

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss*,
WALBAUM 1792) 'NDA *Vagococcus salmoninarum*' A KARŞI
in vitro ANTAGONİSTİK ETKİ GÖSTEREN POTANSİYEL
PROBİYOTİK BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI**

Hatice SAYI

**Danışman
Doç. Dr. Behire Işıl DİDİNEN**

**II. Danışman
Doç. Dr. Ertan Emek ONUK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016**



© 2016 [Hatice SAYI]

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Hatice SAYI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Vagokokkozis	4
2.1.1. <i>V. salmoninarum</i> 'un izolasyon ve identifikasyonu	4
2.1.1.1. Fenotipik identifikasyon	5
2.1.1.2. Genotipik identifikasyon	8
2.1.2. Epizootiyoloji	8
2.1.3. Hastalığın klinik belirtileri ve patolojisi	8
2.1.4. Tedavi çalışmaları	14
2.2. Laktik Asit Bakterileri	14
2.2.1. Laktik asit bakterilerinin balık gastrointestinal faunasındaki varlığı	15
2.2.2. Laktik asit bakterilerinin balıklarda probiyotik olarak kullanılmasının nedenleri	16
2.2.3. Laktik asit bakterilerinin balık patojenlerine karşı kullanımına ilişkin çalışmalar	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Potansiyel probiyotik bakterilerin izolasyonu	21
3.2.2. <i>V. salmoninarum</i> 'a karşı <i>in vitro</i> antagonistik etkinin belirlenmesi	22
3.2.3. Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitileri	23
3.2.4. Aday probiyotik bakterilerin safra ve pH toleranslarının belirlenmesi	24
3.2.5. Aday probiyotik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları	24
3.2.6. Aday probiyotik bakterilerin fenotipik karakterizasyonları	25
3.2.7. Aday probiyotik bakterilerin moleküler analizi	26
3.2.7.1. İzolatların PCR amplifikasyonu ve 16S rRNA sekans analizi	26
3.2.7.1.1. <i>L. garvieae</i> spesifik PCR	26
3.2.7.1.2. 16S rRNA sekans analizi	26

3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	28
4.1. <i>V. salmoninarum</i> 'a Karşı İnhibitör Aktivite Gösteren Bakteriler	28
4.2. Aday Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonları	28
4.3. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler Analizi	29
4.4. Laktik Asit Bakteri Suşlarının Hidrofobisite, pH Ve Safra Toleransları Ve	31
Antibiyotik Duyarlılıkları	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	42



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda *Vagococcus salmoninarum*'a Karşı *in vitro* Antagonistik Etki Gösteren Potansiyel Probiyotik Bakterilerinin Araştırılması

Hatice SAYI

Süleyman Demir el Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Behire Işıl DİDİNEN

II. Danışman: Doç.Dr. Ertan Emek ONUK

Bu çalışmada daha önce Akdeniz Bölgesindeki bir alabalık işletmesinde ortaya çıkan vagokokkozis salgını esnasında izole edilen *Vagococcus salmoninarum* izolatına karşı endojen gökkuşığı alabalığı mikrobiyotasının probiyotik özellikleri değerlendirildi. Bu amaçla sağlıklı 20 adet gökkuşığı alabalığının (ort 250g) bağırsaklarından aday probiyotik bakterilerinin izolasyonu yapıldı. İzole edilen 157 adet bakterinin Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanılarak *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik aktiviteleri araştırıldı. Antagonistik suşların fenotipik identifikasyonlarını takiben, PCR ve 16S rRNA bölgesi dizi analizi ile bakteri türlerinin genotipik identifikasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak, TUB/2013/V47 (*L. garvieae*), TUB/2013/V27 (*L.garvieae*), TUB/2013/V10 (*L. garvieae*), TUB/2013/V2 (*L.garvieae*), TUB/2013/V1 (*L. lactis*), ve TUB/2013/V4 (*L. lactis*) olmak üzere 6 antagonistik suş tanımlandı. Bu, suşların *in vitro* probiyotik özelliklere (hidrofobik, safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına dirençli olma) sahip oldukları belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Akuakültür, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Oncorhynchus mykiss*, Probiyotik, *Vagococcus salmoninarum*

2016, 53 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation Of Potential Probiotic Bacteria With *in vitro* Antagonistic Effect Against *Vagococcus Salmoninarum* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Hatice SAYI

**Suleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Aquaculture Department**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ertan Emek ONUK

In this study, probiotic properties of endogenous rainbow trout microbiota against *V. salmoninarum* isolated during an outbreak of vagococcosis in a trout farm in the Mediterranean region were evaluated. For this purpose, candidate probiotic bacteria were isolated from rainbow trout (n=20, weight of 250g) intestines. A total of 157 bacteria were screened for antagonistic activity against *V. salmoninarum* by using the Well Diffusion Agar method. After the phenotypic identification of antagonistic strains, confirmation of bacterial species was made by 16S rRNA gene sequence analysis of the strains. As a result, four antagonistic strains were identified including TUB/2013/V47 (*L. garvieae*), TUB/2013/V27 (*L. garvieae*), TUB/2013/V10 (*L. garvieae*), TUB/2013/V2 (*L. garvieae*) TUB/2013/V1 (*L. lactis*) and TUB/2013/V4 (*L. lactis*). As a result, it was found that strains have in vitro probiotic properties (hydrophobic, tolerant to bile salts and low pH conditions).

Keywords: Aquaculture, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Oncorhynchus mykiss*, Probiotic, *Vagococcus salmoninarum*

2016, 53 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocalarım Doç.Dr. Behire Işıl DİDİNEN ve Doç.Dr. Ertan Emek ONUK’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Özge ÇAYLI’ya teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan, desteklerini sürekli yanımda hissettiğim aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Hatice SAYI

ISPARTA, 2016



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

LAB	Laktik Asit Bakterileri
mm	Milimetre
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında karın karın yüzgecinde kanama ve anüste kızarıklık.....	9
Şekil 2.2.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında vücut yüzeyinde frunkul oluşumu	10
Şekil 2.3.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında vücut yüzeyinde ülser	10
Şekil 2.4.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında atrium ve ventrikülde pseudomembran	11
Şekil 2.5.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında dalakta pseudomembran	11
Şekil 2.6.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında karaciğerde anemi ve kalpte pseudomembran	12
Şekil 2.7.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında bağırsak lümeninde jelatinöz eksudat.....	12
Şekil 2.8.	<i>V. salmoninarum</i> 'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında iç organlarda hiperemi.....	13
Şekil 2.9.	Balık mide ve/veya bağırsaklarında bulunan laktik asit bakterileri.....	16
Şekil 3.1.	Probiyotik bakterilerin TSA'ya ekimi.....	21
Şekil 3.2.	TSB'de 48 saatlik potansiyel probiyotik bakteri kültürleri	23
Şekil 3.3.	Kongo kırmızısı ilave edilmiş TSA agarda hidrofobisite test sonucu	23
Şekil 3.4.	Probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları.....	25
Şekil 3.5.	Potansiyel probiyotik bakterilerin antibiyotik inhibisyon zon çaplarının ölçümü.....	25
Şekil 4.1.	<i>L. garvieae</i> spesifik PCR (1100 bp)	30
Şekil 4.2.	16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri.	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Türkiyede izole edilen <i>V. salmoninarum</i> suşunun fenotipik karakterizasyonu ve diğer suşlarla karşılaştırılması	5
Çizelge 4.1. <i>V. salmoninarum</i> 'a karşı inhibitör aktivite gösteren bakteriyel izolatlar	28
Çizelge 4.2. <i>V. salmoninarum</i> 'a karşı inhibitör aktivite gösteren izolatların geleneksel metotlarla ve API20 STREP ile belirlenen fenotipik özellikleri.....	28
Çizelge 4.3. 22 °C'de 1.5 saat için farklı pH şartlarında aday probiyotik suşlarının toleransı	31
Çizelge 4.4. 22 °C'de 1.5 saat için farklı safra konsantrasyonlarına aday probiyotik suşlarının toleransı	31
Çizelge 4.5. Aday probiyotik bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları	32

1. GİRİŞ

Etiyolojik olarak, 'streptokokozis' Gram pozitif kokların farklı cins ve türlerini içeren pek çok etkenin neden olduğu hastalıklar için kullanılmaktadır. Klinik olarak bu enfeksiyonlar iki gruba ayrılmaktadır: 15°C'nin üzerindeki sularda hem tatlı su hem de deniz balıkları için patojen olan kokların neden olduğu ılık su enfeksiyonları ve 12°C'nin altındaki su sıcaklıklarında yetiştirilen yalnızca salmonid balıklar için patojen olan kokların neden olduğu soğuk su enfeksiyonlarıdır (Ruiz-Zarzuela vd., 2005). *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *S. parauberis*'in neden olduğu ılık su enfeksiyonları kültürü yapılan tatlı su ve deniz balıkları için patojenik olan ve 15 °C üzerindeki su sıcaklıklarında görülen enfeksiyonlardır. Soğuk su enfeksiyonları, 12 °C altındaki su sıcaklıklarında sadece salmonid balıklar için patojeniktir. Soğuk su streptokoklarından olan *V. salmoninarum*, salmonidler için ciddi tehditler oluşturan kronik enfeksiyonlardan sorumlu Gram pozitif bakteriler listesinde yer almaktadır (Michel vd.,1997).

V. salmoninarum'un meydana getirdiği vagokokkozis, Avrupa alabalık endüstrisinde ergin olmayan ya da yetişkin alabalıklarda % 20–50 arası mortalite ile seyreden önemli bir bakteriyel hastalıktır. Salgınlar genelde su sıcaklığı 10–12°C olduğunda ve yumurtlama stresi sonucunda meydana gelmektedir (Michel vd., 1997; Ghittino vd., 2004; Ruiz-Zarzuela vd., 2005; Austin ve Austin, 2007). Hastalık ülkemizde 2011 yılında Akdeniz Bölgesi'nde bulunan bir işletmede gökkuşağı alabalıklarında sağım sonrası stres sonucu görülmüş olup, ölüm oranı % 50 olarak seyretmiştir (Didinen vd., 2011). Daha sonra hastalık balık nakilleriyle çiftlikler arasında yayılmıştır. Ülkemizde halen bir çok çiftlikte görülmekte ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Tanrikulu vd., 2014; Özcan vd., 2014).

Akuakültürde *V. salmoninarum* salgınlarının önlenmesi için kullanılabilecek aşı mevcut değildir. Aşı çalışmaları yapılmış olmakla birlikte, başarılı sonuçlar elde edilememiştir (Michael vd., 1997; Ruiz-Zarzuela vd., 2005). Ayrıca, *V. salmoninarum* *in vitro* olarak çeşitli antibiyotiklere (ampisilin, amoksisillin, eritromisin, oksitetrasiklin ve doksisiklin) karşı duyarlı bulunmasına rağmen, sahada tedavi sürecinde başarısız olduğu bildirilmektedir (Michael vd., 1997; Ruiz-Zarzuela vd., 2005; Didinen vd., 2011). Bu nedenle alabalık yetiştiriciliğinde

V. salmoninarum'a karşı etkin koruma yöntemlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Son yıllarda patojenik mikroorganizmaları önlemek ve balık hastalıklarının görülme sıklığını azaltmak için yararlı mikroorganizmaların kullanımı yoluyla probiyotik uygulamaları giderek artan bir ilgi görmektedir (Irianto ve Austin 2002; Balcazar vd., 2006; Kesarcodi-Watson vd., 2008). Akuakültürde biyolojik kontrol maddeleri olarak önerilen ve en fazla probiyotik özellik gösteren laktik asit bakterileri (LAB); *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. ya da *Lactobacillus* spp. dir (Merrifield vd., 2010). Laktik asit bakterileri karasal hayvanların beslenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır ve sucul türler için de kullanımları tavsiye edilmektedir (Ringo ve Gatesoupe, 1998). Bu bakteriler virülens göstermemeleri, antimikrobiyal madde üretmeleri yolu ile zararlı bakterilerle rekabet yetenekleri, sindirim boşluğuna kolonize olma kapasiteleri ve tutunma bölgeleri için patojenlerle rekabet özellikleri nedeniyle akuakültürde probiyotik olarak kullanılmaktadır (Farzanfar, 2006; Mota vd., 2006).

Probiyotiklerin seçimindeki en yaygın yol, *in vitro* antagonizm testidir. Bu testte patojenler, aday probiyotiklere ya da onların sıvı ya da katı ortamdaki hücre dışı ürünlerine maruz bırakılmaktadır. Etkili bir probiyotik olması için yeni bir mikroorganizma seçerken, birçok özellik göz önüne alınmalıdır. Potansiyel probiyotiklerin gastrointestinal sistemde kolonizasyonu için pH ve safra toleransları yüksek, aynı zamanda bağırsak yüzeylerine adezyon yeteneği olmalıdır (Joborn vd., 1997; Nikoskelainen vd., 2001; Balcazar vd., 2008). Probiyotiklerin antibiyotik direncinin ortaya çıkması ile ilgili ciddi kaygılar oluşabileceğinden, probiyotik suşlar da dikkatle antimikrobiyal duyarlılık yönünden taranmalıdır (Vizoso-Pinto vd., 2006).

Bağırsak epitel hücrelerine tutunma yeteneği potansiyel probiyotik suşların en önemli özelliklerinden bir tanesidir. İntestinal epitel hücrelerindeki LAB suşları karakterize edilmiş ve yüksek hidrofobik suşların güçlü tutunma özelliği gösterdiği saptanmıştır (Pan vd., 2006). Probiyotik suşların balıkların bağırsağında üremesi ve hayatta kalması için safra toleransı göstermesi de önemli bir özelliktir (Nikoskelainen vd., 2001; Chabrilion vd., 2006; Fjellheim vd., 2010; Lazado vd.,

2010). Hidrofobik özellikleri ve safra toleransları yüksek olan potansiyel probiyotik suşların gastrointestinal geçişi ve bağırsak yüzeyinde koloni oluşturma ihtimalleri daha fazladır (Nikoskelainen vd., 2001; Zhou vd., 2007).

Bu tez çalışmasında, gökkuşağı alabalıklarının bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin *in vitro* şartlar altında, *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etkileri belirlenmiştir. Antagonistik suşlarının tür teşhisleri yapıldıktan sonra, balığın mide bağırsak kanalında hayatta kalabilme yetenekleri (bağırsak epitel hücrelerine tutunma özellikleri (hidrofobisite) ile safra tuzları ve düşük pH şartlarına tolerans) ve antimikrobiyal duyarlılıkları araştırılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Vagokokkozis

V. salmoninarum'un taksonomisi (Wallbanks vd., 1990; Anonim, 2014) aşağıdaki gibidir.

Kingdom: Bacteria

Phylum: Firmicutes

Class: Bacilli

Order: Lactobacillales

Family: Enterococcaceae

Genus: *Vagococcus*

Species: *Vagococcus salmoninarum*

V. salmoninarum, gökkuşağı alabalıklarının tüm dokularından düzenli olarak izole edilebilir. Genellikle 48 saat sonra, kanlı agarda tripticase soy agara (TSA) göre daha iyi gelişir ve bu besiyerinde küçük beyaz düzenli 0,5-1 mm çapında koloniler şekillenir. Enfekte dokulardan yapılan yayma preparatlarda kokkoit–ovoid şekilli Gram pozitif bakteriler diplokok olarak görülür. Fakat sıvı besiyerinde üretildiklerinde zincirlerin uzunluğu değişebilir. Kanlı Columbia agar'da 2-3 gün sonra sınırlı miktarda alfa hemoliz yapar. Bu fakültatif anaerobik bakteri hareketsiz, sporsuz, oksidaz ve katalaz üretmeyen, LAB'lar ile ilişkili ve hatta streptokok ve enterekoklarla daha yakın olan bir bakteridir (Michel vd., 1997).

2.1.1. *V. salmoninarum*'un izolasyon ve identifikasyonu

Bakterinin izolasyonunda etkilenen dokulardan TSA'ya ekim yapılarak 22 °C' de 24-48 saat inkubasyon sonrası koloniler gözlemlenir. Bakterinin fenotipik karakterizasyonunda klasik mikrobiyolojik metotlar ile API STREP ve API 50 CH sistemleri gibi minyatürize sistemler kullanılır (Didinen vd., 2011).

2.1.1.1. Fenotipik identifikasyon

V. salmoninarum'a ait fenotipik özellikler Çizelge 2.1'de verilmiştir (Michel vd., 1997; Ruiz-Zarzuela vd., 2005; Didinen vd., 2011).

Çizelge 2.1. Türkiyede izole edilen *V. salmoninarum* suşunun fenotipik karakterizasyonu ve diğer suşlarla karşılaştırılması

	<i>V. salmoninarum</i> (Didinen vd., 2011)	<i>V. salmoninarum</i> NCIMB 13133	<i>V. salmoninarum</i> (Michel vd., 1997)	<i>V. salmoninarum</i> (Ruiz-Zarzuela vd., 2005)
Koloni çapı	<1 mm	<1 mm	0.5–1 mm	<1 mm
Gram Boyama	+	+	+	+
Şekil	kb	kb	kb	kb
Hareketlilik	-	-	-	-
Hemoliz	α	α	α	α
Oksidaz	-	-	-	-
Katalaz	-	-	-	d (0/2/8)
O/F	F	F	F	F
Üre	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-
NO ₃ indirgeme	-	-	-	-
Eskulin hidrolizi	+	+	+	+
TSI agardan H ₂ S üretimi	-	-	+	d (2/0/8)
Gelişim:				
10°C	+	+	NA	+
20°C	+	+	NA	+
37°C	+	+	+	-
42°C	-	-	-	-
pH 9.6	+	+	+	+
6.5% NaCl	-	-	-	-
MacConkey agar	-	-	NA	d (0/2/8)

Hippurat hidrolizi	-	-	+	d (0/2/8)
Pyrrolidonyl arylamidaz	+	+	+	d (8/2/0)
α -Galaktosidaz	-	-	-	d (3/0/7)
β -Glukuronidaz	-	-	-	-
β -Galaktosidaz	-	-	-	-
Alkalın fosfataz	-	-	+	d (0/2/8)
Lösın arılamidaz		-	+	+
Arjinin dihidrolaz	-	-	-	-
<i>Acid üretimi:</i>				
Riboz	+	+	d	+
Mannitol	-	-	-	d (0/2/8)
Sorbitol	-	-	d	d (0/2/8)
Laktoz	-	-	-	d (0/3/7)
Trehaloz	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	NA	-
Nışasta	-	-	-	d (8/0/2)
Glikojen	-	-	-	-
Gliserol	-	-	-	-
Eritrol	-	-	-	-
D-Arabinoz	-	-	-	-
L-Arabinoz	-	-	-	d (2/0/8)
D-Ksiloz	-	-	+	d (0/1/9)
L-Ksiloz	-	-	-	NA
Adonitol	-	-	NA	-
β -Metilksilidoz	-	-	NA	-
Galaktoz	-	-	-	-
D-Glukoz	+	+	+	+
D-Fruktoz	+	+	+	+
D-Mannoz	+	+	+	+

L-Sorboz	-	-	d	d (0/3/7)
Ramnoz	-	-	-	d (0/3/7)
Dulsitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	d (0/2/8)
α -Methylxy-D-mannosid	-	-	-	-
α -Methylxy-D-glukosid	+	+	+	+
N-Acetylglukosamin	+	+	+	+
Amigladin	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+
Salisin	+	+	d	+
Sellobioz	-	-	d	+
Maltoz	-	-	-	-
Melibioz	+	+	NA	d (2/4/4)
Sakkaroz	-	-	-	d (0/2/8)
Melezitoz	-	-	-	-
Ksilitol	-	+	d	+
β -Gentiobioz	-	-	-	-
D-Turanoz	-	-	-	-
D-Liksoz	+	+	+	+
D-Tagatoz	-	-	-	-
D-Fukoz	-	-	d	-
L-Fukoz	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-
Potasyum glukonat	-	-	+	-
Potasyum 2-ketoglukonat	-	-	-	-
Potasyum 5-ketoglukonat	-	-	-	-

kb, kokobasil; d, değişken karakter (pozitif/zayıf/negatif); NA, belirlenemedi.

2.1.1.2. Genotipik identifikasyon

V. salmoninarum izolatlarının genotipik identifikasyonu 16S rRNA geni hedef alınarak dizayn edilmiş tür spesifik primerlerin kullanıldığı PCR metodu ile gerçekleştirilmektedir. Bu primer çifti ile *V. salmoninarum*'a spesifik 300 pb'lik amplifikasyon ürünü elde edilmektedir (Ruiz-Zarzuela vd., 2005; Didinen vd., 2011).

2.1.2. Epizootiyoloji

V. salmoninarum'un meydana getirdiği Vagokokkozis, Avrupa alabalık endüstrisinde (> 150-200 g) gökkuşağı alabalıklarında %20-50 arası mortalite ile seyreden önemli bir bakteriyel hastalıktır. Salgınlar genelde su sıcaklığı 10-12°C olduğunda ve yumurtlamadan sonra oluşan stres sonucunda meydana gelmektedir (Michel vd., 1997; Ghittino vd., 2004; Ruiz-Zarzuela vd., 2005). Hastalık ülkemizde ilk defa 2011 yılında Akdeniz Bölgesi'ndeki bir çiftlikteki 12,6 °C su sıcaklığında 1800-2000 g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında sağım sonrası oluşan stres sonucu görülmüş olup, ölüm oranı %50 olarak seyretmiştir (Didinen vd., 2011). Daha sonra vagokokkosis balık nakilleriyle çiftlikler arasında yayılmıştır. Ülkemizde halen birçok çiftlikte görülmekte olup çok önemli ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Tanrikulu vd., 2014; Özcan vd., 2014).

Bu hastalık salgınlarında toplanan epidemiyolojik verilere ve periyodik balık sağlığı izleme sonuçlarına göre, 10-11°C su sıcaklığı yumurtlama periyodunda ergin gökkuşağı alabalığı dişilerinde yüksek ölüme neden olan en önemli risk faktörüdür (Ruiz-Zarzuela vd., 2005). Michel vd. (1997), 600-4000 g ağırlığındaki balıkların bu hastalığa karşı çok duyarlı olduğu, ölümlerin boylama ve ayırma gibi yetiştiricilik işlemleri sırasında oluşan ya da diğer çevresel stres faktörlerinin etkisinden dolayı artış gösterdiğini bildirmiştir. Hastalığın stok yoğunluğunun fazlalığı, su kalitesinde ani değişimler ve fotoperiyot uygulamalarına bağlı oluşan stres nedeniyle oluştuğunu rapor etmişlerdir (Didinen vd., 2011).

2.1.3. Hastalığın klinik belirtileri ve patolojisi

Hasta balıklarda halsizlik, belirgin denge kaybı, yüzmede güçlük, tek ve çift taraflı ekzoftalmus, göz küresinin tahribatı, korneanın tüm katmalarında yangı (keratitis), perioküler bölgede kanama, solungaçlarda solgunluk ve peteşiyel hemoraji, anüste prolapsus (Şekil 2.1), renkte koyulaşma, çene, göz, ağız, abdomen, yüzgeç

tabanlarında ve anüs etrafında peteşiyel hemorajiler (Şekil 2.1), operkular bölgenin arkasında ve kaudal bölgede frunkuller (Şekil 2.2) ve vücudun her iki yanında lezyonlar (Şekil 2.3) görülmektedir. İnternal olarak vücut boşluğunda kanlı asidik sıvı birikimi, midede şeffaf sıvı birikimi ve kanama, bazı balıklarda gastritis, perikarditis ve epikarditis içine alan kalp lezyonları, kalpte (ventrikül ve atrium) pseudomembran oluşumu (Şekil 2.4), karaciğer ve dalakta fibrinli bir katman (Şekil 2.5), karaciğerde solgunluk (Şekil 2.6), dalak ve karaciğerde büyüme, konjesyon, ovaryum ve bağırsakta hemoraji, bağırsakta sarı ve kanlı jelatinöz eksudat birikimi (Şekil 2.7), hava kesesi ve kaslardaki kan damarlarında konjesyon, yağ doku, karaciğer ve kas duvarında nokta şeklinde hemorajiler görülmektedir. Hastalığın en tipik belirtileri kalpte, dalakta ve karaciğerde fibrinli bir katmanın şekillenmesi ve iç organlarda hemoraji (Şekil 2.8) görülmesidir (Michel vd., 1997; Ruiz-Zarzuela vd., 2005; Didinen vd., 2011).



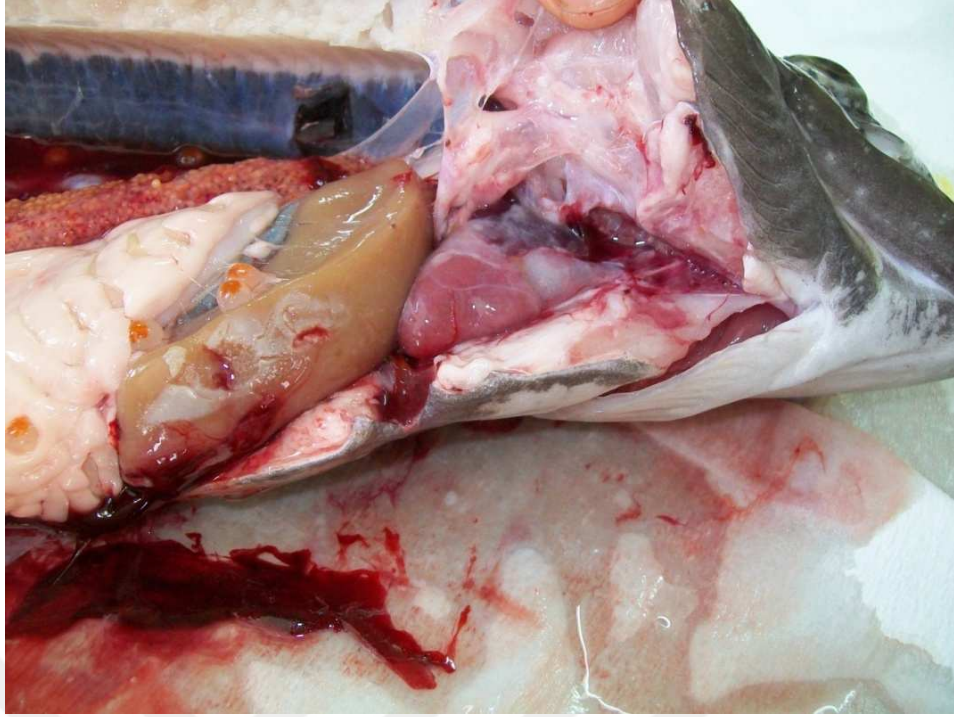
Şekil 2.1. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında karın yüzgecinde kanama ve anüste kızarıklık (orijinal)



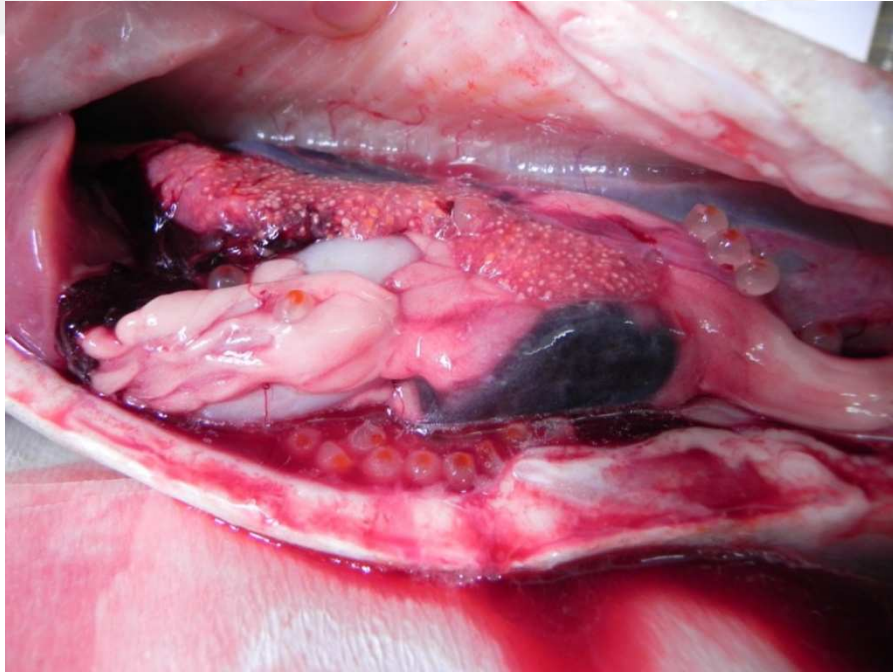
Şekil 2.2. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında vücut yüzeyinde frunkul oluşumu (orijinal)



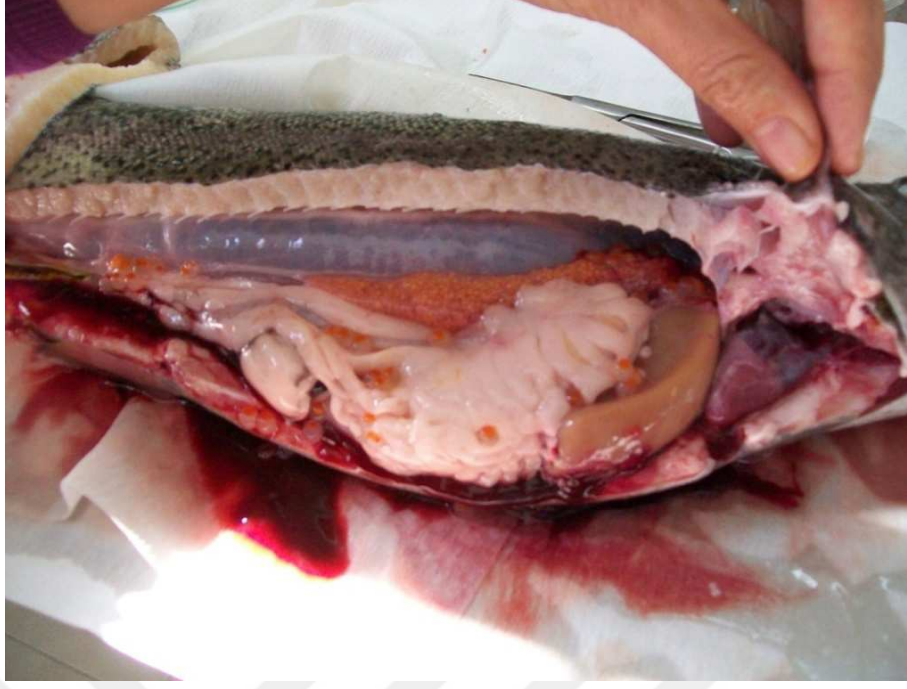
Şekil 2.3. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında vücut yüzeyinde ülser (orijinal)



Şekil 2.4. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşığı alabalığında atrium ve ventrikülde pseudomembran (orijinal)



Şekil 2.5. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşığı alabalığında dalakta pseudomembran (orijinal)



Şekil 2.6. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında karaciğerde anemi ve kalpte pseudomembran (orijinal)



Şekil 2.7. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında bağırsak lümeninde jelatinöz eksudat (orijinal)



Şekil 2.8. *V. salmoninarum*'la doğal enfekte gökkuşağı alabalığında iç organlarda hiperemi (orijinal)

Histopatolojik incelemeler sonucu, birçok dokuda hiperemi ve ödem olduğu saptanmıştır. Doğal ve deneysel enfeksiyonlarda balıkta oluşan epikartitis başlıca saptanan patolojik bulgudur. Doğal enfeksiyonda epikardiumda kanama saptanmıştır. Deneysel enfeksiyonlar sonucunda, kılcal kan damarlarında, mononükleer hücrelerde ve fibrinoz dokular arasında sayısız Gram pozitif kok görülmektedir. Ventrikular miyokardiumun altında yer alan kortikal katman bakterilerin bulunduğu kılcal damarlar tarafından doldurulur ve bunun sonucunda bu katman homojenitesini kaybeder. Endokardiumda hiperemi hastalık kronik safhaya geçmeden önce saptanmaktadır. Balıklarda orta derecede menenjitis görülür. Epidermis, dermis, hipodermis ve bunların altında yer alan muskular katmanlarda yoğun makrofaj ve lenfosit birikiminden dolayı deride lezyonlar görülür. Yangı cevabı sonrasında deride kalınlaşma ya da epidermis hücrelerinin dağılması ile ilgili olarak sayısız dejeneratif bulgu ve deri lezyonları görülebilir (Michel vd., 1997).

Histolojik olarak enfekte balıklarda sıklıkla şiddetli panoftalmitis ve menenjitis saptanmaktadır. Epikardium, endokardium ve miyokardiumda, kas fibrilleri

arasındaki boşluklarda lökosit ve lenfosit birikimi ile karakterize yangı ve nekroz, karaciğerde hepatositlerin dejenerasyonu ile hiperemi ve ödem görülebilmektedir (Ruiz-Zarzuela vd., 2005).

2.1.4. Tedavi çalışmaları

Akuakültürde vagokokkozis salgınlarının önlenmesi için kullanılabilecek aşı henüz mevcut değildir. Aşı çalışmaları yapılmış, ancak başarılı sonuçlar elde edilememiştir (Michel vd.,1997; Ruiz-Zarzuela vd., 2005). Ayrıca *V. salmoninarum* *in vitro* olarak antibiyotiklere (ampisilin, amoksisillin, eritromisin, oksitetrasiklin ve doksisisiklin) duyarlı olmasına rağmen, sahada tedavi uygulamalarında kullanıldıklarında başarısızlık görülmektedir (Michel vd.,1997; Ruiz-Zarzuela vd., 2005; Didinen vd., 2011). Bununla birlikte ülkemizde Ege Bölgesi'nde yer alan bir alabalık çiftliğindeki gökkuşağı alabalığı anaçlarında ortaya çıkan vagokokkozisin tedavisinde florfenikol'ün etkili olduğu belirtilmiştir (Tanrıkul vd., 2014).

V. salmoninarum suşları eritromisin ve oksitetrasikline duyarlı olmasına rağmen bu antibiyotiklerle yapılan tedavilerde (standart doz ve zamanda) antibiyotiklerin sadece kısa periyotlar (5-7 gün) için etkili oldukları bulunmuştur. Mortaliteleyi azaltmak için ilaç tedavisine devam edilmesi gerekmektedir. Fakat bu durum antibiyotiklere karşı direnç gelişme (özellikle amoksisilin ve trimetoprim/sülfametakzol'e karşı) riskinin artmasına neden olmaktadır (Ruiz-Zarzuela vd., 2005).

2.2. Laktik Asit Bakterileri

LAB'lar Gram-pozitif olarak tanımlanırlar. Genellikle hareketsiz, sporsuz olan bu bakteriler laktozdan fermentasyon sonucu laktik asit oluştururlar. Hem basil (*Lactobacilli* ve *Carnobacteria*) hem de kok (*Streptococci*) ihtiva eden bu grup üyeleri genellikle katalaz ve strom oksidaz negatiftir (Ringo ve Gatesoupe, 1998).

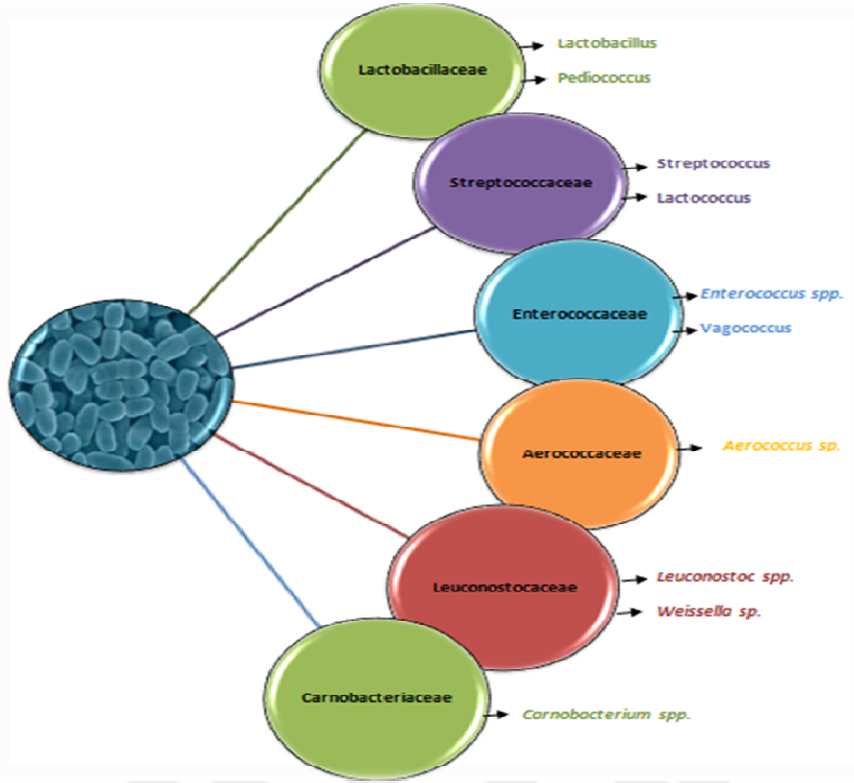
LAB'ların farklı türleri genellikle farklı çevresel koşullarda gelişmeye adapte olmuştur ve doğada yaygındır. LAB'lar farklı türde sıcakkanlı hayvanların (fare, sıçan, domuz, kümes hayvanları ve insanlar) bağırsak boşluğunda, süt ve süt ürünlerinde, deniz ürünleri ve bazı bitki yüzeylerinde yaygın olarak bulunur. Bunlar

genellikle peynir, et, yoğurt ve silaj gibi besin maddelerinin üretiminde ve korunmasında kullanılırlar. Sıcakkanlı hayvanların sindirim sistemindeki LAB'ların rolü araştırılmakta ve tekrar gözden geçirilmektedir (Ringo ve Gatesoupe, 1998).

LAB'lar karasal hayvanların beslenmesinde en yaygın kullanılan probiyotikler olduğu için, sucul türler için de probiyotik olarak kullanılması önerilmektedir (Ringo ve Gatesoupe, 1998). LAB'lar probiyotik olarak pek çok potansiyele sahiptirler: gelişimi uyarabilirler, zararlı bakterilerle rekabet edebilirler ve organizmanın doğal bağışıklık mekanizmasını güçlendirebilirler (Vandenberg, 1993; Villamil vd., 2002).

2.2.1. Laktik asit bakterilerinin balık gastrointestinal faunasındaki varlığı

Yapılan çalışmalarda LAB'ların, balık mide ve/veya bağırsaklarında 6 familya temsilcisi tanımlanmıştır (Şekil 2.9). Lactobacillaceae familyasında ilk cins olarak *Lactobacillus* ve az sayıda *Pediococcus* spp. rapor edilmiştir. En sık rastlanılan familya Carnobacteriaceae familyasıdır ve bu familya içerisinde *Carnobacterium* türleri önem taşımaktadır. Streptococcaceae familyasında ise 2 cins, *Streptococcus* ve *Lactococcus* ile temsil edilmektedir. Enterococcaceae familyasındaki *Enterococcus* spp. daha yaygın, *Vagococcus* ise nadiren rastlanılmıştır. Aerococcaceae (*Aerococcus* sp) ve Leuconostocaceae (*Leuconostoc* spp. ve *Weissella* spp.) familyaları nadiren görülmektedir (Gatesoupe, 2008).



Şekil 2.9. Balık mide ve/veya bağırsaklarında bulunan laktik asit bakterileri (Gatesoupe, 2008)

2.2.2. Laktik asit bakterilerinin balıklarda probiyotik olarak kullanılmasının nedenleri

Laktik asit bakterileri;

- Hücrelere tutunma ve kolonizasyon,
- Spesifik olmayan immün yanıtı uyarma,
- Besleme üzerindeki pozitif etkiler,
- pH ve redoks potansiyelini değiştirme,
- Besin ve tutunma bölgesi için patojenlerle yarışma,
- Hidrojen peroksit ve bakteriosin üreterek patojen gelişimine antagonistik etki gösterme,
- Patojenik bakteriyel toksinlerin ve metabolitlerin inaktivasyonu
- Çoğunluğunun patojen etki göstermemesi gibi pek çok olumlu özelliğe sahiptirler.

Bu yeteneklerinden dolayı da akuakültürde biyolojik kontrol ajanları olarak önerilen probiyotiklerin çoğunluğunu, LAB'lar (*Lactobacillus* ve *Carnobacterium*) oluşturmaktadır. Balık yetiştiriciliğinde LAB'lar gibi probiyotiklerin kullanımı hem hastalıklara karşı direncin artırılmasında hem de balık immünizasyonunu desteklemede olumlu sonuçlar vermektedir. LAB'lar, ürettikleri ve diğer bakterilerin üremesini inhibe eden bileşikler sayesinde intestinal kas tabakasında hızla çoğalarak patojenik bakterilere karşı ilk savunma bariyerini oluştururlar (Gatesoupe, 2008).

2.2.3. Laktik asit bakterilerinin balık patojenlerine karşı kullanımına ilişkin çalışmalar

Carnobacterium divergens, *Gadus morhua* balıklarının larvalarında *V. anguillarum*'un neden olduğu vibriosisden kaynaklanan ölümleri azaltmıştır (Gildberg vd., 1997). *C. inhibens* K1 suşunun Atlantik salmonları (*Salmo salar*)'ın bağırsak mukuslarındaki bakteriyel balık patojenlerini inhibe ettiği bildirilmiştir (Joborn vd., 1997, 1999). Aynı suş, *A. salmonicida*, *V. ordalii* ve *Y. ruckeri*'den kaynaklanan ölümleri azaltmıştır (Robertson vd., 2000). Benzer şekilde, sağlıklı gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *C. maltaromaticum* B26 ve *C. divergens* B33 suşlarının, *A. salmonicida* ve *Y. ruckeri*'ye karşı etkileri kanıtlanmıştır (Kim ve Austin, 2006).

Kalkan larvalarında yem olarak kullanılan Artemia kültürüne LAB'lar (*L. lactis* ve *L. bulgaricus*) ilave edilmiş ve denemenin 17. gününde bakteri uygulanan grupta yaşama oranı % 55, kontrol grubunda ise % 34 olarak bulunmuştur (Verschuere vd., 2000).

Nikoskelainen vd. (2001), gökkuşağı alabalıklarında 10^9 kob/g düzeyinde *Lactobacillus rhamnosus* içeren balık yemleriyle beslenen grupların furunkulozis hastalığına karşı dirençli olduklarını ve *Lactobacillus* cinslerinin büyüme oranını arttırdığını tespit etmiştir. Ayrıca salmon yavrularında *C. divergens*'in kullanımının balıkların *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı dayanıklılığını da arttırdığı gözlenmiştir. Pirarat vd. (2006), tilapia (*Oreochromis niloticus*) balıklarında *L. rhamnosus*'un *Edwardsiella tarda* enfeksiyonuna karşı koruyucu etkisini incelemişler

ve probiyotik ilave edilen grupta kontrol grubuna kıyasla kümülatif mortalitenin önemli düzeyde düşük olduğu bildirmişlerdir.

L. fructivorans ve *L. plantarum* çipura larvaları ve yavrularında görülen ölümleri önemli ölçüde azaltmıştır (Carnevali vd., 2004). Vendrell vd. (2008), alabalıklarda *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 ve *L. plantarum* CLFP 238 probiyotik suşlarını 30 gün süreyle 10^7 kob/g düzeyinde balıklara oral yol ile verdikten sonra, balıklara *L. garvieae* patojeni ile epruvasyon yapmıştır. Probiyotikle beslenen balıklarda ölüm oranı % 46-54 düzeyindeyken, kontrol grubunda % 78 olarak belirlenmiştir. Probiyotik kullanımının ölüm oranını azalttığı tespit edilmiş ve laktokokkosiz kontrolünde etkili olabileceği bildirilmiştir. *L. acidophilus* Nil tilapialarında spesifik olmayan bağışıklık sistemini uyramış; *Pseudomonas fluorescens* ve *S. iniae*'ye karşı hastalık direnci oluşturmuştur (Aly vd., 2008).

Byun vd. (1997), *Lactobacillus* DS-12'nin, balık patojeni olan *E. tarda*, *Pasteurella piscicida*, *A. hydrophila* ve *V. anguillarum*' a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Bu bakteri türünün % 10 NaCl ve % 10 safrada geliştiği, pH 3.0'de 90 dk canlı kalabildiği belirtilmiştir. Sonuç olarak *Lactobacillus spp.* DS-12'nin, antibakteriyel aktivite göstermesi, safra tuzlarına ve aside dirençli olması nedeniyle pisi balıklarında probiyotik olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Chang ve Liu, (2002) *Enterococcus faecium* SF 68'yı içeren ticari ürünün Avrupa yılan balıkları (*Anguilla anguilla*)'nda *E. tarda*'nın neden olduğu edwardsiellosis salgınlarını azalttığını bildirmişlerdir. *E. faecium* MC13 *Penaeus monodon* larvalarında *V. harveyi* ve *V. parahaemolyticus*'a karşı bir koruma sağlamıştır (Swain vd., 2009).

V. fluvialis levrek balıklarında bağırsak mukusunda gelişebilmiş ve *V. anguillarum*'un neden olduğu ölümleri azaltmıştır (Sorroza vd., 2012).

Weissella hellenica DS-12, bazı balık patojenlerine karşı bir probiyotik olarak kullanılma potansiyeline sahip bulunmuştur (Byun vd., 1997; Cai vd., 1998).

Atlantik salmon balıklarından izole edilen *Carnobacterium spp.*'nin alabalıklarda yapılan *in vitro* çalışmalarında bu bakterinin *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela*, *S. milleri*, *V. anguillarum* ve *V. ordalii*'ye karşı antagonistik etki göstermiştir (Robertson vd., 2000).

Nikoskelainen vd. (2001), gökkuşağı alabalıklarında 10^9 kob/g düzeyinde *L. rhamnosus* içeren balık yemleriyle beslenen grupların furunkulozis hastalığına karşı dirençli olduklarını ve *Lactobacillus* cinslerinin büyüme oranını arttırdığını tespit etmiştir. Ayrıca salmon yavrularında *C. divergens*'in kullanımının balıkların *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı dayanıklılığını da arttırdığı gözlenmiştir.

Pirarat vd. (2006), tilapia (*Oreochromis niloticus*) balıklarında *L. rhamnosus*'un *E. tarda* enfeksiyonuna karşı koruyucu etkisini incelemişler ve probiyotik ilave edilen grupta kontrol grubuna kıyasla kümülatif mortalitenin önemli düzeyde düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Balcázar vd. (2007) sağlıklı salmonidlerin bağırsaklarından izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* CLFP100, *L. lactis* subsp. *cremoris* CLFP102'in bakteriyel balık patojenleri *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*'a, *L. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069'in ise *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkileri olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, *L. curvatus* (CLFP150)' un *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır.

Balcazar vd. (2008), gökkuşağı alabalıklarının bağırsak mikroflorasından izole ettikleri *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. fermentum*'un *in vitro* şartlarda bazı balık patojenlerinin (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*) gökkuşağı alabalıklarının bağırsak mukusuna tutunmalarını inhibe etme özellikleri araştırmış ve *L. lactis*'in patojenlerin tümünün, *L. plantarum*'un *A. hydrophila* ve *A. salmonicida*'nın; *L. fermentum*'un ise *V. anguillarum* hariç diğer balık patojenlerinin bağırsak mukusuna tutunmasını azalttığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda *L. lactis*'in tüm balık patojenlerine karşı antibakteriyel aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Probiyotik bakterilerin tümü düşük pH ve yüksek balık safrası konsantrasyonlarında hayatta kalabilmiştir.

Sica vd. (2010) Bahia Blanca nehrindeki laktik asit bakterisi biyoçeşitliliğini araştırdıkları çalışmada sedimentten ve balıklarından *Listeria monocytogenes*, *Y. ruckeri*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ve *L. garvieae*'ye karşı antogonistik etkiye sahip 21 adet LAB izole etmişler ve bu bakterilerin *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* ve *Weisella* genuslarına ait olduğu belirtilmiştir. Daha sonraki çalışmalarında da bu bakterilerin tamamının %10 safra konsantrasyonuna ve çoğunluğunun pH 3'e toleranslı olduklarını göstermişlerdir (Sica vd., 2012)

Pérez-Sánchez vd. (2011a), gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole ettikleri *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Leuconostoc* cinsine ait bakteriyel suşların *L. garvieae*'ye karşı antagonistik özellikte olduklarını ve bu suşların düşük pH, yüksek safra konsantrasyonlarında yaşayabildiklerini, konakçıya tutunma kabiliyetlerinin olduğunu (hidrofobisite göstermeleri) ve antibiyotik dirençlerinin geniş bir spektrumda olduğunu tespit etmişleridir.

Vendrell vd. (2008), alabalıklarda *L. mesenteroides* CLFP 196 ve *L. plantarum* CLFP 238 probiyotik suşlarını 30 gün süreyle 10^7 kob/g düzeyinde balıklara oral yol ile verdikten sonra, balıklara *L. garvieae* patojeni ile epruvasyon yapmıştır. Probiyotikle beslenen balıklarda ölüm oranı % 46-54 düzeyindeyken, kontrol grubunda % 78 olarak belirlenmiştir. Probiyotik kullanımının ölüm oranını azalttığı tespit edilmiş ve laktokokkozis kontrolünde etkili olabileceği bildirilmiştir.

Pérez-Sánchez vd. (2011b) *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* suşlarını 10^6 cfu/gr yem dozunda ortalama 26 g ağırlığındaki gökkuşağı alabalıklarında 21 gün süreyle kullanmalarını takiben *L. garvieae* ile yapılan challenge uygulaması sonrasında *L. plantarum* ile beslenen gruptaki ölüm oranının (% 12.5), kontrole (32.5) göre daha düşük olduğu, diğer bakterilerle beslenen balıklarda ise kontrole benzer ölüm oranlarının görüldüğünü belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

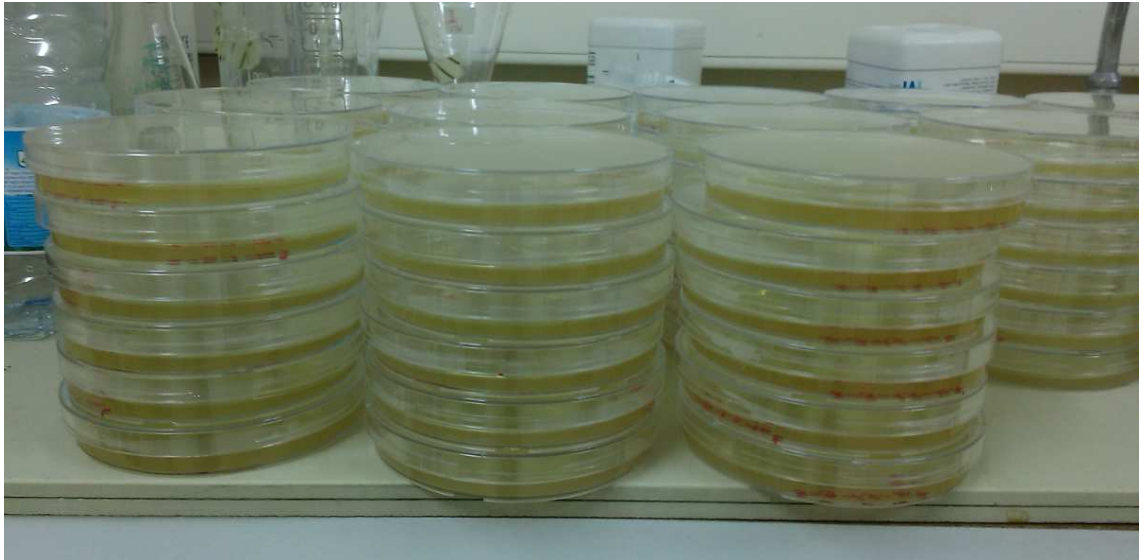
3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında materyal olarak 20 adet sağlıklı gökkuşığı alabalığı (ort.250 g) kullanıldı. Balıklar Isparta ili sınırları içerisinde yer alan iki farklı ticari işletmeden temin edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1.Potansiyel probiyotik bakterilerin izolasyonu

Çalışma süresince, bakteriyolojik incelemeler SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çalışmada *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etki gösteren aday probiyotik bakterilerin seçimi yapıldı. Bu amaçla öncelikle gökkuşığı alabalıklarının bağırsaklarından antagonistik etki gösterebilecek aday probiyotik bakterilerin izolasyonu yapıldı. Bu aşamada bağırsaklar steril şartlar altında kesilip Steril Pepton Water ile homojenize edildikten sonra seri dilüsyonları (10^{-1} - 10^{-8}) hazırlandı ve TSA'ya ekimler yapılarak (Şekil 3.1) 22°C'de 48 saat inkübe edildi (Balcazar vd., 2007a).



Şekil 3.1. Probiyotik bakterilerin TSA'ya ekimi (orijinal)

3.2.2. *V. salmoninarum*'a karşı *in vitro* antagonistik etkinin belirlenmesi

Balıkların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerinin, *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanıldı.

Bu amaçla;

1. TSA'da üretilmiş bakteriler Triptik Soy Broth(TSB)'a alınarak, 25°C'de 48 saat inkube edildi ve stok bakteri kültürleri elde edildi (Şekil 3.2).
2. *V. salmoninarum* suşu TSB'ye ekilerek 25°C'de 24 saat inkube edildi.
3. *V. salmoninarum* suşunun kültüründen 100µl alınarak, döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş 100 ml TSA'ya ilave edildi ve bakterinin besiyerinde homojen bir şekilde dağılımının sağlanması amacıyla besiyeri nazik bir şekilde karıştırıldı.
4. Patojen bakterinin ilave edildiği besiyerlerinin dökümü yapıldıktan sonra 15 dk beklendi ve besiyerleri üzerine steril durham tüpleri kullanılarak yaklaşık 3 mm çapında çukurlar açıldı.
5. Besiyerleri üzerine açılan çukurlara, aday probiyotik bakteri kültürlerinden (sıvı besiyerine ekimli yapılmış 48 saatlik kültürler) 25'er µl ilave edildi ve 25 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası, çukurların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları ölçülerek değerlendirme yapıldı (Hjelm vd., 2004).



Şekil 3.2. TSB’de 48 saatlik potansiyel probiyotik bakteri kültürleri (orijinal)

3.2.3. Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitileri

Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitilerini belirlemek için % 0.03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış TSA hazırlandı. Kongo kırmızısı TSA sterilize edildikten sonra eklendi. Daha sonra Aday probiyotik bakterilerin kongo kırmızısı ilave edilen TSA’ya ekimleri yapılarak (Şekil 3.3) 25 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası oluşan kırmızı renkli koloniler pozitif (hidrofobik), beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak değerlendirildi (Sharma vd., 2006).



Şekil 3.3. Kongo kırmızısı ilave edilmiş TSA agarda hidrofobisite test sonucu

3.2.4. Aday probiyotik bakterilerin safra ve pH toleranslarının belirlenmesi

Aday probiyotik bakterilerin PBS içerisindeki süspansiyonları 10^7 kob/ml olacak şekilde hazırlandı. Gökkuşığı alabalıklarının safra kesesinin patlatılmasıyla safra örnekleri toplandı ve kullanılıncaya kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Bakteriyel süspansiyon, % 0.6-1.5 safra içeren steril PBS ve steril PBS (kontrol) içerisine inoküle edildi. Örnekler $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra steril PBS içinde seyreltilerek TSA'da canlı bakteri sayımı yapıldı (Balcázar vd., 2008).

Aday probiyotik bakterilerin farklı pH şartlarına toleransının belirlenmesi için farklı pH değerlerine (pH 2-7) sahip PBS içerisinde 10^7 kob/ml olarak hazırlanan süspansiyonları $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra steril PBS içinde seyreltilerek TSA'da canlı bakteri sayımı yapıldı (Balcázar vd., 2008).

3.2.5. Aday probiyotik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları

Belirlenen potansiyel probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi ile TSA'da değerlendirildi. Bu amaçla amoksisilin/klavulanik asit (30 μg), ampisilin (10 μg), doksisiklin (30 μg), enrofloksasin (5 μg), eritromisin (15 μg), florfenikol (30 μg), flumekuin (30 μg), gentamisin (10 μg), kanamisin (30 μg), klindamisin (2 μg), kloramfenikol (30 μg), klortetrasiklin (30 μg), nalidiksik asit (30 μg), nitrofurantoin (300 μg), oksolinik asit (2 μg), penisilin (10 U), tetrasiklin (30 μg), tiylosin (60 μg), trimetoprim / sulfamethakzol (1.25/23.75 μg), ve vankomisin (30 μg) antibiyotik diskleri kullanıldı. Petriler 25°C 'de 48 saat inkübe edildi ve inhibisyon zon çapları ölçüldü (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).



3.2.7. Aday probiyotik bakterilerin moleküler analizi

3.2.7.1. İzolatların PCR amplifikasyonu ve 16S rRNA sekans analizi

3.2.7.1.1. *L. garvieae* spesifik PCR

Çalışmada kullanılan bakteriyel izolatların genomik DNA'ları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, GeneJET Genomic DNA Prufikasyon Kit) kullanılarak elde edildi. Olası *L. garvieae* izolatlarının genetik identifikasyonu *L. garvieae* spesifik pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3') primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile gerçekleştirildi (Zlotkin ve ark 1998). Bu amaçla PCR amplifikasyonunda DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1.5 mM of MgCl₂, herbir dNTP'den 0.2 mM, 1.0 U Taq polymerase (Fermentas), 1µM herbir primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl PCR master mix'i oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım Thermo PxE 0.2 termalsaykır (Thermo Scientific) içerisinde 94°C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 55 °C'de 1 dk primer bağlanma, 72 °C'de 1.5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72 °C'de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon sonrası elde edilen ürünler etidium bromid (2mg/ml) içeren % 1,5 agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçta *L. garvieae* spesifik 1100 bp'lik amplifikasyon ürünü veren izolatlar *L. garvieae* olarak identifiye edildi. Moleküler analizlerde pozitif kontrol olarak *L. garvieae* ATCC 43921 suşu, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı.

3.2.7.1.2. 16S rRNA sekans analizi

Moleküler olarak *L. garvieae* olmadığı belirlenen izolatlara ve *L. garvieae* olarak identifiye edilen izolatlar arasından temsili olarak seçilen bir izolata 16S rRNA sekans analizi uygulandı. Bu amaçla öncelikle, izolatların 16S rRNA gen bölgesi 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ve 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) universal primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Amplifikasyon için DEPC-treated water, 1xPCR Buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP, 1.5 U

Taq polymerase (Fermentas), 0.4 µl her bir (100 pmol) primer ve 10 µl template DNA içeren 50 µl PCR master mix'i oluşturuldu. Bu karışım 93 °C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 56 °C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 2 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72 °C'de 10 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuç olarak yaklaşık 1500 bp'lik son ürünlerin elde edilmesi hedeflendi.

Elde edilen PCR ürünleri sekans analizi için Macrogen (Seoul, Kore) firması gönderildi. Özetle, PCR ürünleri öncelikli olarak saflaştırıldı ve 785F (GGATTAGATACCCTGGTA) ve 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) primerleri kullanılarak sekans işlemine tabi tutuldu. Elde edilen sekans dizgileri Genbank kütüphanesinde bulunan referans sekanslar ile Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak karşılaştırıldı.

3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar

Elde edilen veriler (bakterilerin safra ve pH toleransları) SPSS 17.0 paket programında Anova testi ile değerlendirildi (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Parametrelerin önem derecelerini karşılaştırılırken Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve önem düzeyi P=0,05 olarak seçildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *V. salmoninarum*'a Karşı İnhibitör Aktivite Gösteren Bakteriler

Gökkuşluğu alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen toplam 157 bakteriyel izolatdan 6'sının *V. salmoninarum*'a karşı inhibitör aktivite gösterdiği saptandı (Çizelge 4.1). *V. salmoninarum*'a karşı etkili aday probiyotik bakteriler TSA kullanılarak izole edilmesine rağmen bütün suşların LAB olduğu görülmüştür. *V. salmoninarum*'a karşı, TUB/2013/V4 no'lu izolatın en yüksek antagonist aktiviteye sahip olduğu bunu TUB/2013/V2 ve TUB/2013/V1 no'lu izolatların takip ettiği belirlendi. En düşük antogonostik etkiye ise TUB/2013/V10 no'lu izolatın sahip olduğu saptandı.

Çizelge 4.1. *V. salmoninarum*'a karşı inhibitör aktivite gösteren bakteriyel izolatlar

İzolatlar	İnhibisyon zonu (mm)
TUB/2013/V47	9
TUB/2013/V27	10
TUB/2013/V10	8
TUB/2013/V2	16-20
TUB/2013/V4	22-24
TUB/2013/V1	18

4.2. Aday Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonları

V. salmoninarum'a karşı inhibitör aktivite gösteren aday probiyotik izolatların geleneksel metotlar ve API 20 STREP testleri ile belirlenen fenotipik özellikleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

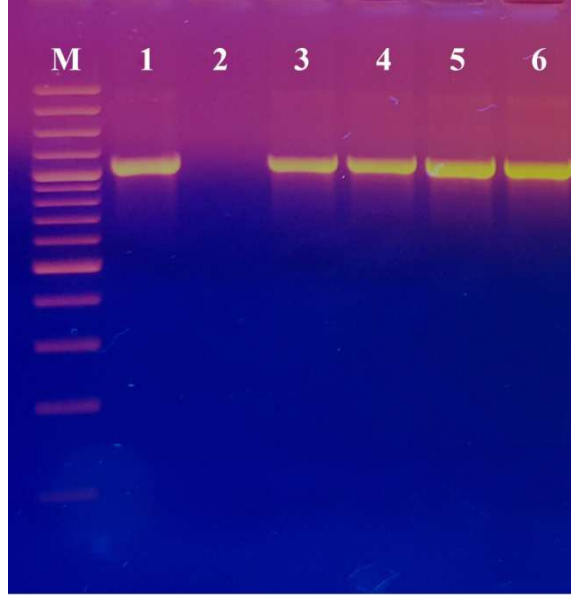
Çizelge 4.2. *V. salmoninarum*'a karşı inhibitör aktivite gösteren izolatların geleneksel metotlarla ve API 20 STREP ile belirlenen fenotipik özellikleri

	TUB/2013/V47	TUB/2013/V27	TUB/2013/V10	TUB/2013/V2	TUB/2013/V4	TUB/2013/V1
Gram boyama	+ kok	+ kok	+ kok	+ kok	+ kok	+ kok
Hareket	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-
Katalaz	-	-	-	-	-	-
O/F Testi	F	F	F	F	F	F
VP	+	+	+	+	+	+
Hippurat hidrolizi	-	-	-	-	+	-
Eskulin hidrolizi	+	+	-	+	+	+
Piyrrrolidonil arylamidase	+	+	-	+	-	-

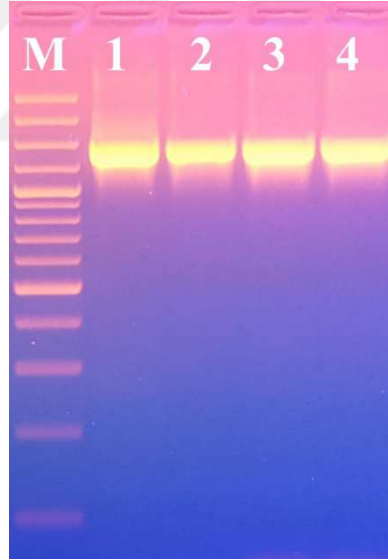
α -Galaktosidaz	-	-	-	-	-	-
β -Glukuronidaz	-	-	-	-	-	-
β -Galaktosidaz	-	-	-	-	-	-
Alkalın fosfataz	-	-	-	-	-	-
Lösin arilamidaz	+	+	+	+	+	-
Arjinin dihidrolaz	+	+	+	+	+	+
<i>Asit üretimi:</i>						
Riboz	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	+	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	+	+
Trehaloz	+	+	+	+	+	+
Inuli	-	-	-	-	-	-
Raffinoz	-	-	-	-	-	-
Niştasta	+	+	-	+	+	+
Glikojen	-	-	-	-	-	-

4.3. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler Analizi

L. garvieae spesifik PCR analizi sonucu TUB/2013/V2, TUB/2013/V10, TUB/2013/V27 ve TUB/2013/V47 no'lu izolatların *L. garvieae* spesifik 1100 bp PCR ürünü verdiği saptandı (Şekil 4.1) ve bu izolatlar *L. garvieae* olarak tanımlendi. TUB/2013/V1 ve TUB/2013/V4 no'lu izolatların ise 1100 bp'de ürün vermediği gözlemlendi ve bu izolatların *L. garvieae* olmadığı belirlendi. *L. garvieae* olarak tanımlanamayan bu iki izolatın ve *L. garvieae* olarak tanımlanan izolatlardan birinin (TUB/2013/V47) 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu sonucu yaklaşık 1500 bp'lik PCR ürünleri elde edildi (Şekil 4.2). Böylece, aynı zamanda *L. garvieae* spesifik PCR sonucumuz da doğrulanmış oldu. Bu ürünlerin sekans analizi sonucu elde edilen sekans dizileri GenBank'a (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) sırasıyla KT428593, KT428592 ve KT428591 erişim numaraları ile kaydedildi. Elde edilen morfolojik, biyokimyasal ve sekans verilerine dayanılarak TUB/2013/V1 ve TUB/2013/V4 no'lu izolatlar *L. lactis* olarak tanımlendi.



Şekil 4.1. *L. garvieae* spesifik PCR (1100 bp). M; Moleküler Markır (100 bp Plus DNA Ladder), 1; *L. garvieae* ATCC 43921, 2; Negatif Kontrol (Distile su), 3; TUB/2013/V2, 4; TUB/2013/V10, 5; TUB/2013/V27, 6; TUB/2013/V47.



Şekil 4.2. 16S rRNA gen bölgesi amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri. M; Moleküler Markır (100 bp Plus DNA Ladder), 1; *L. garvieae* ATCC 43921, 2; TUB/2013/V1, 3; TUB/2013/V4, 4; TUB/2013/V47

4.4. Laktik Asit Bakteri Suşlarının Hidrofobisite, pH Ve Safra Toleransları Ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Antagonistik suşların tamamı kongo kırmızısı ilave edilmiş TSA'da kırmızı renkte koloniler oluşturmuşlardır. Bu sonuç, suşların hidrofobik özellikte, başka bir deyişle non-spesifik olarak konakçının bağırsak epiteline tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermiştir.

Antagonistik suşların tamamının düşük pH şartlarına % 0.6-1.5 safra konsantrasyonlarına dirençli oldukları görülmüştür. Suşların arasında pH ve safra tuzlarına toleransları istatistiksel olarak benzer bulunmuştur ($p>0.05$). (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4. 4.)

Çizelge 4.3. 22 °C'de 1.5 saat için farklı pH şartlarında aday probiyotik suşlarının toleransı (log cfu/ml, SD*)

pH	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V 47	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V 27	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V 10	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V 2	<i>L. lactis</i> TUB/2013/V 4	<i>L. lactis</i> TUB/2013/V 1
7	7.47±0.67	7.59±0.86	7.66±0.55	7.55±0.37	7.74±0.77	7.84±0.44
3	7.69±0.46	7.76±0.67	7.43±0.76	7.51±0.69	7.81±0.48	7.67±0.56
2	7.84±0.77	7.82±0.45	7.34±0.34	7.62±0.38	7.48±0.56	7.56±0.73

* Bakteri sayıları TSA'da belirlendi. Veriler ortalama (standart sapmalar) olarak verilmiştir.

Çizelge 4.4. 22 °C'de 1.5 saat için farklı safra konsantrasyonlarına aday probiyotik suşlarının toleransı (log cfu/ml, SD*)

% safra	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V47	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V27	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V10	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V2	<i>L. lactis</i> TUB/2013/V4	<i>L. lactis</i> TUB/2013/V1
0	6.95±0.36	6.41±0.08	6.57±0.16	6.82±0.41	6.82±0.44	7.44±0.65
0.6	6.88±0.58	6.97±0.41	6.66±0.48	7.05±0.56	7.14±0.3	6.75±0.49
1	6.89±0.51	6.91±0.54	6.63±0.38	7.18±0.50	6.51±0.45	6.63±0.32
1.5	6.94±0.52	7.22±0.39	6.96±0.42	7.21±0.55	7.21±0.6	6.94±0.47

* Bakteri sayıları TSA'da belirlendi. Veriler ortalama (standart sapmalar) olarak verilmiştir.

Antagonistik suşların antibiyotik duyarlılıkları Çizelge 4.5.'te verilmiştir. Suşların çoğunluğunun su ürünleri yetiştiriciliğinde sıklıkla kullanılan amoksisillin/klavulonik asit, ampisillin, doksisisillin, eritromisin ve florfenikole duyarlı oldukları görülmüştür.

Çizelge 4.5. Aday probiyotik bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları

	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V47	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V27	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V10	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/V2	<i>L. lactis</i> TUB/2013/V4	<i>L. lactis</i> TUB/2013/V1
Amoksisillin/ klavulonik asit	S	S	S	S	S	S
Ampisillin	S	S	S	S	I	S
Kloramfenikol	R	I	I	I	I	I
Klortetrasiklin	S	R	S	S	S	S
Klindamisin	R	R	S	R	S	S
Doksisisiklin	S	S	R	S	S	S
Enrofloksasin	I	S	I	R	R	R
Eritromisin	S	S	I	S	I	S
Florfenikol	S	S	S	S	S	S
Flumekuin	R	R	R	R	R	R
Gentamisin	R	R	I	I	S	I
Kanamisin	R	R	I	R	I	I
Nalidiksik asit	R	R	R	R	R	R
Nitrofurantoin	S	S	R	R	S	R
Oksolinik asit	R	R	R	R	R	R
Penisilin	S	S	S	S	S	S
Streptomisin	R	R	R	R	I	R
Tetrasiklin	I	S	S	S	S	R
Trimethoprim/ Sülfamethakzol	R	R	R	R	R	R
Tiylosin	R	R	R	R	R	R
Vankomisin	S	S	R	R	S	I

* R: dirençli , I: orta duyarlı, S: duyarlı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Konakçıdan elde edilen probiyotik suşların, farklı habitatlardan elde edilen suşlardan daha etkin olduğuna ilişkin kesin bir kanıt yoktur (Merrifield vd., 2010). Fakat lokal olarak, yararlı mikroorganizmaların aranması için ilk olarak düşünülmesi gereken yer, konakçının kendi mikrobiotasıdır (Fjellheim vd., 2010). Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen LAB'ların *V. salmoninarum*'a karşı inhibitör etkileri araştırılmıştır. İzole edilen toplam 157 suşdan 6'sının *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda doğada balığın bağırsak mikroflorası ile bakteriyel patojenleri arasında antagonizmin olduğu ve bunun normal ya da koruyucu bir mikrobiyotanın oluşturulmasında koruyucu bir bariyer fonksiyonu gösterebileceği vurgulanmıştır (Gomez ve Balcazar 2008; Cain ve Swan, 2010). Balıklardan ve sucul hayvanlardan izole edilen pek çok LAB balık patojenlerine karşı antagonistik aktivite göstermiştir (Jöborn vd., 1997; Nikoskelainen vd., 2001; Ringø vd., 2002; Balcázar vd., 2007; Balcazar vd., 2008; Kim ve Austin 2008; Rengpipat vd., 2008; Ringø vd., 2010; Pérez-Sánchez vd., 2011a). Pérez-Sánchez vd. (2011) gökkuşağı alabalığı bağırsaklarından izole ettikleri *L. plantarum*, *L. lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Balcázar vd. (2007) de, sağlıklı salmonidlerin bağırsaklarından izole edilen *L. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069'in *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda *L. garvieae* ve *L. lactis* suşlarının *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etki gösterdikleri saptandı.

Triptik soy agar kullanılarak *L. garvieae*'ye karşı etkili potansiyel probiyotik bakteri arama çalışmalarında *A. sobria* GC2 (Brunt vd., 2007), *Vibrio* sp. A3 ve A8, *Aeromonas* sp. A1, A5 ve G1 (Didinen vd., 2014) suşları izole edilmiştir. Bu çalışmada ise, *V. salmoninarum*'a karşı etkili *Aeromonas* ve *Vibrio* cinsine ait bakteriler saptanamadı. İzole edilen suşların, laktik asit bakterilerine ait bulunması, vagokokkozise karşı LAB'ların etkili olduğunu gösterdi.

Bağırsak epitelyum hücrelerine tutunma kabiliyeti, potansiyel probiyotik suşlar için önemli bir özelliktir. Pozitif hidrofobisite sonuçları bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir (An ve Friedman, 2000; Rinkinen, 2004). Pan vd. (2006) LAB'ların bağırsak epitel hücrelerine tutunma

yeteneklerinin olduğunu ve hidrofobik suşların güçlü bir tutunma kabiliyeti gösterdiğini bildirmişlerdir. Pérez-Sánchez vd. (2011a), gökkuşağı alabalıklarında izole ettikleri *L. plantarum* ve *L. lactis* suşlarının hidrofobik özellikte olduklarını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da antagonistik suşların tamamı hidrofobik özellikte bulundu.

Yüksek ölçüde hidrofobik özelliğe sahip suşların asite ve safraya dirençli olmaları nedeniyle mide bağırsak boşluğu boyunca daha çok hayatta kalma kabiliyetine sahip ve potansiyel olarak balığın bağırsak yüzeyine kolonize olabilmektedirler (Nikoskelainen vd., 2001). Probiyotik suş seçiminde kullanılan safra konsantrasyonları için araştırmacılar arasında bir fikir birliği sağlanamamıştır. Bazı araştırmacılar % 10 safra konsantrasyonuna kadar toleransın tespit edilmesini önerirken (Nikoskelainen vd., 2001), diğer bir kısmı % 1'e kadar toleransın tespitinin yeterli olduğu görüşündedirler (Pérez-Sánchez vd. 2011a). Nitekim, Balcazar vd. (2008), salmonid balıklarda bağırsaktaki fizyolojik safra konsantrasyonunun % 0.4-1.3 arasında hesapladığını bildirmiştir. Bu nedenle çalışmamızda aday probiyotik bakterilerin % 0.6, 1 ve 1.5 safra konsantrasyonlarına toleransları araştırılmış ve antagonistik etki gösteren suşların tamamının safra tuzlarına toleranslı oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, Pérez-Sánchez vd. (2011), *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* suşlarının % 1 safra koşullarında 3 saat inkübasyonu takiben sayılarının değişmediğini belirlemişlerdir. Balcazar vd. (2008) de, Gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole ettikleri antagonistik *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* suşlarının 1.5 saat süreyle % 2.5-10 safra konsantrasyonlarına maruz bırakıldıklarında hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir.

Gökkuşağı alabalıklarının mide pH'ları 2.5-3.5 olarak hesaplanmıştır (Lavelle ve Harris 1997). Bu nedenle aday probiyotik suşların bu aralıklardaki pH değerlerine toleranslı olması mideden geçişleri esnasında hayatta kalmalarını sağlayacaktır. Çalışmamızdaki aday probiyotik suşların tamamı 2-3 pH şartlarında hayatta kalabildikleri saptanmıştır. Pérez-Sánchez vd. (2011a) de *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* suşlarının pH 3'de 3 saat inkübasyonu takiben sayılarının değişmediğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Balcazar vd. (2008), gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole ettikleri antagonistik *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* suşlarının tamamının 2.5-6.5 pH değerlerine 1.5 saat süreyle maruz

bırakıldıklarında hayatta kalabildiklerini, 1-2 pH'ya ise tolerans gösteremediklerini bildirmişlerdir.

Pérez-Sánchez vd. (2011a) gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole ettikleri *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* suşlarının geniş spektrumda antibiyotik direnci gösterdiğini bildirmişler ve bunun antibiyotik tedavileri esnasında konakçının bağırsak mikrobiyotasının ve fizyolojisinin etkilenmemesi açısından olumlu olduğunu belirtmektedirler. Fakat probiyotik aday suşlarda antibiyotiklere direnç olması probiyotiklerin güvenli kullanımı açısından uygun değildir (Verschuere vd., 2000; Kesarcodi-Watson vd., 2008). Çünkü bu direnç faktörleri patojen mikroorganizmalara aktarılabilmektedir. Bu nedenle, antibiyotiklere dirençli bulunan aday probiyotik suşların, bu direnç faktörlerini plazmidler yoluyla aktarma mekanizmalarına sahip olup olmadıkları araştırılmalıdır (Moubareck vd., 2005; Wang vd., 2008). Bu nedenle, çalışmamız esnasında izole edilen antagonistik LAB'ların su ürünleri yetiştiriciliğinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere duyarlı bulunması probiyotik olarak kullanımları açısından istenilen bir sonuçtur.

Sonuç olarak, bu çalışmada gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole ettiğimiz, *L. garvieae* TUB/2013/V47, *L. garvieae* TUB/2013/V27, *L. garvieae* TUB/2013/V10, *L. garvieae* TUB/2013/V2, *L. lactis* TUB/2013/V1, ve *L. lactis* TUB/2013/V4 suşlarının *V. salmoninarum*'a karşı inhibitör etki gösterdiği saptandı. Bu sonuç, ortalama ağırlıkları 250 g olan gökkuşağı alabalıklarının bağırsak mikrobiyotasında vagokokkozise karşı antagonistik etki gösteren LAB'ların varlığını kanıtladı. Bu suşlar probiyotiklerde aranan (hidrofobik, yüksek safra ve düşük pH şartlarına dirençli olma, antimikrobiyallere duyarlı olma) özellikleri göstermişlerdir. İleride yapılacak çalışmalarda bu suşların patojeniteleri araştırıldıktan sonra, apatojen suşların gökkuşağı alabalıklarının yemlerine ilave edilerek kullanımlarını takiben vagokokkozise karşı hastalık direnci gösterip göstermedikleri belirlenecektir. Böylece, alınabilecek pozitif sonuçlar doğrultusunda, bu suşları gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği sektöründe vagokokkozisin kontrolünde probiyotik olarak kullanılabilecek ticari bir ürüne dönüştürülebilecektir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde LAB'lar kadar *Bacillus* türlerinin de bakteriyel patojenlere karşı etkileri kanıtlanmıştır. Bu nedenle, vagokokkozisin kontrolünde spesifik olarak *Bacillus* cinsine ait bakterilerin araştırılması da faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A., Mohamed, M.F. 2008. "Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections", Fish and Shellfish Immunology, 25, 128-136.
- An, Y., Friedman, R.J. 2000. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications. Totowa, New Jersey: Humana, Press.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 4th edn, Springer-Praxis, Chichester, UK. ISBN 1402060688
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. 2007. "In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens", Veterinary Microbiology, 122, 373-380.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Múzquiz, J.L., Gironés, O. 2008. "Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish", Aquaculture, 278, 188-191.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Múzquiz, J.L. 2007. "In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens", Veterinary Microbiology, 122, 373-380.
- Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L. 2006. "The role of probiotics in aquaculture", Veterinary Microbiology, 114, 173- 186.
- Byun, J.W., Park, S.C., Benno, Y., Oh, T.K. 1997. "Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*)", The Journal of General and Applied Microbiology, 43, 305-8.
- Cai, Y.M., Benno, Y., Nakase, T., Oh, T.K. 1998. "Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine", The Journal of General and Applied Microbiology, 44, 311-6.
- Cain, K., Swan, C. 2010. "Barrier function and immunology". The Multifunctional Gut of Fish. Editor: Grosell, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. Amsterdam: Academic Press.
- Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A.M., Cresci, A. 2004. "Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development", Aquaculture International, 12, 377-386.

- Chabrillon, M., Arijó, S., Díaz-Rosales, P., Balebona, M.C., Morinigo, M.A. 2006. "Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.)", *Aquaculture Research*, 37, 78-86.
- Chang, C.I., Liu, W.Y. 2002. "An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla*, L.", *Journal of Fish Diseases*, 25, 311-315.
- Didinen, B.I., Kubilay, A., Diler, O., Ekici, S., Onuk, E., Findik, A. 2011. "First isolation of *Vagococcus salmoninarum* from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) broodstocks in Turkey", *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 31(6), 235-243.
- Farzanfar, A. 2006. "The use of probiotics in shrimp aquaculture", *International Journal of Environmental Health Research*, 48, 149-158.
- Fjellheim, A.J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I.A., Vadstein, O. 2010. "Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae", *Veterinary Microbiology*, 144, 153-9.
- Gatesoupe, F.J. 2008. "Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3), 107-114.
- Gomez, G.D., Balcazar, J.L. 2008. "A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish", *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52, 145-154.
- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Petracca, G. 2004. "Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety", *Atti XI Convegno Nazionale S.I.P.I.*, 7-9 Ottobre 2004, Finale Ligure (SV) Italy.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., Ringø, E. 1997. "Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*)", *Hydrobiologia*, 352, 279-285.
- Irianto, A., Austin, B. 2002. "Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)", *Journal of Fish Diseases*, 25, 333-342.
- Joborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L., Kjelleberg, S. 1997. "Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1", *Journal of Fish Diseases*, 20, 383-392.

- Joborn, A., Dorsch, M., Christer, O.J., Westerdahl, A., Kjelleberg, S. 1999. "Carnobacterium inhibens sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*)", International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 1891-8.
- Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielsen, J., Melcheiørensen, J., Jensen, S., Duncan, H., Ahrens, P., Birkbeck, H., Gram, L. 2004. "Selection and Identification of Autochthonous Candidate Probiotic Bacteria from Turbot Larvae (*Scophthalmus maximus*) Rearing Units System", Applied Microbiology, 27,360-371.
- Kesarcodi Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.L.J., Gibson, L. 2008. "Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanism of action and screening processes", Aquaculture, 274, 1-14.
- Kim, D.H., Austin, B. 2008. "Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine", Letters in Applied Microbiology, 47,141-7.
- Kim, D.H., Austin, B. 2006. "Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics", Fish Shellfish Immunology, 21, 513-524.
- Lavelle, E.C., Haris, J.E. 1997. "The processing of an orally administered protein antigen in the digestive tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*", Comparative Biochemistry and Physiology A, 117, 263-275.
- Lazado, C.C., Caipang, C.M.A., Rajan, B., Brinchmann, M.F., Kiron, V. 2010. "Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod", Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2,126-134.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Børgwald, J., Castex, M., Ringø, E. 2010. "The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids", Aquaculture, 302, 1-18.
- Michel, C., Nougayrède, P., Eldar, A., Sochon, E., De Kinkelin, P. 1997. "*Vagococcus salmoninarum*, a bacterium of pathological significance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* farming", Diseases of Aquatic Organisms, 30,199-208.
- Mota, R., Moreira, J.L., Souza, M., Horta, F., Teixeira, S., Neumann, E., Nicoli, J., Nunes, A. 2006. "Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines", BMC Biotechnology, 6, 1-11.
- Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M.J., Doucer-Popularie, F. 2005. "Antimicrobial susceptibility of Bifidobacteria". The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55, 38-44.

- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., Ouwehand, A. 2001. "Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish", *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2430-5.
- Özcan M., Yılmaz, Y., Donat, E., Kılavuz, D, (2014). Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerindeki Bazı Gökkuşáğı Alabalığı Kafes İşletmelerinde Görülen *Vagococcus salmoninarum* Enfeksiyonunun Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakóltesi, Su Ürünleri Dergisi, *Journal Of Fisheries & Aquatic Sciences*. 29(1): 21-31.
- Pan, W.H., Li, P.L., Liu, Z. 2006. "The correlation between surface hydrophobicity and adherence of Bifidobacterium strains from centenarians faeces", *Food Microbiology*, 12,148-152.
- Perez-Sanchez, T., Balcazar, J.L., Garcia, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Merrifield, D.L., Ruiz-Zarzuela, I. 2011a. "Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*", *Journal of Fish Diseases*, 34,499-507.
- Perez-Sanchez, T., Balcazar, J.L., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini, G., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. 2011b. "Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection", *Fish and Shellfish Immunology*,31(2), 196-201.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T. 2006. "Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Veterinary Immunolgy and Immunopatholgy*,113(3-4), 339-347.
- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., Piyatiratitivorakul, S. 2008. "Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*", *Aquaculture Research*, 39, 134-143.
- Rinkinen, M. 2004. "Methods for assessing the adhesion of probiotic and canine gut-derived lactic acid producing bacteria to the canine intestinal mucosa in vitro and measuring mucosal secretory IgA", Academic dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
- Ringø, E., Gatesoupe, F.J. 1998. "Lactic acid bacteria in fish: a review", *Aquaculture*, 160,177-203.
- Ringø, E., Sepploa, M., Berg, A., Olsen, R.E., Schilinger, U., Holzapfel, W. 2002. "Characterization of *Carnobacterium divergens* strain 6251 isolated from intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)", *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 120-9.

- Ringø, E., Løvmo, L., Kristiansen, M., Bakken, Y., Salinas, I., Myklebust, R., Olsen, R.E., Mayhew, T.M. 2010. "Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review", *Aquaculture Research*, 41, 451- 467.
- Robertson, P.A.W., Dowd, C.O., Burrells, C., Williams, P., Austin, B. 2000. "Use of *Carnobacterium sp.* as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)", *Aquaculture*, 185, 235-243.
- Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Girones, O., Ghittino, C., Múzquiz, J.L. 2005. "Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), broodstocks:characterisation of the pathogen", *Veterinary Research Communications*, 29, 553-562.
- Sharma, K.K., Soni, S.S., Meharchandani, S. 2006. "Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*", *Veterinarski Arhiv*, 76, 363-6.
- Sica, M.G., Brugnoli, L.I., Marucci, P.L., Cubitto, M.A. 2012. "Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming", *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 869-879.
- Sica, M.G., Olivera, N. L., Brugnoli, L. I., Marucci, P. L., López-Cazorla, A. C., Cubitto, M. A. 2010. "Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary", *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45(3), 389-397.
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Roman, L., Grasso, V., Vega, J., Real, F. 2012. "Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, 155, 369-373.
- Swain, S.M., Singh, C., Arul, V. 2009. "Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*", *The World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 697-703.
- Tanrikul, T., Avsever, M.L., Onuk, E.E., Didinen, B.I. 2014. "*Vagococcus salmoninarum*, a causative agent of disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) broodstocks in the aegean region of Turkey", *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 25(1), 11-6.
- Vandenbergh, P. 1993. "Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth", *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221-238.

- Vendrell, D., Luis Balcázar, J., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Luis Múzquiz, J. 2008. "Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria", *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(4), 337-345.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000. "Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture", *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64, 655–671.
- Villamil, L., Tafalla, C., Figueras, A. Novoa, B. 2002. "Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*)", *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9, 1318-1323.
- Vizoso-Pinto, M.G., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. 2006. "Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products", *International Journal of Food Microbiology*, 109, 205-214.
- Wallbanks, S., Martinez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Philips, B.A., Collins, M.D. 1990. "16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov.", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(3), 224-230.
- Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J. 2008. "Probiotics in aquaculture: challenges and outlook", *Aquaculture*, 281(1), 1-4.
- Zhou, X.X., Pan, Y.J., Wang, Y.B., Li, W.F. 2007. "In vitro assessment of gastrointestinal viability of two photosynthetic bacteria, *Rhodospseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*", *Journal of Zhejiang University Science*, B8, 686-692.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 983-985.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hatice (Durgut)SAYI

Doğum Yeri ve Yılı: FETHİYE, 1989

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

E-posta: sumhatice@gmail.com / haticedurgut_48@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise: İbrahim Gül Lisesi(2003-2006)

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
(2010–2013)