuç olarak ön tanımlanan bakteri türleri gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif olarak belirlenmiştir. Çalışmada toplam 61 bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolatların karbonhidrat fermantasyon testi için API 50CHL ve API-20 STREP kitleri kullanılmıştır. Tanımlanması yapılacak MRS Agar içerinde geliştirilen LAB izolatları alınarak, steril öze ile 2 mL'lik süspansiyon medyum (ref. 70700)

içerisinde Mcfarland hücre densitometresi ile 2 Mcfarland hücre yoğunluğunda standardize edilmiştir. Daha sonra bu izolatlar API 50 CHL kitinde bulunan kuyucuklar içerisine aşılanarak 48 saat inkübe edilmiştir. Streptokok türlerini tanımlamak için MRS agarda gelişen saf izolatlar 2 mL süspansiyon medyum (ref. 70700) içerisine 4 Mc farland yoğunluğuna standardize edilmiştir. Daha sonra bu izolatlar API 20 STREP kiti kuyucukları içerisine alınarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda renk değişimleri, pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiş Web tabanında (Biomerieux API WEB) ön tanımlanmıştır. API testi sonuçlarına göre 56 izolat ön tanımlanmış, 5 izolat tanımlanamamıştır.

Ön tanımlaması yapılan bakteri türlerinin doğrulamasını yapmak amacıyla moleküler tanımlama yöntemi olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiş, elde edilen DNA'ların saflığı jel elektroforezde değerlendirilmiştir. Öncelikle farklı bakterilerin 16S ribozomal DNA (rDNA) gen bölgeleri ClustalW yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bütün türlerde ortak olan bölgeden kullanılan her tür için 2 geri primeri ve 2 ileri primerleri tasarlanmıştır. Daha sonra biyokimyasal olarak tanımlanan izolatlar kromozomal DNA izolasyon kiti kullanılarak, kromozomal DNA, PCR ve nükleotid dizileme çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada plazmit DNA izolasyonu manuel izolasyon olarak ve kit izolasyon metodları kullanılarak iki şekilde yapılmıştır. Modifiye edilmiş manuel izolasyon protokolü (Lee ve ark., 2007) uygulanmış ve ön tanımlanan türlerden plazmit izolasyon yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA'lar Naono-Drop ile ölçülerek miktarı belirlenmiştir. İzole edilecek olan plazmit DNA'lar -20 ºC'de kullanılmak üzere saklanmış ve manuel protokol ile yüksek konsantrasyonda (18413–12614 ng/µL) izole edilmiştir. Kit kullanılarak yapılan plazmit DNA izolasyonu, firmanın SIGMA-ALDRICH, FAVORGEN ve Thermo Scientific (Fermantas) verdiği prosedüre, başlangıç solüsyonuna lizozim eklenerek 37 ºC' de 15 dk inkübe edilmiştir ve protokol takip edilmiştir. Elde edilen plazmit DNA'lar Nano-drop ile ölçülüp miktarı belirlenmiştir. Ön tanımlanmış olan bakterilerin doğrulaması için yaptığımız PCR işlemi Fermentas DNA polimeraz

enzimi kullanılarak toplam 40 µL hacminde gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi, 94 ºC DNA'nın denatürasyonu, değişken yapışma, 72 ºC de uzama sıcaklığı olarak ayarlanmış ve PCR 30 döngü olarak yapılmıştır. Bunu takiben DNA dizileme ABI3130xl Gen Sekans Cihazı ile yapılmıştır. Yapılan araştırmada; PCR sonuçlarına göre izole edilen bakteriler *Enterococcus gallinarum, Streptococcus* spp, *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis, Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum, Pediococcus acidilactici, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris ve Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmada PCR işlemi sonrası tanımlanmış olan bakterilerin fermentasyon yeteneklerinin belirlenmesi aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada MRS broth' da 37 ºC' de 24 saat geliştirilen hücre yoğunluğu Mc farland birimi hücre densitometresi ile 10^8-10^9 cfu/g olarak ayarlanan 1 ml laktik asit bakteri üyelerinin fermentasyon yeteneği, karbon kaynağını kullanarak pH' ı düşürme özelliklerine (<4.5) göre belirlenmiştir (Gongora ve ark., 2012). Çalışmadan her 24 saatte bir pH metre yardımıyla kültür ortamın pH'sı ölçülmüş ve fermentasyona en uygun türler belirlenmiştir. İzole edilen bu bakterilerden *Streptococcus* spp., *Lb. brevis, Lb. plantarum, Pd. acidolactici* ve *Ent. gallinarum* türlerinin 72 saat sonunda pH'ı 4'ün altına düşürdükleri tespit edilmiştir.

Çalışma, tanımlanan bakteri türlerinden biri olan *Ent. gallinarum'* un fermentasyon yeteneğinin belirlenmiş olduğu ilk araştırmadır. Bu yönüyle literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, çalışma, balığın doğal florasından izole edilebilen bu bakterilerin starter kültür olarak kullanılabileceğini göstermekte olup, bu durum gıda sektörü ve atık değerlendirme açısından büyük önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren, maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gülsün ÖZYURT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mikrobiyolojik analizlerin gerçekleşmesinde yardım ve bilgilerini esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi değerli hocaları Doç. Dr. Esmeray KÜLEY BOĞA'ya, Dr. Arş. Gör. Mustafa DURMUŞ'a, Dr. Serhat ÖZKÜTÜK'e, araştırmanın laboratuar aşamasında emeği geçen Arş. Gör. Yılmaz UÇAR'a ve Dr. Saadet GÖKDOĞAN TEKİN'e, tezin bazı laboratuar aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı değerli hocaları , Prof. Dr. İsmail AKYOL ve Arş. Gör. Fatma Gül ÖZÇELİK'e yakın ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın tüm aşamalarında maddi ve manevi destekleriyle hep yanımda olan annem Havva ERGÜVEN ve babam Dara ERGÜVEN'e, kardeş olarak desteğini hiç esirgemeyen Bengü ERGÜVEN'e, tez yazım aşamam boyunca yanımda olan ve her zaman desteğini hissettiren eşim Okan NAZLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında bölüm laboratuar olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje no : FYL-2014-3496) içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER **SAYFA**

ÖZ I
ABSTRACT II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET III
TEŞEKKÜR VII
İÇİNDEKİLER VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ X
ŞEKİLLER DİZİNİ XII
RESİMLER DİZİNİ XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR XVI
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB) 5
2.1.1. İzolasyon 6
2.1.2. LAB'nin Fermente Su Üünleri Üretiminde Kullanımı İle İlgili Çalışmalar 6
2.1.3. Balıklardan LAB İzolasyonu İle İlgili Çalışmalar 9
3. MATERYAL VE METOD 15
3.1. Materyal 16
3.2. Metot 16
3.2.1. Balıklardan Laktik Asit Bakteri Türlerinin İzolasyonu 16
3.2.2. Bakteriyel Kolonilerinin Biyokimyasal Tanımlanması ve Çoğaltılması 21
3.2.2.1. *Lactobacillus* ve İlgili Üyelerin Tespiti İçin Kullanılan API 50CHL Kiti 21
3.2.2.2. *Streptococcus* Üyelerini Belirlemek İçin Kullanılan API 20 STREP Test Kiti 23
3.2.3. Bakteriyel Kolonilerin Moleküler Tanımlanması 26

3.2.3.1. 16S Ribozomal DNA Bölgesinden Primerlerin Tasarlanması 26
3.2.3.2. Kromozomal DNA İzolasyonu 26
3.2.3.3. Plazmit DNA İzolasyonu 27
3.2.3.4. DNA'nın Jel Elektroforezi 28
3.2.3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 30
3.2.4. Bakterilerin Fermantasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi 31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 33
4.1. Bakteri İzolasyonu 33
4.2. Bakterilerin Moleküler Tanımlaması (PCR) 37
4.3. Laktik Asit Bakterilerine Özgü DNA Dizileri Nükleotid Dizi Belirleme ... 39
4.4. Fermantasyon Yetenekleri 49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 51
KAYNAKLAR 53
ÖZGEÇMİŞ 59

ÇİZELGELER DİZİNİ **SAYFA**

Çizelge 4.1. Elde edilen bazı izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....33
Çizelge 4.2. Balıklardan izole edilen ve API test kiti ile ön tanımlanan laktik asit bakteri üyeleri.....36
Çizelge 4.3. *Enterococcus gallinarum* sekans dizilimi.....39
Çizelge 4.4. *Lactobacillus brevis* sekans dizilimi.....41
Çizelge 4.5. *Lactobacillus plantarum* sekans dizilimi.....43
Çizelge 4.6. *Streptococcus* spp. sekans dizilimi.....45
Çizelge 4.7. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sekans dizilimi.....47
Çizelge 4.8. Balıktan İzole Edilen LAB fermantasyon yetenekleri.....49

ŞEKİLLER DİZİNİ **SAYFA**

Şekil 4.1. Balık etinden izole edilen kolonilerin PCR'nin agaroz jel görüntüsü 38
Şekil 4.2. Balık etinden izole edilen kolonilerin PCR'nin agaroz jel görüntüsü.38
Şekil 4.3. *Enterococcus gallinarum* 40
Şekil 4.4. *Lactobacillus brevis* 42
Şekil 4.5. *Lactobacillus plantarum* 44
Şekil 4.6. *Streptococcus* spp.....46
Şekil 4.7. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 48

RESİMLER DİZİNİ **SAYFA**

Resim 3.1. Balıklardan deri örneklerinin alınması 17
Resim 3.2. Balıkların kasından ve iç organlarından yapılan örneklemeler 18
Resim 3.3. Bakteriyel izolasyon için örneklerin petri kutularına aktarımı 19
Resim 3.4. Kolonilerin saflaştırılması 19
Resim 3.5. Bakteriyel kültürlerin inkübasyonu 20
Resim 3.6. Mcfarland hücre densitometresi yardımıyla hücre yoğunluğunun ayarlanması.....22
Resim 3.7. API 50 CHL kitine bakteriyel kültürlerin aşılanması.....23
Resim 3.8. 4 Mcfarland hücre yoğunluğundaki LAB izolatları 23
Resim 3.9. Örneklerin kuyucuklara aktarılması 24
Resim 3.10. API 50 CH ve API 20 STREP' e aşılanan örneklerin ön tanımlamasının yapılması.....25
Resim 3.11. DNA jel elektroforez aşaması 29
Resim 3.12. PCR işleminin yapılması 31
Resim 3.13. Bakterilerin fermantasyon yeteneklerinin belirlenmesi.....32

SİMGELER VE KISALTMALAR

FAO : Gıda ve Tarım Örgütü

LAB : Laktik Asit Bakterisi

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

RNA : Ribo Nükleik Asit

Bç : Baz çifti

1. GİRİŞ

Son yıllarda su ürünlerinin zengin besin içeriğinin daha iyi bilinmesi insan ve hayvan beslemedeki önemini arttırmıştır. Bu nedenle su ürünleri işleme atıklarının endüstriyel ürünlere biyodönüşümü ile ilgili uygun metotların gelişimi gün geçtikçe daha büyük önem kazanmaktadır. Bu zengin protein kaynaklarının değerlendirilmesiyle hem çevre kirliliği önlenebilmekte, hem de bu atıklara ekonomik değer kazandırılabilmektedir.

Besin takviyesi olarak geniş kullanım olanağı bulunan balık ununun tüm hayvancılık sektöründe yem maddesi olarak kullanımı mevcuttur. Fakat ham maddenin teminindeki güçlükler, mevcut fabrikaların tam kapasite çalışamamaları, ham maddeyi ithal olarak temin etmek zorunda kalmaları gibi nedenler balık ununun rasyon içerisinde yer alma maliyetini arttırmaktadır. Yemin yüksek fiyattan alınması işletme masraflarını yükseltmekte ve son ürünün fiyatını olumsuz etkilemektedir.

Balık unu üretimi ham madde miktarına bağlıdır ve yatırım maliyeti yüksektir. Balık silajı ise üretim prosesinin ölçekten bağımsız olması, teknolojisinin basit ve yatırımının az olması nedenleriyle balık ununa göre cazip bir alternatiftir. Balık silajı tüm balık veya parçalarının asit, enzim veya laktik asit üreten bakterilerinin ilavesi ve balığın sindirim sisteminde bulunan enzimlerin yardımları sonucu oluşan sıvı kıvamlı bir üründür (FAO, 2003). Silaj üretimiyle hammaddedeki proteinler serbest aminoasitlere dönüşerek protein biyosentezi için daha kullanışlı hale gelmektedir. Balık silajı hazırlanmasında uygulanan geleneksel yöntem balık kütlesinin öğütülmesi ve asitle karıştırılmasıdır. Balık atığının özellikle içorganlarının yapısında bulunan proteolitik enzimler proteinleri parçalayarak hidrolize etmektedir. Balık silajı üretiminde uygulanan diğer yöntem ise bir karbonhidrat kaynağı ve laktik asit bakteri ilavesi yapılan balık atığında laktik asit üretiminin sağlanmasıdır. Bu biyolojik metot diğer bitkisel yem silajları üretimine benzerdir. Silaj üretiminde laktik asit fermantasyonu, bozucu ve patojen

bakteri gelişimini inhibe ederek biyomoleküllerin geri kazanımını sağlayan bir yöntemdir.

Laktik asit bakterilerinin (LAB), fermente gıdaların üretiminde uzun yıllardan beri kullanıldığı bilinmektedir. LAB ilk kez 1780 yılında İsveçli kimyacı Scheele tarafından ekşi sütten izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Blondeau 1847'de laktik asidin bir fermantasyon ürünü olduğunu kanıtlamıştır. Laktik asit üretimi ilk önceleri kimyasal sentez yolu ile gerçekleştirilmiş, ancak fermantasyon alanındaki gelişmelerle fermantasyon yolu ile üretimine geçilmiştir. Kimyasal sentez yöntemine göre maliyetin daha düşük olması ve daha basit bir sistem gerektirmesinden dolayı, fermantasyon yoluyla üretimi daha önemli bir yer tutmaktadır (Bulut, 2001).

Gram pozitif basil ve koklardan oluşan laktik asit bakterileri *Firmicutes* filumuna ait çeşitli bakteri cinslerinden oluşmaktadır. Spor oluşturmayan ve katalaz negatif olan bu grubun gıdalarda en yaygın olarak görülen cinsleri *Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weisella*' dır (Holzapfel ve ark., 1995). Laktik asit bakterileri küf gelişimi ve mikotoksin üretiminin inhibisyonu, ayrıca mevcut toksinin detoksifikasyonu amacıyla yaklaşık 30 yıldan bu yana kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar bazı laktik asit bakterilerinin küf gelişimini ve mikotoksin üretimini engellediğini ortaya koymuştur (Güley, 2008).

Fermente gıdaların hazırlanmasında kullanılan laktik asit bakterilerinin laktik, asetik, butirik veya propiyonik asit gibi ürettikleri organik asitlerin, ürünün raf ömrünü uzattığı bilinmektedir. Laktik asit bakterileri bu rolleri ile gıda teknolojisinde büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan bazı araştırmalar, asit silajlardan farklı olarak, laktik asit bakterilerinin proteinlerin hidrolizi için proteazlar ürettikleri (Jini ve ark., 2011) ve bazı *Lactobacilli* türlerinin koruyucu etkiyi arttıran antimikrobiyal bileşikler üretebildiğini göstermiştir (Ruthu ve ark., 2012). Ayrıca asit silajlar ile kıyaslandığında yağ oksidasyonuna karşı da etkili

olabileceği düşünülmektedir. Laktik asit bakterileri üründe koruyucu ve detoksifiye etkiye de sahiptir. Düzenli olarak kullanıldığı takdirde, laktik asit bakterileri ile fermente olmuş ürünler, patojenik bakteriyel enfeksiyonlara karşı savaşmak için vücut direncini ve immün sistemi desteklemektedir. Bu nedenle, fermentasyonda laktik asit bakterilerinin tercih edilmesi ekonomik öneme sahip olmalarının yanında sağlık iyileştirici özelliklerinden de kaynaklanmaktadır (Chelule ve ark., 2010).

Laktik asit bakterilerinin bağırsak yüzeyleriyle ilişkilendirilebileceğine dair kanıtlar, balık bağırsağından izole edilmiş laktik asit bakterilerinin balık patojenlerine karşı antagonistik etkide olduğunu göstermişlerdir (Ringo ve Gatesoupe 1998). Son on yılda, balıkların sindirim sistemindeki epitel yüzeylerde asit üretiminin laktik asit bakterilerinin faaliyetleriyle ilgi olduğu ifade edilmiş ve genel olarak laktik asit bakterilerinin balıkların normal bağırsak florasının bir parçası olduğu kabul edilmiştir (Joeborn, 1998; Ringo ve Gatesoupe, 1998).

Starter kültür tanımı gıda sanayinde kontrollü koşullarda standart kalitede ürün elde etmek için tercih edilen mikroorganizmaları kapsamaktadır. Bu amaçla kullanılan önemli laktik asit bakterileri arasında *Leuconostoc, Streptococcus, Lactobacillus, Enterococcus, Aerococcus* ve *Pediococcus* spp. türleri sayılabilmektedir (Chelule ve ark., 2010). Bu bakterilerin birçok gıda kaynağından temin edilebildiği gibi, çeşitli balık türlerinden de izole edilebildiği bilinmektedir. Ringo (2004) balığın karın bölgesi ve içorganlarından *Carnobacteriaceae, Lactobacillaceae, Enterococcaceae, Streptococcaceae, Leuconostocaceae* ve *Aerococcaceae* gibi fermentasyon yeteneğine sahip 6 familya tanımlamıştır. Yapılan bir diğer çalışmada, sazan iç organlarından 10^7 –10^8 kob/g düzeyinde *Lactococcus garvieae, Enterococcus faecium* ve *Pediococcus acidilactici* izole edilmiştir (Cai ve ark., 1999). Iskarta veya su ürünleri işleme atıkları gibi önemli besin kaynaklarından endüstriyel açıdan yararlanabilmek için, bu kaynakların fermentasyonunda kullanılabilecek uygun laktik asit kültürlerinin seçimi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle balık silajı gibi fermente ürünlerin üretiminde

kullanılacak LAB'nin doğal olarak bulunan balık türlerinden izole edilmesi, ülkemiz şartlarında balık silajı üretimi için en uygun türlerin belirlenmesini sağlayacaktır. Böylece fermente su ürünleri üretiminde özellikle ithal starter kültür arayışı içerisine girilmesinin önüne geçilmesi mümkün olabilecektir. Bu amaçla yapılan bu projede, balık silajı üretiminde kullanılabilecek doğal LAB üyelerinin izolasyonu için farklı türlerde tatlısu ve deniz balıklarının deri, kas ve iç organlarından izolasyon yapılmıştır. Saflaştırılan LAB üyeleri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre yapılan ön tanımlamalardan sonra moleküler tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlanan bakterilerin fermentasyon yetenekleri test edilerek fermente su ürünleri üretimi için önerilebilecek uygun LAB türlerinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Laktik Asit Bakterileri (LAB)

Mikrobiyoloji bilim dalının ortaya çıkması ile 19. yüzyılın sonlarında, doğada yaygın olarak bulunan laktik asit bakterileriyle ilgili çalışmalar başlamıştır. İlk olarak sütte fermentasyon ve pıhtılaşmaya sebep olan bu canlılar laktik asit bakterisi olarak isimlendirilmiş ve taksonomik olarak *Lactobacillaceae* familyasında sınıflandırılmışlardır. Morfolojik olarak kısa, uzun veya kok şekilli olarak tanımlanan üyeler fizyolojik olarak benzerlik göstermektedirler. Üyelerin tümü gram pozitif, katalaz negatif, bazı istisnaları hariç spor oluşturmayan ve hareketsiz bakteriler olarak tanımlanmaktadır. Laktik asit bakterileri gelişebilmek için fermente edebilecekleri besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Mutlak fermantatiftirler ve son fermentasyon ürünü olarak laktik asit üretmektedirler (Çon ve Gökalp, 2000; Yerlikaya ve Kesenkaş, 2009). Spor oluşturmayan ve katalaz negatif olan bu grubun gıdalarda en yaygın olarak görülen cinsleri *Carnobakterium, Enterecoccus, Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* ve *Weisella*'dır (Holzapfel ve ark., 1995). Karbonhidrat metabolizmaları göz önüne alındığında homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki alt gruba ayrılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri glikozdan laktik asit oluştururken, heterofermentatif olan laktik asit bakteri türleri, laktik asitin yanında diğer bazı organik asitleri ve karbondioksit üretirler. Laktik asit bakterileri taksonomisi uzun yıllardan beri bakterilerin fenotipik özellikleri baz alınarak gerçekleştirilmekte ve bu değerlendirmeye göre LAB; *Thermobacterium, Streptobacterium* ve *Betabacterium* şeklinde üç alt gruba ayrılmaktadır (Klein ve ark., 1998).

Laktik asit bakterileri gıda içerisindeki mikroflora dengesini yararlı yönde değiştirirler ve zararlı bakterilerin gelişimini engelleyerek sindirim sistemi ve immün sistemi desteklemektedirler. Bu bakterilerin hidrojen peroksit, laktoperoksidaz, bakteriyosin ve bazı organik asitleri üretebilmeleri nedeniyle

patojen mikroorganizmaları inhibe ettikleri ve halk sağlığı açısından güvenli ürünler oldukları kabul edilmektedir. Ayrıca uygulandıkları gıdaya kazandırdıkları hoş doku ve tat, kabul görmesinin bir diğer nedenidir (Desniar Rusmana ve ark., 2013). Gıdalarda ve alkollü içeceklerin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan laktik asit bakterileri yeni fermente ürünlerin geliştirilmesinde de yer alan önemli endüstriyel mikroorganizmalardır. Tüm bu olumlu özelliklerinden dolayı su ürünleri işleme teknoloji alanında da laktik asit bakterileri üzerine balık ile yapılan çalışmalara ilgi artmaktadır.

2.1.1. İzolasyon

İzolasyon, bir mikroorganizmayı saf halde elde etmektir. Doğada genellikle karışık halde bulunan mikroorganizmalardan çeşitli amaçlar ile saf kültürlerin elde edilmesi gerekir. Saf kültür, sadece bir tek mikroorganizma hücresinden çoğaltılmış olan mikroorganizma bütünüdür. İzolasyon; karışık bir kültürden sadece istenen bir ya da daha fazla mikroorganizmanın saf halde elde edilmesi işlemidir (Temiz, 1994).

2.1.2 LAB'nin Fermente Su Üünleri Üretiminde Kullanımı İle İlgili Çalışmalar

Silaj, fermente su ürünleri üretiminde en basit ve en kullanışlı yöntemlerden birisidir. Gıda teknolojisinde önemli bir yere sahip olan laktik asit bakterilerinin fermentasyonu ile üretilmesinin yanı sıra, formik, probiyonik, sorbik gibi organik veya sülfürik asit gibi organik olmayan asitler ile de yapılabilmektedir.

Faid ve ark. (1997), yaptıkları bir çalışmada, parçalanmış sardalya atıkları, iç organlar, kuyruk, baş ve %25 melas karışımına *Saccharomyces* türleri ve *Lb. plantarum* starter kültürlerini inoküle etmişlerdir. Silajların 22 ºC'de inkübasyonu sağlanmıştır. Daha sonra 15 günlük fermentasyon işlemi sürecinde biyokimyasal özellikleri ve besinsel kalitedeki değişimleri incelenmiş ve fermentasyon işlemi sonunda pH'ın 4.2 ve 4.5'te sabit kaldığı belirtilmiştir. Silajların toplam canlı

sayımı, koliform, *Clostridium*, lipolitik ve proteolitik bakteriler gibi mikrobiyal değişimleri incelenmiştir. Koliform ve *Clostridium* sayılarının hızlı bir azalma göstererek 5-7 günden sonra düşük değerlere ulaştığı, lipolitik ve proteolitik mikroorganizmaların fermentasyon işlemi esnasında önemli bir şekilde azalış gösterdiği belirlenmiştir.

Hammoumi ve ark. (1998a), sardalya atıklarına %15 melas ve *Lb. plantarum* starter kültür ilave edilerek hazırladıkları silajları 22 ºC'de 20 gün fermente etmişlerdir. Besinsel kalite ve biyokimyasal değişimler 15 günlük fermentasyon işlemi süresince incelenmiştir. Fermente ürünlerde pH'ın önemli bir şekilde azaldığı ve depolama sonunda 4.2 ve 4.5 değerlerinde sabit kaldığı gözlenmiştir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada, farklı oranlarda rasyona ilave edilen balık silajının tavuk beslenmesinde azot kaynağı olarak da kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Hammoumi ve ark. (1998b), yaptıkları benzer bir çalışmada *Sardina pilchardus*'un atıklarına *Lb. plantarum* inokülasyonu ile hazırlanan silajların kepek ve öğütülmüş arpa ile karıştırılarak hayvan beslenmesinde kullanımını araştırmışlardır. Araştırmacılar, kümes hayvanlarının beslenmesinde balık atıklarının nitrojen kaynağı olarak kullanılabilmesinin yanı sıra probiotik katkı maddesi olarak kullanılabileceğini de ifade etmişlerdir.

Bilindiği gibi balık unu üretimi ham maddenin miktarına bağlıdır ve yatırım maliyeti yüksektir. Balık silajı ise üretim prosesinin ölçekten bağımsız olması, teknolojisinin basit ve yatırımının az olması nedenleriyle balık ununa göre cazip bir alternatiftir. Fagbenro ve Jauncey (1998), yaptıkları bir çalışmada tüm ve parçalanmış tilapia atıkları karışımına 50 ml/kg *Lb. plantarum* starter kültürü ve 150 g/kg melas ilave etmiş, 50 litrelik plastik fıçılar içerisinde anaerobik koşullarda 30 ºC'de 7 gün fermente edilmesini sağlamışlardır. Olgunlaşan silaj pastörize edildikten sonra 30 ºC'de 180 gün depolanmıştır. 50 ml/kg soğan ekstraktı antioksidant olarak ilave edilmiştir. Yaş silaja tavuk unu, hidrolize olmuş soya unu ve balık unu ilave edilerek, soğuk ekstraksiyon metodu ile pelet hale getirilmiş

yemle besleme yapıldığı belirtilmiştir. Böylelikle rasyondan çıkan balık unu kadar balık silajı ilavesiyle yem maliyetinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Vidotti ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada ticari olarak işlenmiş deniz balığı, tatlı su balığı işleme atıkları, tilapia fileto atıkları kullanılarak asit hidrolizi ve anaerobik fermentasyonla balık silajı üretmişlerdir. Asit hidrolizi için 20 ml/kg formik asit ve 20 ml/kg sülfirik asit, fermentasyon işlemi için 50 g/kg *Lb. plantarum* ve 150 g/kg şeker melası kullanılmıştır. Taze materyallerin protein ve aminoasit kompozisyonları belirlenmiştir. Deniz balığı atıklarının protein içeriğinin, tatlı su balık atıkları ve tilapia balık atıkları ile karşılaştırıldığında daha yüksek değerde protein içerdiği bulgulanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm balık atıklarının aquakültürde kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir.

Rahmi ve ark. (2008), yaptıkları bir çalışmada, iç organ, baş ve deriden oluşan su ürünleri işleme tesisi atıklarına %10 melas ve *Lb. plantarum* starter kültürü aşılanarak silaj üretmişlerdir. Hazırlanan bu silajlar, 25 °C'de 10 gün fermentasyona bırakılmıştır. Koyunlar %40 arpa- %25 balık silajı- 35% buğday kepeği ya da %40 arpa-%50 balık silajı- % 1 buğday kepeği olarak 2 farklı rasyonla 9 hafta boyunca beslenmişlerdir. Kontrol yemi ise %40 arpa ve %60 buğday kepeğinden oluşmuştur. Deneme sonucunda balık silajı içeren yem ile beslenen koyunların kontrole kıyasla canlı ağırlıklarında net artışlar gözlenmiş olup, et özellikleri ve karkas biçiminde olumlu sonuçlar rapor etmişlerdir.

Vazquez ve ark. (2010), çalışmalarında midye atığı kullanmış, %45 kabuk, %20 kalıntı et, %15 epifuana, %15 yosun ve %15 çamur oranında homojenize ederek laktik asit bakterileri yardımıyla silaj elde etmişlerdir. Araştırmacılar yeterli miktarda fermente olabilen şekerin varlığında, steril olmayan koşularda bile, laktik asit bakterilerinin fermantasyonunun başarılı olduğunu belirtmişlerdir.

Gongora ve ark. (2012), 16 laktik asit bakterisi suşunun, işleme fabrikasından temin edilen hake balığı (*Merluccius hubbsi)* atıkları üzerindeki fermentasyon yeteneklerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar sadece 3 *Lactobasillus* türünün karbon kaynağı olarak glukoz ve sükrozu kullandığında

pH'yı 4 ve altına düşürebildiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar silaj olgunlaşma prosesi için asitleşme kapasitesi, sıcaklık ve safra tuzları gibi diğer streslere karşı toleransını ve daha düşük optimum sıcaklık toleransını değerlendirdiklerinde, üç *Lactobasillus* türünden sadece *Lb. arizonensis* türünü silaj için uygun bir suş olarak tanımlamışlardır. Bu laktik asit bakterisinin ılıman veya soğuk iklim bölgelerinde balık fermentasyonu için önemli bir alternatif oluşturduğunu rapor etmişlerdir.

Benzer şekilde yapılan bu proje ile bölgemiz için silaj hazırlamada uygun LAB türlerinin belirlenmesi literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

2.1.3. Balıklardan LAB İzolasyonu İle İlgili Çalışmalar

Üründe bozulma etmeni ve patojenik bakteri gelişimini engellediği bilinen laktik asit bakterileri, antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit ve asetat gibi organik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve bakteriyosin gibi bazı metabolitleri üretmektedir (Desniar ve ark., 2013).

Ringo (2004), *Lactobacillales*' ların 6 familyasının örnekleri balıkların karın, ve bağırsaklarından 6 LAB familyasını izole edip tanımlamıştır. *Lactobacillaceae* ilk önce *Lactobacillus* cinsi sonrasında da nadiren *Pediococcus* spp. olarak rapor edilmiştir. *Carnobacteriaceae*, *Carnobacterium* spp.'nin sıklıkla tanımlanması nedeniyle en yaygın familya olduğu bilinmektedir. *Streptococcaceae* ise, *Streptococcus* ve *Lactococcus* cinsleri ile temsil edildiği ve *Enterococcaceae* içinde *Vagococcus* nadiren gözlendiğini; *Enterococcus* spp. 'nin en yaygın olduğunu bildirmiştir. Son 2 familya seyrek gözlendiği: *Aerococcaceae, Aerococcus* sp. 1 defa bildirilmiş ve *Leuconostocaceae* içinse birkaç sayımda *Leuconostoc* spp. ve *Weissella* sp. görüldüğünü rapor etmiştir.

Balıklarda bağırsak mikroflorasını en önemli özelliklerinden biri de çeşitliliktir. Spanggaard ve ark. (2000) 3 farklı çiftlikte gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) bağırsak mikroflorasını karşılaştırdığında, çok geniş bireysel değişimler bulduğunu rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar bir çiftlikte bir örnekleme zamanında *Carnobacterium spp.*'nin kültüre edilebilen izolatlar

arasında dominant olduğunu, fakat bu cinsin diğer örneklerde tespit edilemediğini rapor etmişlerdir.

Cai ve ark. (1999), sazan da (*Cyprinus carpio*) LAB sayısını 10^7 –10^8 kob/g olarak rapor etmiş ve bu LAB türlerini çoğunlukla *Lc. garvieae*, *Pd. acidilactici* ve *Ent. faecium* olarak tanımlamışlardır.

Balıkta LAB daha çok tatlı su balıklarında çalışılmış, fakat LAB aynı zamanda deniz balıklarında da bulunduğu bilinmektedir (Gatesoupe, F. J., 2008).

Gonzalez ve ark. (2000), tatlı su balıklarından (özellikle vahşi kahverengi alabalık) ve gelişim evraklarından izole edilen 249 LAB suşu'nun karakterizasyonu ve tanımlamasını gerçekleştirmişlerdir. Suşların yaklaşık %90' nının (226 suş) asetat (Rogosa) agarında büyümediğini, fenotipik homojenitesinin %86 oranında yüksek ve *Carnobacteri* cinsine bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. *Carnobacter*' lerin çoğu *C. piscicola* (156) olarak tanımlanırken, *C. divergence* türü ise sadece 10 suş ile temsil edilmiş ve toplam 59 *Carnobakter* tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Genel olarak *Lactobacillus, Enterococcus, Lactococcus* veya *Vagococcus*' un yalnızca 22 suşu elde edilmiştir. Cins seviyesinde tanımlanamayan yalnızca bir suşu kalmıştır.

Seppola ve ark. (2006), Atlantik morinasının (*Gadus morhua*) arka bağırsak kısmından *Carnobacteria* olarak tüm kültüre edilebilir izolatlarını tanımlamışlardır. Balık bağırsaklarında gözlenen mikrobiyata çeşitliliğinin asıl sebebini çevresel değişimler olarak gözlemlemişlerdir.

Al-Harbi ve Uddin (2003), *Streptococcus* sp. üyelerinin acı su ve Nil tilapyalarında yüksek oranda bulunduğunu, çökelti, tatlı su ve hibrit tilapyalarda (*Oreochromis niloticus* ve *Oreochromis aureus)* bakteriyel toplulukların benzerlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Balıklar da bakteri florasındaki sezonsal

varyasyonda asıl sebebin sıcaklık olduğunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Bucio ve ark., 2006).

Hagi ve ark. (2004), 20°C'nin üzerinde sıcaklıklarda, balık bağırsaklarında *Lc. raffinolactis*'dan *Lc. lactis*' e bir değişim gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda yemlerin de bağırsak laktik asit bakterisini etkilediğini gözldemlenmiştir.

Ringo ve Olsen (1999) çalışmalarında düşük karbonhidratlı yemle beslenen alp alabalığının (*Salvelinus alpinus*) bağırsaklarından *Carnobacterium divergens* izole edilirken, buğday küspesiyle beslenen balıklarda diğer *Carnobecterium* üyeleri tespit edilmiştir.

Yuliana ve ark. (2018) yaptıkları bir çalışmada, Bangka Belitung bölgesinin geleneksel fermente balıklarından biri olan Rusip'i, fermantasyonu süresince mevcut laktik asit bakterilerini tanımlamışlardır. Fermente balıktan 29 izol edilmiş ve tanımlanmıştır. Sonuçlar, *Leuconostoc* türünün fermantasyonu ile birlikte mevcut olduğu, fermantasyonun 1 ve 15. günlerinde mevcut laktik asit bakterilerinin ise fermantasyonun başlangıcında *Streptococcus*, ortasında da ise *Lactococcus* olduğu bildirilmiştir.

Nair ve Surendran (2004), yaptıkları bir çalışmada LAB üyelerini taze ve dondurulmuş olan çeşitli balık ve karides örneklerinden izole etmişlerdir. İzole edilen 13 *Lactobacillus* türünün %64'ü tanımlamış, *Lb. plantarium*' un bunların arasındaki en baskın tür olduğunu bildirmişlerdir.

Ringo ve ark (2000), yapmış oldukları çalışmada aşırı stres ve açlığın Atlantik somon (*Salmo salar L.*) balığının sindirim sistemine ve laktik asit bakterileri üzerine etkisini araştırmışlardır. Balık eti, su ve sindirim sistemi kanalından izole edilen 752 bakteri izolatının 201 tanesinin *Carnobacteria* cinsine ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların hepsi *C. piscicola*'nın benzeri olarak tanımlanmıştır. Balık üzerindeki günlük stres ve açlığın sindirim sistemi ile ilişkili toplam kültür bakteri sayısına veya *C. piscicola*'nın popülasyon seviyesine hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, farklı bağırsak bölgelerini kolonize eden *C. piscicola* benzeri izolatların (ön bağırsak, orta bağısak ve son bağırsak),

balık patojeni olan *Aeromonas salmonicida* gelişimini engelleyici madde üretme yeteneği araştırılmıştır. Test edilen 199 *C. piscicola* izolatının 139' un patojenin gelişimini engellendiği gözlenmiştir.

Balcazar ve ark. (2008), balıktan izole edilen *Lc. lactis* CLFP 101, *Lb. plantarum* CLFP 238 ve *L. fermentum* CLFP 242 laktik asit bakterilerinin in vitro koşullar altında bağırsak mukusunda bulunan farklı balık patojenlerinin (*Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida, Yersinia ruckeri* ve *Vibrio anguillarum*) tutunmasını engellemek için yapmış oldukları çalışmada, sadece *Lc. lactis* CLFP 101 üyesinin balık patojenlerinin tümünün tutunmasını azalttığını bulurken, *Lb. plantarum* CLFP 238 üyesinin sadece ise *A. hydrophila* ve *A. Salmonicida'*nın tutunmasını azalttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca *V. anguillarum* dışındaki balık patojenlerinin tümünün bağırsak mukozasına tutunması *L. fermentum* CLFP 242 ve üç laktik asit bakterisi suşu ile birlikte azaltılmıştır. Ayrıca *Lc. lactis* CLFP 101'in kültür sıvısında test edilen bütün balık patojenlerine karşı antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Bütün LAB suşlarının nispeten düşük pH ve yüksek balık safrası yoğunluğunda hayatta kalabildikleri belirtilmiştir.

Kumar ve ark. (2013), balıkların sindirim sisteminden probiyotik özellikli *Lactobacillus* türlerinin izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu amaçla *Labeo* spp., *Clarias* spp., *Mystus* spp., *Clupisoma* spp. ve *Pangasius* spp. olmak üzere toplam 5 balık türünden bağırsak içeriği alınmıştır. Tanımlama neticesinde incelenen balıklardan izole edilen 22 *Lactobacillus* izolatının 19'unun *Lb. plantarum* ve 3 izolatın *Lb. casei* bakteri türü olduğu belirlenmiştir.

Jini ve ark. (2011), tatlı su balığı işleme atıklarından laktik asit bakterilerinin izolasyonu ve tanımlamasını yapmışlardır. İzole edilen FJ1 *E. faecalis* NCIM5367 ve LP3 *P. acidilactici* NCIM5368 bakterisinin her ikisi de proteolitik ve lipolitik özellikler göstermiştir. Seçilmiş LAB morfolojik, biokimyasal ve moleküler tanımlaması yapılmış ve tanımlama için seçilen 6 izolatın hepsi de farklı insan patojenlerine karşı antibakteriyel özellikler göstermiştir. Ayrıca seçilen izolatların hepsi sefalotin ve klindamisin gibi

antibiyotiklere karşı duyarlı olurken, kotrimaksazol ve vankomisin'e karşı direnç göstermiştir. *P. acidilactici* FM37, *P. acidilactici* MW2 ve *E. faecalis* FD3'ün eritromisine karşı duyarlı olduğunu tespit edilmiştir. Araştırmacılar proteolitik ve lipolitik özelliklere sahip FJ1 (*E. faecalis*) ve LP3 (*P. acidilactici*) türlerinin balık işleme atıklarından lipit ve proteinlerin fermantatif geri kazanımı için uygun türler olduğunu belirtmişlerdir.

Benzer amaçla planlanan bu projede ülkemizde bulunan tatlısu ve deniz balıklarından izole edilebilen laktik asit bakteri türlerinin tanımlanması yapılarak, ekonomik değeri olmayan balık türleri veya su ürünleri işleme atıklarında fermentatif bakteri olarak kullanılabilme yetenekleri ortaya konacaktır. Böylece, son derece zengin besin içeriğine sahip bu kaynakların lipit ve proteinlerinin geri kazanımını hedefleyen akademik ve endüstriyel çalışmalar için literatüre önemli katkılar sağlanabilecektir.

3. MATERYAL VE METOD

Bakterilerin fenotipik tanımla yöntemleri genotipik yöntemlere nazaran daha ucuzdur. Fenotipik tanılama çalışmaları genotipik API (Bio Merieux), Enterotube (Roche), Phonix (BD), Crystal Apı (BBL), BIOLOG, Micro Scan gibi özelleştirilmiş tanılama yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir. Bazı fenotipik tekniklerin LAB tanımlamada uygun olduğu düşünülse de, sonuçların benzer genotip gösteren türler arasında hatalı sonuçlar verdiği, ileri tanılama yöntemleri ile kanıtlandığı bilinmektedir (Yerlikaya, 2014).

Otomotize tanımlamalar hızlı, yüksek doğrulukta ve tekrarlanabilir tanılama yaparken daha az teknik iş gücü gerektirmesiyle tercih sebebidirler. Pahalı olması, bakteri morfolojisinin bilinmesini gerektirmesi ve bakteri süspansiyonunun yoğunluğunun oluşturulması zorunluluğu, yakın biyokimyasal özellik gösteren türlerin tanımlanarak birbirinden ayrılma zorunluluğu gibi dezavantajları vardır. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda genotipik tanılama yöntemlerinin kullanılması doğru sınıflandırma ve ayrım sağlamak amacıyla uygun görülmektedir (McCartney, 2002).

Son yıllarda ülkemizde moleküler tanılama yöntemlerinin kullanımı hız kazanmış olup, araştırmalarda en çok kullanılan yöntemlerin başında PFGE (Darbeli Alan Elektroforezi) (Durmaz ve ark., 2007; Us ve ark., 2011), PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Oktay ve Hepekran, 2010; Koluman, 2010) ve 16s rDNA dizilim analizi (Osmanağaoğlu ve ark., 2010; Adıgüzel ve ark., 2011) gelmektedir.

Bu çalışmada izolatlar fenotipik tanımlama yöntemleri olan API 50CHL ve API 20-STREP test kitleri kullanılarak ön tanımlanmıştır. Ön tanımlanan bakteri türlerinin doğrulaması moleküler tanılama yöntemi olan polimer zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

3.1. Materyal

Laktik asit bakteri üyelerinin izolasyonu için çalışmada tatlı su balığı türleri olarak sazan (*Cyprinus carpio)* ve yayın balığı (*Silurus glanis*), deniz balığı türleri olarak da çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve kefal (*Mugil cephalus)* kullanılmış olup bu balıklar Adana Bölgesinde bulunan balıkçılardan taze olarak temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Balıklardan Laktik Asit Bakteri Türlerinin İzolasyonu

Çalışmada LAB izolasyonu için her balık türünden en az 15'er örnek temin edilmiş ve bu örnekler içi buzlu strafor kutularda laboratuara getirilmiştir. Balıklar laboratuara ulaştırılır ulaştırılmaz steril koşullarda örneklemelere başlanmıştır. Laktik asit bakteri izolasyonu için balıkların kas, deri ve iç organlarından örneklemeler yapılmıştır. Balıkların deri örneklemesi steril swaplar kullanılarak steril salin solüsyon içerisinde yapılmıştır (Resim 3.1).



Resim 3.1. Balıklardan deri örneklerinin alınması

Kas ve iç organ örneklemesi için ise, her bir balığın kasından ve iç organlarından aseptik olarak 10 gr örnek alınarak 90 ml steril salin solüsyonunda stomaker içerisinde 2 dk homojenize edilmiştir (Resim 3.2).



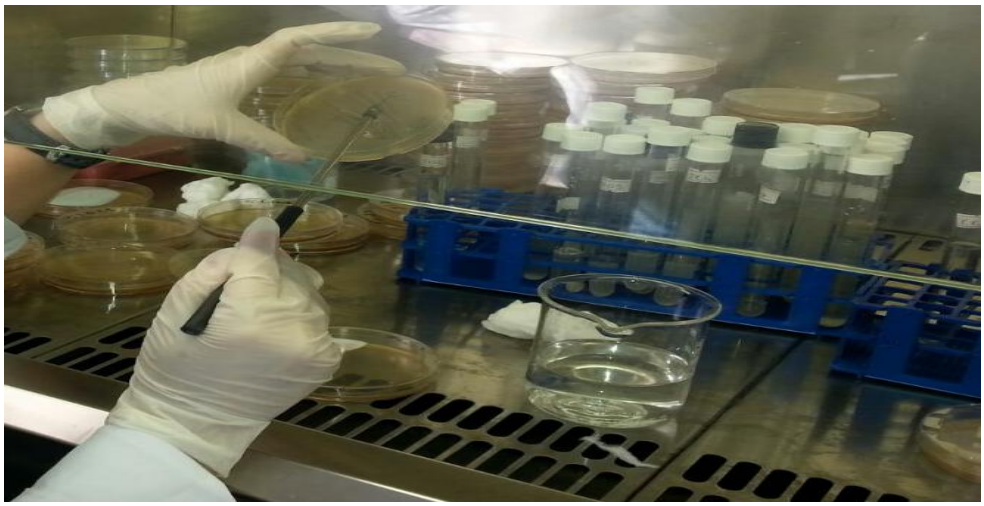
Resim 3.2. Balıkların kasından ve iç organlarından yapılan örneklemeler

Elde edilen örnekler $10^{-8'}$ e kadar seyreltilerek, her biri seyreltildikten sonra 1 mL alınarak boş petrilere aktarılmış ve üzerine 45 ^{o}C' ye kadar soğutulmuş MRS

agar eklenmiştir (Resim 3.3 ve 3.4). Petri kutuları sonrasında 37 ^{o}C' de 48-72 saat inkübe edilmiştir.



Resim 3.3. Bakteriyel izolasyon için örneklerin petri kutularına aktarımı



Resim 3.4. Kolonilerin saflaştırılması



Resim 3.5. Bakteriyel kültürlerin inkübasyonu

Elde edilen koloniler rast gele seçilerek saf kültür elde edilene kadar MRS agar üzerine aşılama işlemleri gerçekleştirilmiştir (Leisner ve ark., 1997) (Resim

3.4). Sonrasında saflaştırılmış laktik asit bakteri üyeleri MRS broth içerisine alınarak 30 ºC' de 24 saat inkübe edilmiştir (Resim 3.5).

3.2.2. Bakteriyel Kolonilerinin Biyokimyasal Tanımlanması ve Çoğaltılması

Elde edilen izolatların biyokimyasal (katalaz ve oksidaz testi) ve koloni morfolojisine bakılarak ön tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. MRS broth'da 24 saat gelişen kolonilere öncelikle gram testi yapılmıştır (Salle, 1954). Katalaz testi; MRS agar içeren petrilerde gelişen koloni üzerine 20 µL %3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılarak gaz kabarcıklarının oluşup oluşmadığına bakılarak test edilmiştir. Gaz oluşturan örnekler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hammes ve Vogel, 1995). Sitokrom oksidaz testi için gelişen koloni üzerine Kovac's cytochrome oxidase reagent eklendikten sonra mavi renk oluşumuna göre sitokrom oksidaz enzim varlığına bakılmıştır. Karbonhidrat fermantasyon testleri ise API 50CHL ve API-20 STREP kitleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.2.1. *Lactobacillus* ve İlgili Üyelerin Tespiti İçin Kullanılan API 50CHL Kiti

Tanımlanması yapılacak olan saf izolatlar, MRS Agar üzerinde 37 °C'de 24 saat geliştikten sonra steril öze ile 2 mL'lik süspansiyon medyum (ref. 70700) içerisinde Mcfarland hücre densitometresi yardımıyla 2 Mcfarland hücre yoğunluğunda standardize edilmiştir (Resim 3.6). Daha sonra API 50CHL kitinde bulunan kuyucuklar içerisine aşılanarak (Resim 3.7) 29 ±2 °C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. Her bir izolat için bu işlemler ayrı ayrı yapılmıştır.



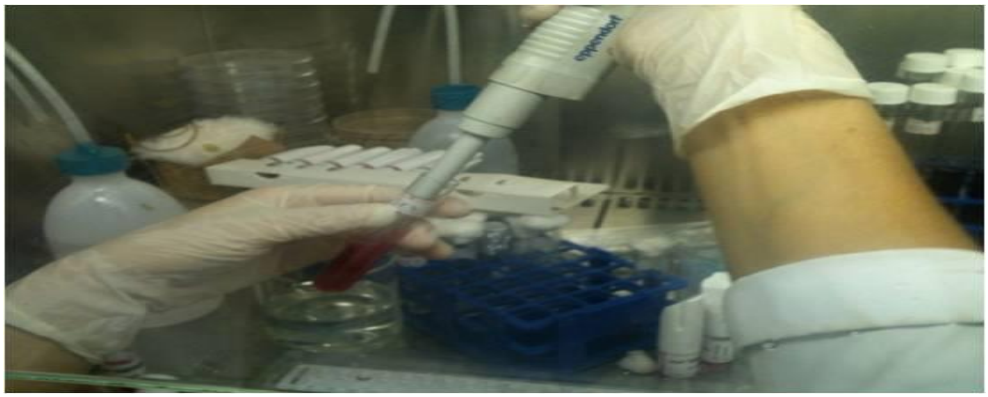
Resim 3.6. Mcfarland hücre densitometresi yardımıyla hücre yoğunluğunun ayarlanması



Resim 3.7. API 50 CHL kitine bakteriyel kültürlerin aşılanması

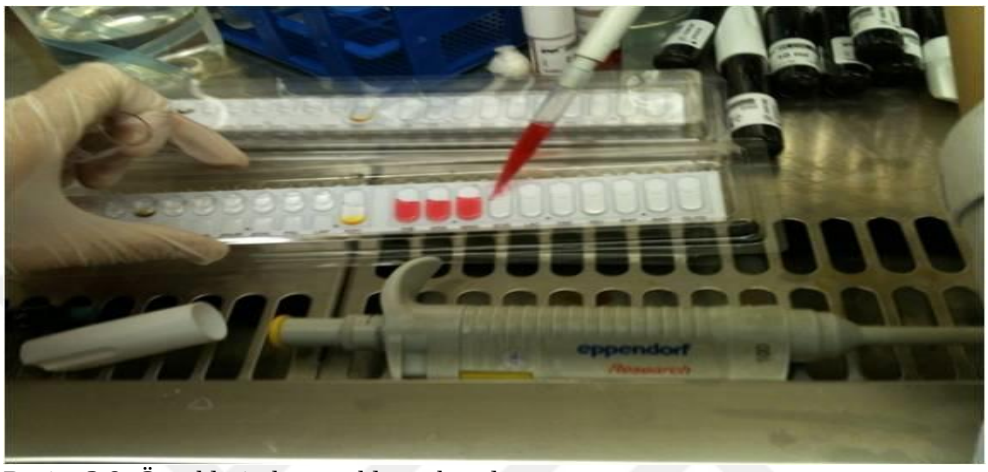
3.2.2.2. *Streptococcus* Üyelerini Belirlemek İçin Kullanılan API 20 STREP Test Kiti

37 °C'de 24 saat MRS agarda gelişen saf izolatlar 2 mL API süspansiyon medyum içerisine (ref. 70700) 4 Mcfarland hücre yoğunluğunda standardize edilmiştir (Resim 3.8).



Resim 3.8. 4 Mcfarland hücre yoğunluğundaki LAB izolatları

Sonrasında her bir izolat API 20 STREP test kitinde bulunan kuyucuklara aktarılmıştır (Resim 3.9). Test kitleri sonrasında 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.



Resim 3.9. Örneklerin kuyucuklara aktarılması



Resim 3.10. API 50 CH ve API 20 STREP' e aşılanan örneklerin ön tanımlamasının yapılması

İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki renk değişimi pozitif ve negatif şeklinde sonuç kağıdına işaretlenmiş ve WEB tabanında (API Lab Plus Program, BioMerieux) ön tanımlama gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Bakteriyel Kolonilerin Moleküler Tanımlanması

Ön tanımlaması yapılan bakteri türlerinin doğrulanması Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuarında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflığı elektroforez jelde değerlendirilmiştir.

3.2.3.1. 16S Ribozomal DNA Bölgesinden Primerlerin Tasarlanması

Farklı bakterilerin 16S ribozomal DNA gen bölgeleri ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) erişimi kullanılarak karşılaştırılmış ve bütün türlerde ortak olan bölgeden kullanılan 2 geri (reverse) primeri ve 2 ileri (forward) primerleri tasarlanmıştır (Çizelge 3.1 ve 3.2).

Çizelge 3.1. Çalışmanın moleküler aşamasında kullanılan 2 geri (reverse) primeri

Primerin adı	Reverse primer
AKY519R	GWATTACCGCGGCKGCTG
AKY1064R	AYCTCACGRCACGAGCTGAC

Çizelge 3.2. Çalışmanın moleküler aşamasında araştırılan 2 ileri (forward) primeri

Primerin adı	Forward primer
AKY356F	ACWCCTAGGGWGGCWGC
AKY27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

3.2.3.2. Kromozomal DNA İzolasyonu

Kromozomal DNA, PCR ve nükleotid dizileme çalışmalarında kullanılmak için biyokimyasal olarak tanımlanan izolatlardan kromozomal DNA izolasyonu, 5ml' lik MRS sıvı besi ortamında 37 ºC'de bir gece geliştirilmiş izolatlardan yapılmıştır.

3.2.3.3. Plazmit DNA İzolasyonu

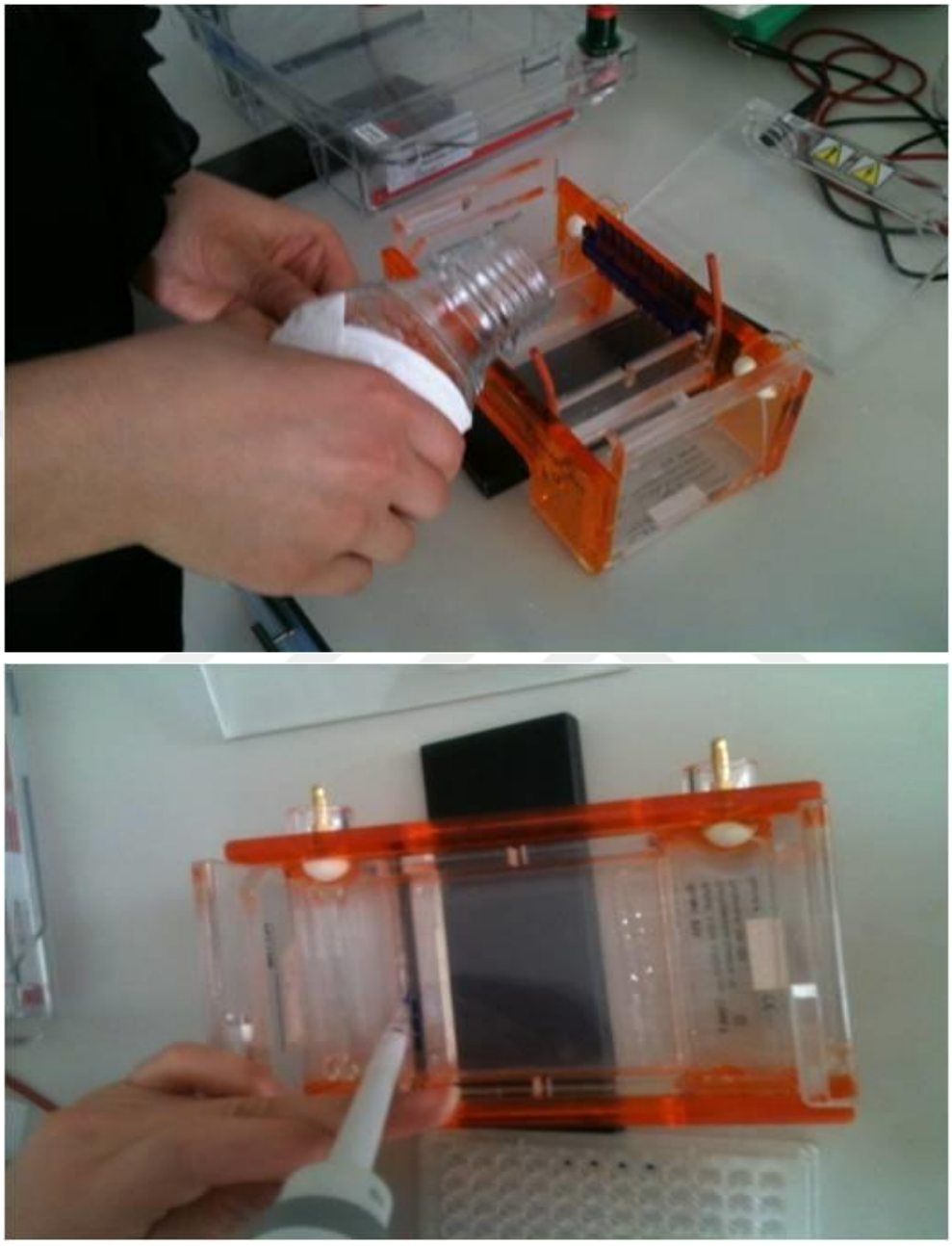
Projede tanımlanan suşlardan plazmit DNA izolasyonları manuel olarak ve kit izolasyon metotları kullanılarak yapılmıştır. Manuel plazmit izolasyonu modifiye edilmiş, Lee ve ark., (2007) yöntemine göre yapılmıştır. 100 mL sıvı besi yerinde 16 saat gelişen bakteri kültürü 10.000 devir/dk 'da 15 dk süre ile çöktürülmüştür. Bakteri peleti TES tamponu (50 mM Tris, pH 7.0, 20 mM EDTA, 0.2 mM sükroz) ile yıkandıktan sonra 2 mL %20 (w/v) sükroz ve 30 mg/mL lizozim içeren solüsyonda re-süspanse edilmiştir. 37 °C'de 1 saat süre ile karıştırıcılı sıcak blok'ta inkübe edilmiştir. Bunu takiben hızlı bir şekilde 10 dakika dondurulmuş ve çözdürülmüştür. 4mL alkali SDS solusyonu (%3 SDS, 0.2 N NaOH) karışıma eklenmiş ve oda sıcaklığında 7 dk inkübe edilmiştir. 3mL 3M sodyum asetat solüsyonu (pH 4.8) karışıma eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sonrasında 10.000 devir/dk da 25 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni tüpe transfer edilmiş ve eşit hacimde isopropanal eklenerek karıştırılmış ve 10.000 devir/dk da 25 dakika santrifüj yapılmıştır. Pelet kurutulmuş ve 9.4 mL ddH_2O (moleküler suda) ile çözdürülmüştür. 6 mL 7.5M amonyum asetat solüsyonu eklenmiş daha sonra eşit hacimde fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) solüsyonu ile ekstrakte edilmiştir. Karışım 10.000 devir/dk da 20 dk çöktürülmüş ve üst tabaka temiz tüpe transfer edilmiş ve üzerine 2 hacim etanol eklenerek 10.000 devir/dk 25 dakika santrifüj edilmiştir. Peletler %70'lik etanol ile yıkanarak 10.000 devir/dk da 5 dk çökeltilmiştir. DNA peletleri 0.1 mg/mL Rnase içeren 250 µL TE tampon çözeltisinde çözündürülmüş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen plazmit DNA'lar Nano-drop ile ölçülerek miktarı belirlenmiş ayrıca izole edilen DNA'ların jel görüntüleri de alınmıştır. İzole edilen plazmit DNA'lar kullanılmak üzere -20 ºC'de muhafaza edilmiştir. Manuel protokol ile yüksek konsantrasyonda (18413 – 12614 ng/µL) izole edilmiştir.

Kit kullanarak plazmit DNA izolasyonu; Plasmid DNA Extraction Kiti kullanarak firmanın (SIGMA-ALDRICH, FAVORGEN ve Thermo Scientific (Fermentas) verdiği prosedüre başlangıç 10 mg/mL solusyonuna lizozim eklenerek

37°C'de 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonra protokol takip edilmiştir. Elde edilen plazmit DNA'lar Nono-drop ile ölçülerek miktarı belirlenmiş ayrıca izole DNA' ların jel görüntüleri de alınmıştır. İzole edilen plazmit DNA' lar kullanılmak üzere -20 ºC'de muhafazalanmıştır.

3.2.3.4. DNA'nın Jel Elektroforezi

İzole edilen kromozomal DNA, plazmit DNA ve PCR ürünleri %0.6 ile %2 arasında değişen konsantrasyonda Agaroz jelde koşturulmuştur. Agaroz jel sonrasında UV ışığında görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır (Resim 3.11).



Resim 3.11. DNA jel elektroforez aşaması

3.2.3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine hedef nükleik asit zincirlerinin primerler ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanılarak laboratuar ortamında çoğaltılmasını sağlayan güvenilir bir yöntemdir. Üzerinde çalışılan genetik materyal çok az miktarda da olsa çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve böylece tanımlanabilir (Arda, 1995; Schochetman ve Jones, 1998). Reaksiyon, polimeraz enzimi ve gerekli nitelikli maddelerin bulunması halinde DNA'nın karşıt sıraları sentezleyebilme yeteneği ile sonuçlanır (Saiki ve ark., 1998; Walker ve Dounan, 1989).

PCR işlemi Fermentas DNA polimeraz enzimi kullanılarak toplam 40 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. 1 µL (20 pikomol) ileri primer, 1 µL (20 pikomol) geri primer, 1 µL dNTP (1 mM), 4 µL buffer $(NH4)_2SO_4$ (10X), 1,6 µL MgCl2, 1µL DNA polimeraz (5 u/µL), 1 µL kalıp DNA (~400 ng/mL) ve 29,4 µL dH_2O ile toplam hacim (40 µL) tamamlanarak hazırlanmıştır. PCR işlemi, 94 ºC DNA'nın denatürasyonu, değişken yapışma, 72 ºC de uzama sıcaklığı olarak ayarlanmıştır ve PCR 30 döngü olarak yapılmıştır. Koloni PCR uygulamalarında 1. PCR döngüsünden önce 95 ºC'de 5 dakikalık ön denatürasyon aşaması eklenmiştir (Şekil 3.12). Bunu takiben ise DNA dizileme ABI3130xl Gen Sekans Cihazı ile yapılmıştır (Şekil. 4.3).



Resim 3.12. PCR işleminin yapılması

3.2.4. Bakterilerin Fermantasyon Yeteneklerinin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen türlerin fermentasyon yeteneği karbon kaynağını kullanarak pH'ı düşürme özelliklerine (<4.5) göre belirlenmiştir (Gongora ve ark., 2012). Bu amaçla 10 g kıyılmış balık ve 10 ml glukoz içeren tüpler içerisine MRS broth' da 37 ^{o}C' de 24 saat geliştirilen hücre yoğunluğu McFarland Birimi Hücre Densitometresi ile 10^{8}-10^{9} cfu/g olarak ayarlanan 1ml laktik asit bakteri üyeleri aşılanmıştır. Sonrasında türler 37 ºC de 96 saat inkübe edilmiştir (Resim 3.13).



Resim 3.13. Bakterilerin fermantasyon yeteneklerinin belirlenmesi

Bu aşamadan sonra çalışmada, her 24 saatte bir pH metre yardımıyla kültür ortamının pH'sı ölçülerek, fermentasyona en uygun türlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bakteri İzolasyonu

Balık örneklerinden izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. İzole edilen üyelerin hepsi gram (+), oksidaz ve katalaz negatif olarak belirlenmiştir. MRS broth'da gelişen 18-24 saatlik kolonilere ilk olarak gram boyama testi yapılmıştır. Gram boyamasını takiben kolonilere katalaz ve oksidaz testi uygulanmış ve sonuç olarak API ile ön tanımlanmış bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Leunostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Aerococcus viridans*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc* spp., *Lactobaciilus curvatus* subsp. *curvatus*, *Lactobacillus plantarum* ve *Enteroccus faecium* olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Elde edilen bazı izolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Bakteri Türleri	Gram Boyama	Katalaz	Oksidaz
Lactobacillus delbrueckii subsp. *delbrueckii*	+	-	-
Leunostoc mesenteroides subsp. *cremoris*	+	-	
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	+	-	-
Aerococcus viridans	+	-	-
Lactobacillus fermentum	+	-	-
Leuconostoc spp.	+	-	-
Lactobaciilus curvatus subsp. *curvatus*	+	-	-
Lactobacillus plantarum	+	-	-
Enteroccus faecium	+	-	-

Çalışmada kullanılan balık örneklerinin farklı bölgelerinden izole edilen izolatların bulundukları organlara göre dağılımı Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çalışmada toplam 61 bakteri izolasyonu gerçekleşmiştir. API testi sonucunda

toplam 56 izolat ön tanımlanmış, 5 izolat tanımlanamamıştır. Buna göre izolatların %35.69'u *Leu. mes.* subsp. *cremoris*, %32.1'i *Aer. viridans*, %10.69'u *Lb. delb.*subsp. *delb.*, %7.12'si *Lc. lactis* subsp. *lactis*, %1.78'i *Lb. fermentum*, %1.78'i *Leuconostoc* spp., %1.78'i *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*, %1.78'i *Lb. plantarum*, %1.78'i *Enteroccus faecium* olarak ön tanımlanmıştır.

Çipuranın iç organlarından izole edilen izolatların %1.78'i *Lb. delb.* subsp. *delb.*, %1.78'i *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %1.78'i *Aer. viridans* olarak tanımlanırken, kas örneklerinden izole edilen izolatın %1.78'i *Lb. delb.*subsp. *delb.*, %3.57'sı *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %7.14'i *Aer. viridans* ve deri örneklerinden izole edilen izolatın %1.78'i *Leu. mes.* subsp. *cremoris*, %1.78'i *Aer. viridans* olarak tanımlanmıştır.

Levreğin iç organlarından izole edilen izolatın %1.78'i *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %1.78'i *Aer. viridans*, kas örneklerinden izole edilen izolatın %3.57'sı *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %1.78'i *Lc. lactis* subsp. *lactis*, %1.78'i *Aer. viridans* ve deri örneklerinden izole edilen izolatın %3.57'si *Leu. mes.* subsp. c*remoris* olarak tanımlanmıştır.

Kefalin iç organlarından izole edilen izolatın %1.78'i *Lc. lactis* subsp. *lactis*, kas örneklerinden izole edilen izolatın %3.57'sı *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %1.78'i *Lc. lactis* subsp. *lactis*, %1.78'i *Aer. viridans* ve deri örneklerinden izole edilen izolatın %1.78'i *Lb. delb.*subsp. *delb.*, %5.36'ü *Leu. mes.* subsp. *cremoris*, %1.78'i *Aer. viridans*, %1.78'i *Leuconostoc* spp. olarak tanımlanmıştır.

Sazanın iç organlarından izole edilen izolatın %5.36'ü *Leu. mes.* subsp. *cremoris*, %1.78'i *Lc. lactis* subsp. *lactis*, %3.57'sı *Aer. viridans*, %1.78'i *Lb. plantarum*, kas örneklerinden izole edilen izolatın %5.36'sı *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %1.78'i *Aer. viridans* ve deri örneklerinden izole edilen izolatın %1.78'i *Lb. fermentum* olarak tanımlanmıştır.

Yayının iç organlarından izole edilen izolatın %1.78'i *Lb. delb.*subsp. *delb.*, %3.57'sı *Leu. mes.* subsp. c*remoris*, %5.36'ü *Aer. viridans*, kas örneklerinden izole edilen izolatın %3.57'sı *Lb. delb.*subsp. *delb.*, %1.78'i *Leu.*

mes. subsp. c***remoris,*** %3.57'sı ***Aer. viridans*** ve deri örneklerinden izole edilen izolatın %1.78'i ***Lb. curvatus*** subsp. ***curvatus*** ve %1.78'i ***Enteroccus faecium*** olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.2. Balıklardan izole edilen ve API test kiti ile ön tanımlanan laktik asit bakteri üyeleri

	Çipura						Levrek						Kefal						Sabun						Yayın						%
	İÇ*	(%)	K	(%)	D	(%)	İÇ*	(%)	K	(%)	D	(%)	İÇ*	(%)	K	(%)	D	(%)	İÇ*	(%)	K	(%)	D	(%)	İÇ*	(%)	K	(%)	D	(%)	Toplam
Enterococcus faecium	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1,78
Lb.plantarum	0		0		0		0		0		0		0		0		0		1,78		0		0		0		0		0		1,78
Lb. curvatus subsp. curvatus	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1,78		1,78
Leuconostoc spp.	0		0		0		0		0		0		0		0		1,78		0		0		0		0		0		0		1,78
Lb. fermentum	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		1,78		0		0		0		1,78
Aer. viridans	1,78		7,14		1,78		1,78		1,78		0		0		1,78		1,78		3,57		1,78		0		5,36		3,57		0		32,1
Lc. lactis subsp. lactis	0		0		0		0		1,78		0		1,78		1,78		0		1,78		0		0		0		0		0		7,12
Leu.mes. subsp. cremoris	1,78		3,57		1,78		1,78		3,57		3,57		0		3,57		5,36		5,36		5,36		0		3,57		1,78		0		35,69
Lb.delb.subsp. Delbrueckii	1,78		1,78		0		0		0		0		0		0		1,78		0		0		0		1,78		3,57		0		10,69

*İO:İç organ, K:Kas, D: Deri, *Lb. delb.* subsp. *delbrueckii: Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Leu. mes.* subsp. *cremoris: Leunostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis: Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Aer. viridans: Aerococcus viridans*, *Lb. fermentum:Lactobacillus fermentum*, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus: Lactobacilus curvatus* subsp. *curvatus*, *Lb. plantarum: Lactobacillus plantarum.*

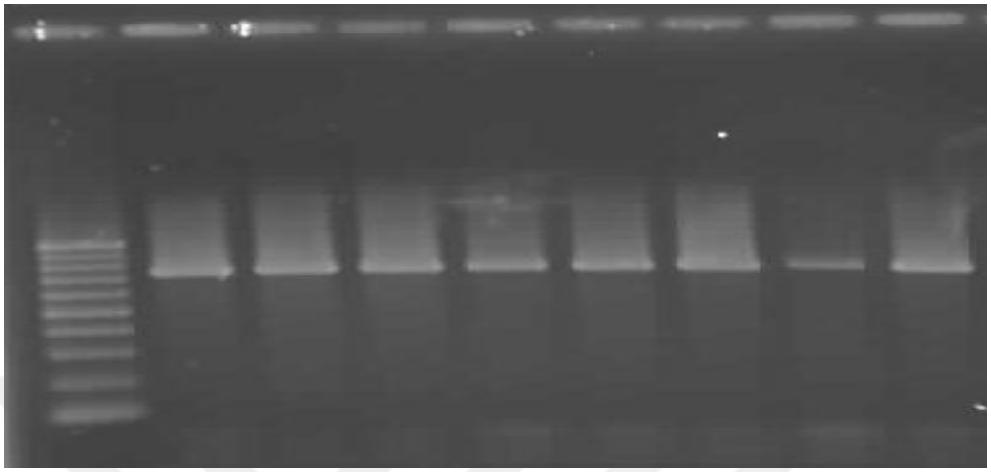
Kumar ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışmada 5 balık türünün sindirim sisteminden *Lactobacillus* türlerinin izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişler ve *Labeo* spp., *Clarias* spp., *Mystus* spp., *Clupisoma* spp. balıklarında *Lb.plantarum*, *Pangasius* spp. balığında ise *Lb.casei* bakteri türüne rastlandığını tespit etmişlerdir.

4.2. Bakterilerin Moleküler Tanımlaması (PCR)

Balıkların deri ve iç organlarından izole edilen kolonilerin hangi tür bakteri oldukları moleküler olarak belirlenmiştir. Araştırmada moleküler olarak toplam 8 laktik asit bakteri üyesi tanımlanmıştır Çalışmada API testi ile ön tanımlanan 6 türden *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris ve Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* moleküler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca API testi ile ön tanımlanamayan 5 izolattan ise *Lactobacillus brevis, Pediococcus acidilactici, Enterococcus gallinarum* ve *Streptococcus spp.* olmak üzere 4 tür tanımlanmıştır. Sahnouni ve ark. (2012), sağlıklı balığın mide bağırsak bölgesinin normal florasını *Streptococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* ve *Carnobacterium* gibi laktik asit bakterilerinin oluşturduğunu belirtmişlerdir. Suşların jel konumları Şekil 4.1'e listelenmiştir. Şekil 4.1 de göre, balık örneklerinde izole edilen mikroorgazimaların 1 ve 5 numaralar arasındaki 700 ve 800 baz çifti *Enterococcus gallinarum*'u, 6 numaralı bant *Lactobacillus brevis*'i, 7 numaralı bant ise *Lb. plantarum* türleri göstermektedir. Aynı şekilde Şekil 4. 2' deki izolatlardan 1 nolu bant 700 ve 800 baz çifti arasında görülen Streptococcus spp.'yi, 2 nolu bant 500 ve 600 baz çifti arasında *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*' i, 3 nolu bant 800 baz çiftinde görülen *Pediococcus acidolactici'* i , 4 nolu bant 600-700 baz çifti arasında görülen *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis*' i 5, nolu bant 800 baz çiftinde görülen L*actobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*' i göstermektedir.

Üst sırada bant veren 1-3-5 numaralı örnekler 356F-1064R ile alt sıradaki 2-4-6-7-8 ile kodlu olan bantlar ise 27F-519R ile çalışılmıştır.

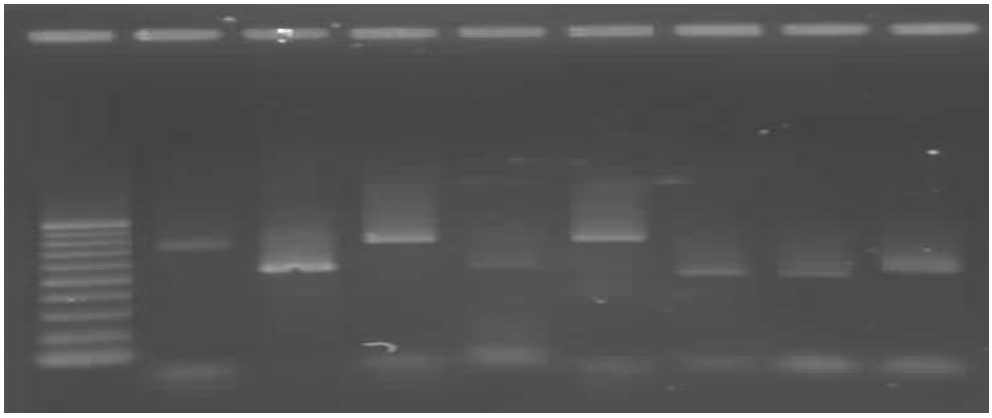
M 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.1. Balık etinden izole edilen kolonilerin PCR'nin agaroz jel görüntüsü

M: Markır 100 bç, 1; *Enterococcus gallinarum*, 2; *Enterococcus gallinarum*, 3; -, 4; -, 5; *Enterococcus gallinarum*, 6; *Lactobacillus brevis*, 7; *Lactobacillus plantarum*, 8; *Bacillus thrungiensis*

M 1 2 3 4 5 6 7 8



Şekil 4.2. Balık etinden izole edilen kolonilerin PCR'nin agaroz jel görüntüsü

M: Marker; 100 Bç, 1; *Streptococcus spp*., 2; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, 3; *Pediococcus acidolactici*, 4; *Lactobacillus lactis* subsp. *Lactis*,

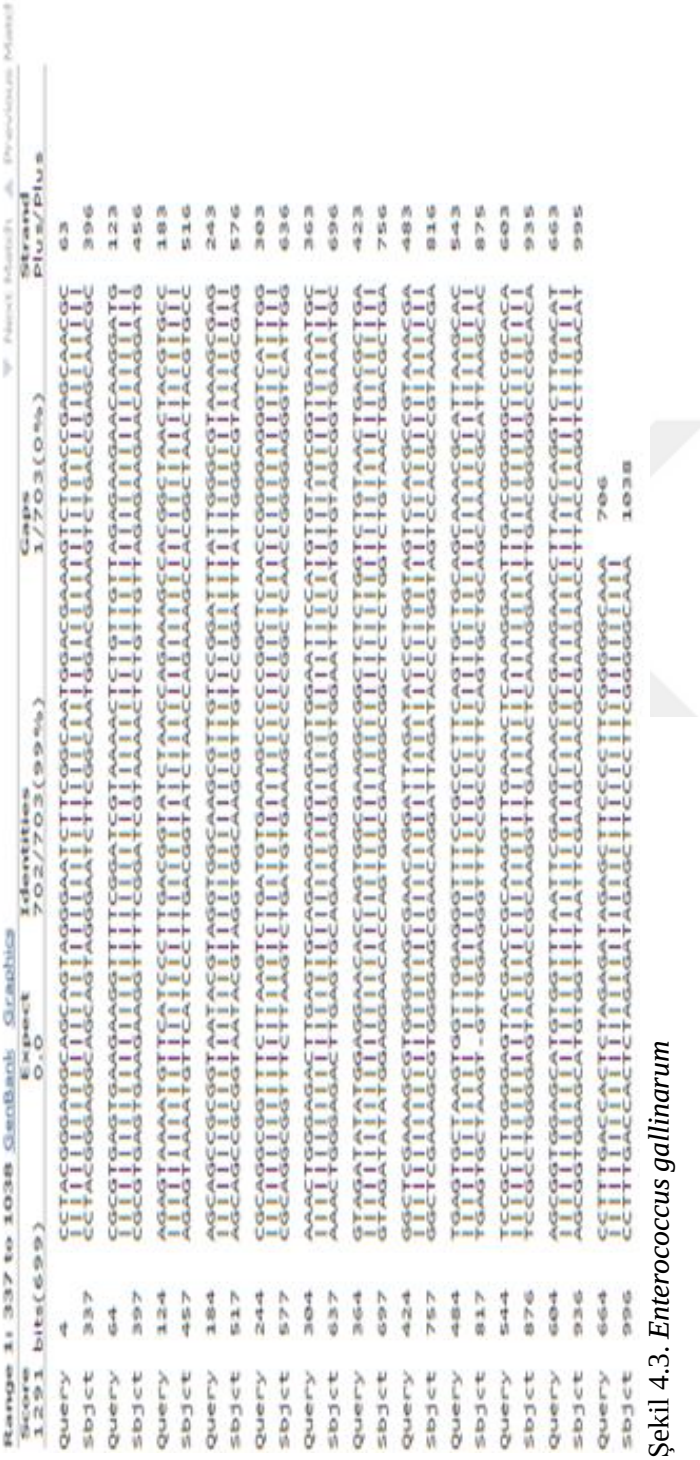
5; L*actobacillus delbrueckii* subsp. *lactis,* 6; *Clostridium* sp., 7; *Clostridium bifermentum,* 8; *Bacillus sp.*

4.3. Laktik Asit Bakterilerine Özgü DNA Dizileri Nükleotid Dizi Belirleme

Çalışmada tanımlanan laktik asit bakterilerine özgü DNA dizileri listelenmiştir.

Çizelge 4.3. *Enterococcus gallinarum* sekans dizilimi

1	acacctacgg gaggcagcag tagggaatct tcggcaatgg acgaaagtct gaccgagcaa
61	cgccgcgtga gtgaagaagg ttttcggatc gtaaaactct gttgttagag aagaacaagg
121	atgagagtaa aatgttcatc ccttgacggt atctaaccag aaagccacgg ctaactacgt
181	gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggatttattg ggcgtaaagc
241	gagcgcaggc ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccccg gctcaaccgg ggagggtcat
301	tggaaactgg gagacttgag tgcagaagag gagagtggaa ttccatgtgt agcggtgaaa
361	tgcgtagata tatggaggaa caccagtggc gaaggcggct ctctggtctg taactgacgc
421	tgaggctcga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa
481	cgatgagtgc taagtggttg gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcaa acgcattaag
541	cactccgcct ggggagtacg accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc
601	acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga
661	catcctttga ccactctaga gatagagctt ccccttcggg ggcaaa



Şekil 4.3. *Enterococcus gallinarum*

Çizelge 4.4. *Lactobacillus brevis* sekans dizilimi

1	acactacggg aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaat
61	gccgcgtgag tgaagaaggg tttcggctcg taaaactctg ttgttaaaga agaacacctt
121	tgagagtaac tgttcaaggg ttgacggtat ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc
181	cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga
241	gcgcaggcgg ttttttaagt ctgatgtgaa agccttcggc ttagccggag aagtgcgtcg
301	gaaactgggg gactcgagtg cagaagagga cagtggaact ccctgtgtcg cgggggagtg
361	cggttataaa agaaatagac cccctgcagc gatgggcggg ggattccgca gacctcgtcg
421	aggctcaagt ccgccagttt cagaaaccat tatactattt caccgtaggc cttcccatca
481	aaaataaaga acgcgctggt gctggattgc accccaataa ggcgtggaga agcttgcgta
541	cctacgtatt gggggggggg gcgtgccggg tgtaatgctc cggatttttg gtttcgaccc
601	gctccccccc tgaacagtgt gctgtctttt tgtttcttcc gttaccaaca accatttttc
661	tgaagctggg gcctcttctt cccctctgtc ttgaaattgt tcctcctccc ccgtcttgca
721	ga

Şekil 4.4. *Lactobacillus brevis*

Çizelge 4.5. *Lactobacillus plantarum* sekans dizilimi

1	actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa
61	cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc gtaaaactct gttgttaaag aagaacatat
121	ctgagagtaa ctgttcaggt attgacggta tttaaccaga aagccacggc taactacgtg
181	ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa gcgttgtccg gatttattgg gcgtaaagcg
241	agcgcaggcg gtttttaag tctgatgtga aagccttcgg ctcaaccgaa gaagtgcatc
301	ggaaactggg aaacttgagt gcagaagagg acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat
361	gcgtagatat atggaagaac accagtggcg aaggcggctg tctggtctgt aactgacgct
421	gaggctcgaa agtatgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca taccgtaaac
481	gatgaatgct aagtgttgga gggtttccgc ccttcagtgc tgcagctaac gcattaagca
541	ttccgcctgg ggagtacggc cgcaaggctg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac
601	aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag ctacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca
661	tactatgcaa atctaagaga ttagacgttc ccttcggg



Şekil 4.5. . *Lactobacillus plantarum*

Çizelge 4.6. *Streptococcus* spp. sekans dizilimi

1	agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc
61	ggacagaaga ggagcttgct ccttggaagt cagcggcgga cgggtgagta acacgtgggc
121	aacctgcctt gtagcggggg ataactattg gaaacgatag ctaataccgc ataacaatgg
181	atgacacatg tcatttattt gaaaggggca attgctccac tacaagatgg acctgcgttg
241	tattagctag taggtgaggt aatggctcac ctaggcgacg atacatagcc gacctgagag
301	ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg
361	gaatcttcgg caatgggggc aaccttgacc gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggcttt
421	cggatcgtaa agctctgttg taagtcaaga acgggtgtga gagtggaaag ttcacactgt
481	gacggtagct taccagaaag ggacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacatct
541	ttctagaaga tctcctacaa tattctcagc tgccatgaaa caattgtggt tttggggtag
601	aaa

Şekil 4.6. *Streptococcus* spp.

Çizelge 4.7. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sekans dizilimi

1 ccccggctcc acctcatacc gcgggctggc tccaaaggtt acctcaccga cttcgggtgt
61 tacaaactct cgtggtgtga cgggcggtgt gtacaaggcc cgggaacgta ttcaccgcgg

Şekil 4.7. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

4.4. Fermantasyon Yetenekleri

Bakteri izolatlarının fermantasyon yetenekleri ile ilgili bilgiler Çizelge 4.8'de verilmiştir. Fermentasyon testi için hazırlanan örneklerin başlangıç pH değeri ortalama 6.39 olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda örneklerin pH'sında hızlı düşüşler gözlenmiş olup, en hızlı düşüş 4.85 ile *Ent. gallinarum*'da gözlemlenirken, en yüksek pH ise *Lb. plantarum*'da belirlenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonunda *Lb. plantarum* haricindeki tüm bakteri izolatlarının pH'ı 4.5'in altına indirdiği belirlenirken, 48 saatlik inkübasyon sonucunda *Ent. gallinarum ve Streptococcus* spp. fermantasyonda en düşük pH'ya yol açan bakteri üyeleri olmuştur. İzole edilen bu bakterilerden *Streptococcus* spp., *Lb. brevis, Lb. plantarum, Pd. acidolactici* ve *Ent. gallinarum* türlerinin 72 saat sonunda pH'ı 4'ün altına indirdikleri tespit edilmiştir. 96 saatlik inkübasyon sonunda *Streptococcus spp., Lb. plantarum, Lb. brevis* ve *Ent. gallinarum*' un pH' yı düşürmede en yetenekli bakteriler olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.8. Balıktan İzole Edilen LAB fermantasyon yetenekleri

	pH				
	0. gün	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
Enterococcus gallinarum	6.39	4.85	4.15	3.96	3.87
Streptococcus spp		5.11	4.21	3.98	3.83
Lactobacillus lactis subsp. *lactis*		5.13	4.47	4.19	4.1
Lactobacillus brevis		5.37	4.25	3.97	3.87
Lactobacillus plantarum		5.72	4.57	3.98	3.86
Pediococcus acidilactici		5.39	4.23	3.96	3.94
Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*		5.21	4.3	4.04	3.97
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*		5.22	4.37	4.16	3.97

Nair ve Surendran (2004), taze dondurulmuş balık ve karideslerden *Lb. plantarum* (138 izolat), *Lb. brevis* (66), *Lb. divergens* (28), *Lb. gasseri* (24), *Lb. rhamnosus* (21), *Lb. fermentum* (20), *Lb. viridescens* (10), *Lb. farciminis* (7), *Lb. buchneri* (7), *Lb. acidophilus* (5), *Lb. alimentarius* (4), *Lb. animalis* (4) *ve Lb. reuteri* (3) izole etmişlerdir.

Gongora ve ark (2012) 16 LAB suşunun *Merluccius hubbsi* atıkları üzerindeki fermentasyon yeteneklerini araştırdığı çalışmada sadece 3 *Lactobacillus* (*Lb. buchneri, Lb. plantarum* ve *Lb. Arizonensis*) türünün karbon kaynağı olarak glukoz ve sükrozu kullandığında pH'yı 4 ve altına düşürebildiğini tespit etmişlerdir. Faid ve ark. (1997) sardalya atıkları, iç organlar, kuyruk, baş ve %25 melas karışımına *Saccharomyces* türleri ve *Lactobacillus plantarum* starter kültürlerini ekledikleri çalışmada 15 günlük fermentasyon işlemi sonunda pH'ın 4.2 ve 4.5'da sabit kaldığını rapor etmişlerdir.

Hammoumi ve ark. (1998), sardalya atıklarına % 15 melas ve *Lactobacillus plantarum* starter kültür ilave edilerek hazırladıkları silajların günlük fermentasyonu süresince pH'ın önemli bir şekilde azaldığını ve 4.2 ve 4.5 değerlerinde sabit kaldığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde, bu araştırmada da bölgemizde bulunan bazı balıklarda doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinden izolasyonla elde edilen *Ent. gallinarum, Streptococcus* spp, *Lb. lactis* subsp. *lactis, Lb. brevis, Lb. plantarum, Pedi. acidilactici, Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris ve Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* türlerinin asitlendirme yeteneklerinin güçlü olduğu ve güvenli balık silajı üretimi için uygun starter kültürleri olabileceği ortaya konmuştur. Bununla birlikte, bu araştırma yapılan literatür incelemelerine göre fermente ürünlerin üretiminde *Enterococcus gallinarum* türünün kullanılabilirliği ile ilgili olan ilk çalışmadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 2 farklı tatlı su balığı (sazan ve yayın) ve 3 farklı deniz balığı (çipura, levrek ve kefal) türünün kas, deri ve iç organlarından mevcut LAB üyelerinin moleküler olarak (PCR) tespiti yapılarak, silaj üretimi için fermentasyon yetenekleri incelenmiştir. Araştırma sonucunda elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

Araştırmada moleküler olarak toplam 8 laktik asit bakteri üyesi tanımlanmıştır Çalışmada API testi ile ön tanımlanan 6 türden *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris ve Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* moleküler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca API testi ile ön tanımlanamayan 5 izolattan ise *Lactobacillus brevis, Pediococcus acidilactici, Enterococcus gallinarum ve Streptococcus spp.* olmak üzere 4 tür tanımlanmıştır.

İzole edilen ve tanımlanan bu bakterilerden *Streptococcus* spp., *Lb. brevis, Lb. plantarum, Pd. acidophilus* ve *Ent. gallinarum* türlerinin 72 saat sonunda pH'ı 4'ün altına indirdikleri tespit edilmiştir.

Bu durum sonuç olarak balığın doğal florasında bulunabilen bu bakterilerin başta balık silajı olmak üzere birçok fermente ürüne starter kültür olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışmada tanımlanan türlerden *Ent. gallinarum'* un fermentasyon yeteneğinin belirlenmiş olduğu ilk araştırma olması yönünden de literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Araştırma tüm bu yönleriyle balık silajı üretiminde bazı balıklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin fermantasyon yeteneklerinin belirlenmesi yönünden ileride bu konu ile ilgili yapılacak olan çalışmalara referans oluşturabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Adıgüzel, A., İnan, K., Şahin, F., Arasoğlu, T., Güllüce M., Beldüz, A.O., Barış, Ö., 2011. Pasinler kaplıcasından izole edilen termofilik bakterilerin moleküler farklılıkları. *Turk. J. Biol.*, 35: 267-274.

Al-Harbi, A.H., Uddin, N., 2003. Quantitative and qualitative studies on bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*, *O. aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. Aquac Res, 34 : 43–48.

Ali, H.H., 2014. Isolation and Identification of *Staphylococcus* Bacteria From Fish of Fresh Water and Its Antibiotics Sensitivity In Mosul City, Bas.J.Vet.Res.1(1); 33-42.

Arda, M., 1995. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara.

Aydın Osmanağaoğlu, Ö., Kıran, F., Oral, B., 2010. Laktik asit bakterilerinin 16S rDNA sekans analizi ile tanımlanması, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Balcazar, J.L., Vendell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L., Girınes, O., 2008. Characterization Of probiotic Properties Of Lactic Acid Bacteria İsolated From İntestinal Microbiota Of Fish. Aquaculture Research, 2008. 278(1): 188-191.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J.W., Verreth, J., Rombouts, F.M., 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiol, 23 : 476– 482.

Bulut, Ş., 2001. *Rhızopus Oryzae*'den Laktik Asit Üretimi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Elazığ. S.106.

Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., Benno, Y., 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. J. Gen. Appl. Microbiol, 45 : 177–184.

Chelule, P.K., Mbongwa, H.P., Carries, S., Gqaleni, N., 2010. Lactic Acid Fermantation Improves the Quality of Amahewu a Traditional South African Maize-Based Porridge. Food Chem., 122: 656-661.

Çon, A.H., Gökhalp, H.Y., 2000. Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal metabolitleri ve etki şekilleri. Turk Mikrobiyoloji ve Cemiyeti Dergisi, 30: 180-190.

Desniar, C., Rusmana, I., Suwanto, A., Mubarik, N.R., 2013. Characterization of lactic acid bacteria isolated from and Indonesian fermented fish (bekasam) and their antimicrobial activity against patogenic bacteria. Emirates Journal of Fodd and Agriculture, 25 (6) : 489-494.

Dounan, G., Walker, J., 1989. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. J. Appl. Microbiol. 67: 229-230.

Durmaz, R., Otlu, B., Çalışkan, A., Gürsoy, N. 2007. *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde kullanılabilecek kısa süreli "Pulsed Field Gel" elektroforez (PFGE) protokolü. ANKEM Derg., 21 (2) : 113-117.

Faid, B., Zouıten, A., Elmarrakchi, A., Achkari-Begdouri, A., 1997. Biotransformation Of Fish Waste İnto a Stable Feed Ingredient. Food Chemistry., 60 : 13-18. Fao., 2003. Animal feed resources information system. http://*www.faso.org*.

Gatesoupe, F. J., 2008. Updating the İmportance of Lactin Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments. J. Mol. Microbiol Biotechnol, 14 : 107-114.

Gongora, H.G., Ledesma, P., Lo Valvo, V.R., Ruiz, A.E., 2012. Secreenin of lactic acid bacteria for fermentation of minced wastes of Argentinean hake (*Merluccius hubbsi*). Food and Bioproducts Processing, 90: 767-772.

Gonzalez, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez and Otero, A., 2000. Characterization and Identification of Lactic Acit Bacteria from Freshwater Fishes. Food Microbiology, 383-391.

Güley, Z., 2008. Doğal Üretilen Küflü Peynirden İzole Edilen Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Aflatoksin B1 ve Aflatoksin M1 Üzerine Etkisinin Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 259.

Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y., Hoshino, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture, 234 : 335–346.

Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*. In: Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (eds) The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria, 2.

Hammoumi, A., Faid, A.M.Y., Amarouch, H., 1998. Characterization of Fermented Fish Waste Used in Feeding Trials with Broilers. Process Biochemistry, 33 (4) : 423-427.

Holzapfel, W.H., Geısen, R., and Schillinger, U., 1995. Biological Preservation of Foods with Referance to Protective Cultures, Bacterocins and Food-Grade Enzymes. International J. Food Microbial, (24) :343-362.

Jini, R., Swapna, H.C., Amit, K.R., Vrinda, R., Halami, P.M., Sachindra, N.M., Bhaskar, N., 2011. Isolation and Characterizati Potential Lactic Acid Bacteria (LAB) from Freshwater Fish Processing Wastes for Application in Fermentative Utilisat of Fish Processing Waste. Braz J Microbiol, 42 : 1516-1525.

Jöborn, A., 1998. The Role of The Gastrointestinal Microbiota in The Prevention of bacterial Infections in Fish. Phd Disserration. Göthenburg University, Sweden, pp 153.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology 41; 103– 125.

Koluman, A., 2010. Piliç Kümesleri ve kesimhanelerinde *Campylobacter jejuni* kontaminasyonu belirlenmesi. Türk Hijyen Den. Biyo. Derg., 67 (2) : 57-64.

Kumar, Y., Kumar, Singh, A., Kumar, Mishra, S., 2013. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Species from Fish İntestine For Probiotic Properties. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 4 (1): 11-21.

Leisner, J.J., G. Rusul, B.W. Wee, H.C. Boo and K. Mohammad, 1997. Microbiology of chilibo, a popular Malaysian food ingredient. J. Food Protect., 60: 1235-1240.

Mccartney, A.L., 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. British Journal of Nutrition, 88: 29 -37.

Nair, P.S., Surendran, P. K., 2004. Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria İsolated from Fish and Prawn. Journal of Culture Collections, 4 : 48-52.

Oktay, H.I., Heperkan, D. 2010. *Aspergillus* izolatlarının PZR ile tanısı, bazı mikotoksinlerin in vitro tayini, sıcaklık ve sürenin incirde aflatoksin ve siklopiazonik asit oluşumuna etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

Rahmi, M., Faid, M., Elyachioui, M., Berny,E.H., Fakir, M., Ouhssine M., 2008. Protein Rich Ingredients from Fish Waste for Sheep Feeding. African Journal of Microbiology Research, 2 : 073-077.

Ringo E, 2004. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects; in Salminen S, Ouwehand A, von Wright A (eds): Lactic Acid Bacteria. New York, Marcel Dekker, pp 581–610.

Ringo, E., and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic Acid Bacteria in Fish. Aguaculture 160 : 177-203.

Ringo, E., Bendiksen, H.R., Wesmajervi, M.S., Olsen, R.E., Jansen, P.A., Mikkelsen, H., 2000. Lactic Acit Bacteri Associated with the Digestive Tract of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.). Journal Of Applied Microbiology, 89 (2) : 317-322.

Ringo, E., Olsen, R.E., 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). J. Appl. Microbiol, 86:22–28.

Sahnouni, F., Matallah-Boutiba, A., Chemlal, D., Boutiba, Z., 2012. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast. African Journal of Microbiology Research, 6 (13) : 3125-3133.

Saiki, K.R., Gelfand, H.D., Stoffi, S., Scharf, J.S., Higuchi, R., Horn, T.G., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polimerase. *Science*, 239: 487-491.

Salle, A. J., 1954. Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology 4th ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 169–173

Schochetman, G., Jones, K.W., 1988. Polimerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.*, 158: 1154-1157.

Seppola, M., Olsen, R.E., Sandaker, E., Kanapathippillai, P., Holzapfel, W., Ringø, E., 2006. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*). Syst. Appl. Microbiol, 29 : 131–137.

Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen J., Nielsen, T., Appel, K.F., Gram, L., 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. Aquaculture, 182 : 1–15.

Temiz, A. 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yay, Ankara.

Us, E., Erdem, B., Tekelli, A., Gerçeker, D., Saran, B., Bayramova, M., Şahin, F. *Salmonella* serotip Enteridis izolatlarının plazmid profil analizi ve "Pulsed Field" jel elektroforezi ile incelenmesi. *Mikrobiyol. Bül.*, 45(2): 210-227.

Vazquez, J.A., Rodrigues A.C., Fucines, P., Pastrana, L., Murado, M.A., 2010. Bio-silage of Mussel Work-processing Wastes by Lactobacilli on Semi-solid Culture. Journal of Food Engineering. 97 (3) : 355-359.

Walker, J., Dounan, G. 1989. DNA Probes: A new role in diagnostic microbiology. *J. Appl. Microbiol.*, 67: 229-230.

Yerlikaya, O. ve Kesenkaş, H. 2009. Laktik asit bakterilerinin ve fermente süt ürünlerinin antimikrobiyal özellikleri. Hasad Gıda, 25(290): 30-35.

Yerlikaya, O., 2014. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanmasında Kullanılan Başlıca Fenotipik ve Moleküler Yöntemler. Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology 14:8-22.

Yuliana, N., Koesoemawardani, D., Susilawaty, Kurniati, Y., 2018. Lactic Acid Bacteria During Fish Fermentation (Rusip). MOJ Food Process Technol., 6 (2): 201-2016.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimimi Ankara'da tamamladı. 2007 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi'nden 2011 yılında mezun oldu. 2013 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.