

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

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARI (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum
1792) ‘NDA *Lactococcus garvieae*’ YA KARŞI *in vitro*
ANTAGONİSTİK ETKİ GÖSTEREN POTANSİYEL
PROBİYOTİK BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI**

Esengül MORSÜMBÜL

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

**II. Danışman
Doç. Dr. Alper ÇİFTÇİ**

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



©2016 [Esengül MORSÜMBÜL]

TAAHHÜTNAME

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

Esengül MORSÜMBÜL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Laktokokkozis	3
2.2. Akuakültürde Probiyotiklerin Rolü	4
2.2.1. Probiyotikler: tanım ve prensipleri	4
2.2.2. Probiyotiklerin etki mekanizmaları:	5
2.2.3. Kolonizasyon	9
2.2.4. Probiyotiklerin seçimi	10
2.2. Gökkuşağı Alabalıklarında Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Kullanımına İlişkin Çalışmalar	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal	15
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Potansiyel probiyotik bakterilerin izolasyonu	15
3.2.2. <i>L. garvieae</i> 'ya karşı <i>in vitro</i> antagonistik etkinin belirlenmesi	16
3.2.3. Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisiteleri	16
3.2.4. Aday probiyotik bakterilerin safra ve pH toleranslarının belirlenmesi	17
3.2.5. Aday probiyotik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları	17
3.2.6. Aday probiyotik bakterilerin fenotipik karakterizasyonları	18
3.2.7. Aday probiyotik bakterilerin moleküler analizi	18
3.2.8. İstatistiksel hesaplamalar	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
4.1. <i>L. garvieae</i> 'ya Karşı İnhibitör Aktivite Gösteren Bakteriler	20
4.2. Aday Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonları	20
4.3. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler Analizi	23
4.4. Bakteri Suşlarının Hidrofobisite, pH ve Safra Toleransları ve Antibiyotik Duyarlılıkları	24

5. TARTIşMA VE SONUÇLAR.....	26
KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİş.....	38



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) 'nda *Lactococcus garvieae*'ya karşı *in vitro* antagonistik etki gösteren potansiyel probiyotik bakterilerin araştırılması

Esengül MORSÜMBÜL

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç.Dr. Behire Işıl DİDİNEN
II. Danışman: Doç.Dr. Alper ÇİFTÇİ**

Bu çalışmada daha önce Akdeniz Bölgesindeki bir alabalık işletmesinde ortaya çıkan laktokokkozis salgını esnasında izole edilen *Lactococcus garvieae* 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 *L. garvieae*'ya karşı antagonistik aktiviteleri araştırıldı. Antagonistik suşların fenotipik identifikasyonlarından sonra, PCR ile 16S rRNA bölgesinin dizi analizi yapılarak bakteri türlerinin identifikasyonları yapılmıştır. Çalışmada *L.garvieae* (TUB/2013/L32), *L. garvieae* (TUB/2013/L95), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) ve *Aeromonas sobria* (TUB/2013/L63) olmak üzere 4 antagonistik suş tanımlanmıştır. Sonuç olarak, *L.garvieae* (TUB/2013/L95) hariç olmak üzere diğer suşların *in vitro* probiyotik özelliklere (hidrofobik, safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına dirençli olma) sahip oldukları saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Aeromonas*, Akuakültür, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactococcus garvieae*, *Oncorhynchus mykiss*, Probiyotik

2016,49 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of potential probiotic bacteria with *in vitro* antagonistic effect against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

Esengül MORSÜMBÜL

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ

In this study, probiotic properties of endogenous rainbow trout microbiota against *Lactococcus garvieae* isolated during an outbreak of lactococcosis 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 *L. garvieae* 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 *L. garvieae* (TUB/2013/L32), *L. garvieae* (TUB/2013/L95), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) and *Aeromonas sobria* (TUB/2013/L63). As a result, it was found that the strains have *in vitro* probiotic properties (hydrophobic, tolerant to bile salts and low pH conditions) except for *L. garvieae* (TUB/2013/L95).

KeyWords: *Aeromonas*, Aquaculture, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Lactococcus garvieae*, *Oncorhynchus mykiss*, Probiotic

2016, 49 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. Alper ÇİFTÇİ ile Doç.Dr. Ertan Emek ONUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Özge ÇAYLI ve Hatice DURGUT SAYI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

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

Esengül MORSÜMBÜL
ISPARTA, 2016

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3. 1. Probiyotik bakterilerilerin TSA'ya ekimi	15
Şekil 3. 2. Kongo kırmızısı ilave edilmiş TSA agarda hidrofobisite test sonucu	17
Şekil 3. 3. Probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları için disk difüzyon testi.	18
Şekil 4. 1. <i>L. garvieae</i> spesifik PCR	23



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2. 1. Gökkuşağı alabalıklarında potansiyel probiyotik bakteri uygulamaları	13
Çizelge 4. 1. <i>L. garvieae</i> 'ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakteri suşları	20
Çizelge 4. 2. <i>L. garvieae</i> 'ya karşı inhibitör aktivite gösteren Gram Pozitif Kokların geleneksel metotlarla ve API 20 STREP ile belirlenen fenotipik özellikleri	21
Çizelge 4.3. <i>L. garvieae</i> 'ya karşı inhibitör aktivite gösteren diğer izolatların geleneksel metotlarla ve API 20 NE ile belirlenen fenotipik özellikleri	22
Çizelge 4.4. 22 °C'de 1.5 saat için farklı pH şartlarında aday probiyotik suşlarının toleransı	24
Çizelge 4.5. 22 °C'de 1.5 saat için farklı safra konsantrasyonlarına aday probiyotik suşlarının toleransı	24
Çizelge 4. 6. Aday probiyotik bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları	25

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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



GİRİŞ

Hemorajik septisemi ile karakterize sistemik bir enfeksiyon olan Laktokokkozis özellikle su sıcaklığının 16°C üzerine çıktığı yaz aylarında etkili olmakta ve gökkuşağı alabalıklarında her boyda (porsiyonluk ve anaçlar dahil) yüksek mortaliteye neden olması sebebiyle balık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplar yaratmaktadır (Ksuda ve Salati, 1999; Austin ve Austin, 1999). Laktokokkozis ülkemizde ise ilk defa 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde görülmüş ve o tarihten itibaren ülkemizde görülme sıklığı artmıştır (Diler vd., 2002; Altun vd., 2004; Öztürk vd., 2013). Hastalığın ortaya çıktığı işletmelerde tedavi amacıyla antibakteriyelmaddelerin aşırı ve bilinçsiz kullanılmasıyla balık etinde oluşacak kalıntıproblemleri ve aynı zamanda bakterinin antibiyotiklere karşı direnç geliştirebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle hastalığın kontrolünde kullanılabilecek probiyotik bakterilerin aranması ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kemoteropatik maddelerin kullanımı ve aşılama dayalı geleneksel kontrol stratejileri bildirilmesine, antibiyotik kullanımı yaygın olarak devam etmektedir ve bu nedenle de antibiyotiklere dirençli bakterileroluşmaktadır.Aşılarla hastalıkların önlenmesi mümkün olmakla birlikte, aşılama işlemi pratik olmayıp, bağışıklık sistemi henüz tamamlanmayan yavru balıklara uygulandığında sıklıkla etkisiz olmaktadır (Lauzon vd., 2014).

Akuakültürde hastalıkların görülme sıklığını azaltmak için, antibiyotik tedavilerine alternatif olarak probiyotiklerin kullanımına ilişkin çalışmalar artmıştır (Balcázar vd., 2006). Potansiyel probiyotik suşlar farklı etki mekanizmaları ve özellikler göstermektedirler. Bu etki mekanizmaları ve özellikler arasında pH'yı düşürmek suretiyle patojenlere antagonistik etki gösterme, antibakteriyel maddeler üretme, besinler ve tutunma bölgeleri için rekabet, vitamin ve enzim üretmeleri, kolonizasyon ya da tutunma yetenekleri ve bağışıklık sistemini güçlendirme yer almaktadır (Ganguly vd., 2010; Balcázar vd., 2006; Ali, 2006; Swain vd., 2009; Merrifield vd., 2010; Aguirre-Guzmán vd., 2012).

Probiyotik suşlar, sucul hayvanların kendi mikrofloralarından ya da bulundukları ortamdan izole edilmektedir. Etkili probiyotik bakterilerin keşfedilmesi için, aday probiyotik bakteriler sıklıkla ön eleme işleminden geçirilirler (Verschuere vd., 2000).

Bu işlem, öncelikle *in vitro* antagonizm, tutunma ve bağırsak mukusunda gelişme özelliklerinin belirlenmesi ile başlamaktadır (Vershuere vd., 2000; Irianto and Austin, 2002; Vine vd., 2004).

Probiyotik mikroorganizmalar, ürettikleri bakterisidal ya da bakteristatik etki gösteren kimyasal maddelerle patojenik bakterilere karşı etki gösterirler. Genellikle antibakteriyel etki, antibiyotikler, bakteriyosinler, sidereforlar, enzimler (lizozim, proteaz), hidrojen peroksit gibi faktörler ile yada organik asit üretimi ile bağırsak pH'sının düşürülmesi ile gerçekleşir (Verschuere vd., 2000).

Hastalıkların görülme sıklığını azaltmak ve patojenik mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonları önlemek için probiyotik mikroorganizmaların kullanımına ilgi giderek artmaktadır. Önceki çalışmalarda, gökkuşağı alabalıklarında aday probiyotik bakterilerin frunkulozis, laktokokkozis, streptokokkozis ve yersiniozis hastalıklarına karşı *in vitro* olarak değerlendirilmesi yapılmıştır (Irianto and Austin 2002; Brunt ve Austin 2005; Balcazar vd., 2006; Capkin ve Altinok 2009; Didinen vd., 2014a).

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

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Laktokokkozis

Kültürü yapılan sucul türlerin sayısında uluslararası düzeyde bir artış eğilimi görülmektedir. Bu nedenle, son zamanlarda kültürü yapılan sucul türlerde karşılaşılan hastalık sayısı önemli bir artış göstermiştir. Tatlı su ve deniz balıklarını etkileyen en önemli enfeksiyöz etkenlerden bir tanesi streptokokkozis'dir. Bu hastalık sistemik seyir göstermekte ve akuakültürde ciddi ekonomik kayıplardan sorumlu tutulmaktadır. Etiyolojik olarak streptokokkozis, farklı cins ve türdeki gram pozitif koklara ait pek çok etkenin neden olduğu bir hastalık kompleksi olarak tanımlanmıştır (Ruiz-Zarzuela vd., 2005).

Klinik olarak streptokokkozis enfeksiyonları 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). *L. 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 ise 12 °C altındaki su sıcaklıklarında sadece salmonid balıklar için patojeniktir. Soğuk su streptokoklarından olan *Vagococcus salmoninarum*, salmonidler için ciddi tehditler oluşturan kronik enfeksiyonlardan sorumlu Gram pozitif bakteriler listesinde yer almaktadır (Michael vd., 1997).

Laktokokkozisin etkeni *L. garvieae*, dünyada gerek deniz balıkları gerekse tatlı su balıkları yetiştiriciliğinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Vendrell vd., 2006). Laktokokkozis, kültürü yapılan balıklarda pek çok ülkede (Amerika, Avustralya, Güney Afrika, Japonya, Kore, Tayvan, İran, İngiltere, İtalya, İspanya, İsrail, Fransa, Bulgaristan, Yunanistan, Portekiz) rapor edilmiştir (Evans vd., 2009; Carson vd., 1993; Ksuda vd., 1991; Baeck vd., 2006; Bragg and Broere, 1986; Chang vd., 2002; Soltani vd., 2008; Bark ve McGregor 2001; Eldar vd., 1996; Vela vd., 2000; Eyngor vd., 2004; Savvidis vd., 2007; Pereira vd., 2004). Streptokok/laktokoklardan kaynaklanan enfeksiyonlar genellikle yüksek morbidite

ve mortaliteye neden olmaktadır (Austin ve Austin, 2007). Gökkuşuğu alabalıklarının toplam üretiminde laktokokkozisden kaynaklanan kayıplar yaklaşık olarak %50-80 civarındadır (Vendrell vd., 2006). Hastalık, Türkiye’de gökkuşuğu alabalığı işletmelerinde 2001 yılından beri görülmektedir (Diler vd., 2002; Çağırğan, 2004; Kav vd., 2008; Ozer vd., 2008; Avcı vd., 2010; Tanrıkul and Gultepe, 2011; Altun vd., 2012). Laktokokkozis, özellikle yaz aylarında tekrarlayan salgınlar şeklinde görülmektedir. Bu nedenle *L. garvieae* Türkiye’de gökkuşuğu alabalığı endüstrisinde en önemli patojenlerden biridir (Altun vd., 2012).

L. garvieae, yetiştiriciliği yapılan alabalıklarda hemorajik sepsis, enteritis, asites, hemoraji ile birlikte çift taraflı ekzoftalmus, deri renginde siyahlaşma, bağırsak, karaciğer, böbrek, dalak ve beyinde konjesyona neden olmaktadır (Domenech vd., 1993; Salati vd., 1996; Diler vd., 2002). Enfekte balıklarda hastalığa ait patolojik bulgular epikarditis, peritonitis, enteritis, meningitis ve panoftalmittir (Eldar vd., 1999; Chang vd., 2002; Chen vd., 2002; Avcı et al, 2010; Didinen vd., 2014a).

L. garvieae’nin teşhisi geleneksel mikrobiyolojik metotlar ve API teşhis kitleriyle gerçekleştirilebilmektedir. (Carson vd., 1993; Altun vd., 2005). *L. garvieae* suşlarının PCR tekniği ile teşhisi başarılı bir şekilde yapılmaktadır (Zlotkin vd., 1998; Eldar vd., 1999; Altun vd., 2004; Soltani vd., 2008; Sharifiyazdi vd., 2010; Altun vd., 2012).

L.garvieae’nin neden olduğu hastalık salgınları antibiyotik ile tedavi edilebilmektedir. Ancak, bunlar etkisiz kalabilmekte ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı antibiyotik direncinin artmasına yol açmaktadır (Romalde ve Toranzo 2002; Vendrell vd., 2006). Türkiye’de gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının gentamisin, neomisin, linkomisin, oksitetrasiklin, eritromisin, amoksisillin ve florfenikole direnç gösterdikleri bildirilmiştir (Altun vd., 2012).

2.2. Akuakültürde Probiyotiklerin Rolü

2.2.1. Probiyotikler: tanım ve prensipleri

Probiyotikler, konağın intestinal mikroflorasının gelişimini teşvik eden, tüketilmeleri sonucunda sindirim sisteminde yararlı etkileri ile konağın sağlığında iyileşmeye ve hızlı büyümeye neden olan tek veya karışık canlı mikroorganizma kültürleri veya

bunların metabolitleri olarak tanımlanmaktadır (Gomez-Gil vd., 2000; Vine vd., 2006). Probiyotikler konakçıya yararlı yem katkı maddeleri olarak da tanımlanmaktadır (Wang, 2007).

Laktik asit bakterileri, karasal hayvanların beslenmesinde en yaygın olarak kullanılan probiyotikler olduğu için, sucul türler için de probiyotik olarak kullanılması önerilmektedir (Gatesoupe, 1991; Ringo ve Gatesoupe, 1998). Laktik asit bakterileri probiyotik olarak pek çok potansiyele sahiptirler; gelişimi uyarabilirler, zararlı bakterilerle rekabet edebilirler ve organizmanın doğal bağışıklık mekanizmasını güçlendirebilirler (Vandenberg, 1993; Villamil vd., 2002). Sucul türler üzerindeki etkileri değerlendirilen suşlar genellikle *L. acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Carnobacterium divergens*, *Lactococcus lactis* ve *Pediococcus acidilactici*'dir (Casteks, 2008). Yaygın olarak kullanılan diğer probiyotikler, spor üreten *Bacillus* spp. ve mayalardır. *Bacillus* spp.'lerin tutunma yetenekleri, bakteriyosin (antimikrobiyal peptitler) üretimi ve bağışıklık sisitemini uyarıcı etkileri kanıtlanmıştır. Bu suşların etkili probiyotikler oldukları açıktır. Bu suşları içeren ticari ürünlerin, karides üretiminde antibiyotik kullanımına benzer seviyede, artışa neden oldukları ortaya konmuştur. Spor formunda oldukları için raf ömürleri de uzundur. *Saccharomyces cerevisiae* de yaygın olarak kullanılan bağışıklık sistemini uyarıcı etkisi kanıtlanan, inhibitör maddeler ürettiği görülmüş bir maya türüdür (Kesarcodi-Watson, 2008).

2.2.2. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotik suşların, patojen bakterileri hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullardafarklı mekanizmalarla inhibe ettikleri gösterilmiştir. Son yıllarda probiyotiklerle ilgili çeşitli araştırmalar olmakla birlikte hayvan çalışmalarında etik koşullar ve metotla ilgili sınırlamaların olması probiyotiklerin etki mekanizmasının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Balcazar vd., 2006).

Probiyotiklerin etki mekanizmaları ve yararlı etkileri olarak şunlar bildirilmiştir;

-Patojenik bakterilerle rekabet

-Besin kaynağı olma, yemin değerini artırma ve sindirime enzimatik katkıda bulunma.

- Gelişimi arttırma

-Bakteriler tarafından çözünmüş organik materyelin doğrudan alınması ile su kalitesini artırma

-Patojenik mikroorganizmalara karşı bağışıklık reaksiyonunun gelişmesi

-Antiviral etkiler

-Antimutajenik ve antikarsijonik aktivite (Balcazar Vd., 2006; Wang, 2007).

2.2.2.1. Rekabet etkisi

Probiyotiklerin sucul hayvanlara etki mekanizmaları konusundaki çalışmalar daha çok inhibitör madde üretimi üzerinde gerçekleştirilmiştir (Kesarcodi-Watson vd., 2008). Bakteriyel antagonizma doğada yaygın bir olaydır. Mikrobiyal etkileşimler, potansiyel patojen mikroorganizmalar ve rekabetçi faydalı organizmalar arasındaki dengede asıl rolü oynarlar. Yine de mikrobiyal toplulukların kompozisyonu yetiştiricilik uygulamaları ve çevre koşullarıyla değişebilir ki, bu da seçilmiş bakteriyel suşların çoğalmasını uyarır. Bilindiği gibi sucul hayvanların sindirim kanalındaki mikrobiota değiştirilebilir. Bu nedenle mikrobiyal manipülasyon, fırsatçı patojenlerin azaltılması ya da elemine edilmesinde uygun bir yoldur (Balcazar, 2002). *Vibrio* türlerine karşı inhibitör etki gösteren deniz suyundan izole bakterinin varlığı ilk defa 19. yy'da bildirilmiştir. Daha sonra 1947 yılında yapılan bir çalışmada, antibiyotik üreten deniz mikroorganizmaları tanımlanmış ve biyolojik kontrol ajanları konusundaki araştırmalar başlamıştır (Balcazar vd., 2006). Akuakültürde *Thalassobacter utilis*'in *V. anguillarum*'a karşı inhibitör etkisi gösterilmiştir. Bu suş, yengeç larvalarının (*Portunus trituberculatus*) yaşama oranlarını artırmış ve larvaların yetiştirildiği sudaki *Vibrio* sp. miktarını azaltmıştır (Nogami ve Madea, 1992; Nogami vd., 1997). Daha sonra OLSSON vd. (1992), tarafından ergin *Scophthalmus maximus* ve *Limanda limanda*'ların bağırsak ve deri mukusundaki bakteriyel suşların *Vibrio anguillarum*'un üzerinde baskılayıcı etki yaptığı bildirilmiştir (Balcazar vd., 2006). Ekvator'da, *Litopenaeus vannamei* (beyaz karides)'nin post larva döneminde *V. alginolyticus* suşunun probiyotik olarak kullanılması ile büyüme ve yaşama oranını artırdığı saptanmıştır (Garriquesve Arevalo, 1995).

Enerji kaynakları için rekabet yoluyla oluşan probiyotik etki ile ilgili pek çok çalışma vardır. Bu etki hücre dışı ürünlerle gerçekleşmez, canlı bakteriyel hücrelere ihtiyaç vardır. Demir için rekabet deniz bakterilerinde önemli bir faktör olarak rapor edilmiştir. Demir çoğu bakterinin gelişiminde gereklidir ve hayvanların dokularında ve vücut sıvılarında çözülmeyen ferik Fe^{+3} formunda genellikle sınırlı miktarda bulunmaktadır. Demir bağlayan maddeler, sideroforlar, mikrobiyal gelişim için uygun demirin sağlanmasına izin verir. Probiyotiklerin siderofor üretimi, sınırlı demir şartları altında patojen bakterileri demirden mahrum bırakır. Sınırlı demir şartlarında gelişen *Pseudomonas fluorescens*'in kültür supernatantının *V. anguillarum*'un gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Kesarcodi-Watson vd., 2008)

Etki mekanizmasında geniş olarak yer alan bir diğer kavram, tutunma bölgeleri için rekabettir. Bu konuyla ilgili yapılan çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Vine vd.(2004), 5 adet probiyotiğin, balık bağırsağıdaki iki patojen bakteri ile rekabetini göstermişlerdir. Probiyotiklerden birinin varlığı, patojenlerden birinin mukusa tutunmasını engellediği belirlenmiştir. Diğer probiyotiklerin önceden kolonize olması, iki patojenin tutunmasını zorlaştırmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada uygulama sonrası, probiyotikler patojenlerle yer değiştirdiği belirlenmiştir.

2.2.2.2. Besin kaynağı ve sindirime enzimatik destek

Bazı araştırmacılar, mikroorganizmaların sucul canlılardakisindirim işlemine yardımcı olduğunu bildirmektedirler. Balıklarda *Bacteroides* ve *Clostridium* sp.'nin, konakçının beslenmesini özellikle vitaminler ve yağ asitleri sağlama yoluyla destekledikleri rapor edilmiştir (Sakata, 1990). *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp. ve *Staphylococcus* sp. gibi bazı mikroorganizmalar *Salvelinus alpinus*'larda gerçekleşen besinsel işlemleri destekleyebilmektedir (Ringo vd.,1995). Ayrıca bazı bakteriler ekstrasellüler enzimler (proteaz, lipaz vb) ve hatta gerekli büyüme faktörleri üreterek çift kabukluların sindirim işlemine yardımcı olurlar. Benzeri bulgular olgun karideslerin mikrobiyal florası için de bildirilmiştir. Mikrobiyota, yemlerde ek kaynak olarak görev alabilir ve sindirim kanalındaki mikrobiyal aktivite, vitamin ve esansiyel aminoasit kaynağı olabilir (Balcazar vd., 2006).

Bairagi vd. (2002), 9 adet tatlı su balığının bağırsaklarından izole ettikleri seçilmiş bakteriyel suşların sindirim enzimleri ürettiklerini ve böylece yemden yararlanmayı

ve sindirimi kolaylaştırdıklarını saptamışlardır. Ramirez ve Dixon (2003), 3 balık türünden izole ettikleri anaerobik bağırsak bakterilerinin enzimatik özelliklerini ortaya koymuşlar ve potansiyel probiyotik olarak rol oynayabileceklerini ifade etmişlerdir. Bairagivd. (2004) *B. subtilis* ve *B. circulans*'ın *Labeo rohita*'ların yemlerine ilavesinin yararlarını göstermiştir. Bu iki bakterinin yeme ilavesi gelişim, yem dönüşüm oranı, protein etkinlik oranı gibi faktörleri etkileyerek performansı artırmıştır. Bakteriler bu gelişimi, selülozu ve nişastayı hidrolize edebilen hücre dışı selülozik ve amilolitik enzim üretmeleri ile sağlamışlardır (Kesarcodi-Watson vd., 2008)

2.2.2.3. Su kalitesi üzerindeki etki

Kültürü yapılan sucul organizmalar gelişimlerinin başlangıç safhalarında tükettikleri yem miktarı az olduğu için su kalitesinde önemli problemler yaşanmamaktadır. Fakat canlı büyüdükçe, biomasın hızlı bir şekilde artması ile su kalitesinde bozulmalar görülmektedir. Bunun başlıca nedenleri, suda organizmaların metabolik atıklarının birikimi, yem atıklarının bozulması ve biyolojik materyallerin çözülmesidir (Farzanfar, 2006).

Probiyotiklerin sucul çevredeki etkilerini anlamak için pek çok çalışma yapılmıştır. Bir grup yararlı mikroorganizmanın (*Lactobacillus*, *Bacillus*, *Nitrosomonas*, *Cellulomonas*, *Nitrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas* ve *Acinetobacter*) suda organik yükün mineralizasyonuna yardımcı olarak, su kalitesi ve patojen mikroorganizmaların kontrol için yararlı olabilecekleri ifade edilmektedir (Prabhu vd., 1999; Shariff vd., 2001; Irianto ve Austin, 2002).

Su kalitesinin düzeltilmesinde, özellikle *Bacillus* türleri kullanılmaktadır. Gram pozitif bakteriler, organik maddeyi CO₂'ye, Gram negatif bakterilerden daha iyi dönüştürürler. Üretim döngüsü sırasında yüksek seviyedeki Gram pozitif bakteriler, çözünmüş ve partiküler organik karbonu minimize edebilirler. *Bacillus sp.*'nin kullanılmasının su kalitesini iyileştirdiği ve *Penaeus monodon* juvenillerinin sağlık durumlarını büyüme ve yaşama oranlarını artırdığı ve patojenik *Vibrio* türlerini azalttığı bildirilmiştir (Balcazar vd., 2006).

Bacillus türleri, yetiştiriciliğin yapıldığı çevredeki yani su ortamındaki patojenlerin sayısını azaltarak ve sudaki mikrobiyal popülasyonun kompozisyonunu etkileyerek

su kalitesini iyileştirmektedir. Bu nedenle *Bacillus* türlerinin, sucul ortamdaki potansiyel patojenlere karşı antagonistik etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Irianto ve Austin, 2002).

2.2.2.4. Bağışıklık reaksiyonunun artması

Spesifik olmayan bağışıklık sistemi, probiyotiklerle uyarılabilir. *Clostridium butyricum* bakterisinin gökkuşağı alabalığına verilmesi, balığın vibriosise karşı direncini geliştirmiştir. Bu gelişim, lökositlerin fagositik aktivitesinin artmasıyla sağlanmıştır. Yapılan bir araştırmada *Bacillus* sp.'nin kullanılmasının *P.monodon*'da hem humoral bağışıklık savunmasını, hem de hücrel aktivasyon yoluyla hastalıklardan korunmayı sağlamıştır. *Bacillus* ve *Vibrio* sp. suşlarının birlikte kullanılması da beyaz karides yavrularının büyüme ve yaşama oranlarını etkilemiştir. Beyaz benek sendromu virüsü ve *V. harvei* patojenlerine karşı koruyucu etkileri bulunmuştur. Bu koruyucu etki, fagositozis ve antimikrobiyal etkinin artmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca *L. rhamnosus*'un 10^5 kob/gr dozunda yeme uygulanmasıyla gökkuşağı alabalıklarında fagositlerin oksidatif yolla öldürme mekanizmalarını uyardığı bildirilmektedir (Balcazar vd., 2006).

2.2.2.5. Antiviral etkiler

Yapılan araştırmalarda salmonid balıkların kuluçkahanelerinden izole edilen *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp. ve Coryneform grup bakterilerin İnfeksiyöz hematopoietik nekrozis virüsüne karşı antiviral etki sağladığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, bir siyah kaplan karidesi kuluçkahanesinden izole edilen iki farklı *Vibrio* suşunun, IHNV ve OMV (*Oncorhynchus masou* virüsü)'ye karşı etkileri belirlenmiştir (Balcazar vd., 2006).

2.2.3. Kolonizasyon

Kolonizasyon, bakterinin mukozal yüzeye tutunmasıyla başlar. Bunu, mukus içine girmesi veya epitel hücrelerine tutunması izler. Mukozal yüzeylere tutunma ve kolonizasyon ile patojenlere karşı oluşan koruyucu mekanizma, besin ve bağlanma yeri için rekabet yada bağışıklığı harekete geçirme şeklindedir (Westerdahl vd., 1991; Salminen vd., 1998).

Yapılan bir çalışmada beyaz karides yavrularının hepatopankreasına *Vibrio* sp.'nin normal koşullarda yerleştiği, bununla birlikte bu normal mikrofloranın, suya yapay olarak 20 gün boyunca *Bacillus* sp.'nin ilave edilmesi ile dominant hale geldiği tespit edilmiştir (Gullian ve Rodríguez, 2002).

Mikroorganizmaların kolonizasyonunu etkileyen faktörler;

1. Konakçı ile ilgili faktörler; vücut sıcaklığı, redoks potansiyel seviyesi, enzimler ve genetik dirençdir. Bakteriler su ya da yem partikülleriyle ağız yoluyla girip doğrudan sindirim kanalına geçerler ve bazıları orada floranın bir parçası olurlar. Diğer kısım bakteriler ise sindirim işlemiyle tahrip olurlar ya da feçesle dışarı atılırlar. Bunun yanında, bakteriyel gelişim, konakçı tarafından üretilen herhangi bir antimikrobiyal bileşik tarafından da durdurulabilir.

2. Mikroorganizma ile ilgili faktörler, mikroorganizmanın antagonistik etkileridir (proteaz, bakteriyosinler, lizozim, hidrojen peroksit, amonyak oluşumu, organik asit üretimi ile pH'nın değişimi). Örneğin laktik asit bakterileri bakteriyosin üretimi ile diğer mikroorganizmaları inhibe etmektedirler (Dopazo vd., 1988; Gram vd., 1999; Sugita vd., 2002; Gullian vd., 2004).

2.2.4. Probiyotiklerin seçimi

Probiyotiklerin seçimindeki en yaygın yol, *in vitro* antagonizm testidir. Bu testte patojenler, aday probiyotiklere ya da onların sıvı ortamdaki hücre dışı ürünlerine maruz bırakılır. Bununla birlikte bu testler, *in vivo* etkinin tahmininde kullanılamaz. Örneğin, *P. fleuroscens*'in *A. salmonicida*'ya karşı *in vitro* olarak antagonistik etkisi onun frunkulozise karşı Atlantik salmonlarını korumada etkili olmamıştır. Bu nedenle, probiyotiğin orjini, güvenilirliği ve suşların sindirim kanalında yaşayabilme yetenekleri (safra tuzlarına, düşük pH ve proteazlara direnci) önemlidir. Mikroorganizmaların kolonize olma yeteneği, potansiyel probiyotik değeri bakımından asıl seçim kriteridir. Bağırsak epitel hücrelerine etkili bir şekilde tutunma özelliği, patojenlerin yerleşmesini önleme bakımından önemlidir. Sonuç olarak probiyotik bakteri seçim metodlarında akuakültürdeki kullanımı için;

1. Geçmişe yönelik bilgilerin toplanması
2. Potansiyel probiyotiğin kazanılması

3. Potansiyel probiyotiklerin patojen suşlarla rekabete girerek elemine etmelerinin sağlanması
4. Potansiyel probiyotiklerin patojenitesinin belirlenmesi
5. Konakçıdaki potansiyel probiyotiklerin etkisinin değerlendirilmesi.
6. Ekonomik kar/zarar analizi ortaya konması gereklidir(Balcazar vd., 2006).

2.2.4.1. Probiyotik bakteri seçiminde kullanılan metotlar

Potansiyel probiyotiklerin aranmasında çalışmaların çoğu laboratuvar ortamında inhibitör aktivitenin test edilmesini kapsamaktadır. Tüm metotlar, bir bakterinin ürettiği hücre dışı maddenin kendisine ve diğer bakterilere (indikatör) karşı oluşturduğu inhibitör etkinin araştırılması prensibine dayalıdır. İnhibitör aktivite, katı besiyerinde indikatör bakterilerin gelişiminin engellenmesi yoluyla görülür (Kesarcodi-Watson vd., 2008).

Bu tarama metotlarıyla, akuakültürde çok iyi probiyotikler bulunmuştur. Bu çalışmalarda sınırlayıcı iki faktör vardır. Birincisi, probiyotiklerin etki mekanizmalarının diğer şekilleri (örneğin, bağışıklık sisteminin uyarılması, sindirim enzimlerinin üretimi, tutunma bölgesi ya da besinler için rekabet) laboratuvarda agar kullanımı ile incelenememektedir. Diğer dezavantaj, laboratuvarda pozitif olarak alınan sonuçların canlı üzerinde etkilerinin belirlenmesindeki başarısızlıktır. Probiyotik bakteri *in vitro* koşullarda antagonistik etkiye sahip olduğu halde, canlı üzerinde koruyucu bir etki göstermeyebilir yada bazı ticari ürünler *in vitro* olarak etkili olmayıp, canlı üzerinde olumlu etkileri (hayatta kalmayı artırma gibi) de gözlemlenebilir (Kesarcodi-Watson vd., 2008).

Bir probiyotiğin bulundurması gereken özellikler;

1. Konakçıya zararlı olmamalı,
2. Konakçı tarafından kabul edilmeli (yutulması, kolonizasyonu ve konakçı içinde çoğalması),
3. Etkili olacağı bölgeye ulaşabilmeli,
4. *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gerçek anlamda çalıştığı kanıtlanmalı,
5. Virülens direnç genleri ya da antibiyotik direnç genleri içermemelidir (Kesarcodi-Watson vd., 2008).

2.2. Gökkuşığı Alabalıklarında Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Kullanımına İlişkin Çalışmalar

Probiyotik kullanımı, hastalıkların yönetiminde patojenik bakterilerle rekabet edebilen ve çevreyle daha dost bir yaklaşım olarak görülmektedir. Gökkuşığı alabalıklarında farklı probiyotik bakteriler, önemli bakteriyel patojenler (*F. pschyrophilum*, *L. garvieae*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri*) için test edilmiştir.

Probiyotiklerin bakteriyel hastalıkları önlemedeki en yaygın mekanizmaları olarak inhibitör maddelerin üretimi, besin ya da tutunma bölgeleri için rekabet, konakçının bağışıklık sisteminin uyarılması gösterilmektedir. Gökkuşığı alabalıklarında *Leunocostoc mesenteroides*'in uygulanmasından sonra *A. salmonicida* ve *L. garvieae*'ye karşı besin maddeleri için rekabet ve tutunma reseptörleri yoluyla koruma sağlanabilmiştir (Balcazar vd., 2007b; Vendrell vd., 2008). Mukozal yüzeylere kolonize olma yeteneği potansiyel probiyotiklerin seçiminde önemli bir kriterdir (Balcazar vd., 2006; Vine vd., 2006). *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremonis* ve *L. sakei*, *A. salmonicida* ve *Y. ruckeri*'nin gökkuşığı alabalığının bağırsak mukusuna tutunmalarını azaltmışlardır (Balcazar vd., 2007a). Brunt vd. (2007) *A. sobria* GC2 ve *B. subtilis* JB-1'in *A. salmonicida*, *L. garvieae*, *S. iniae*, *V. anguillarum*, *V. ordalli* ve *Y. ruckeri*'ye karşı koruma sağladıklarını ve bu korumanın beslenme, inhibitör madde üretimi ve spesifik olmayan bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 2. 1. Gökkuşuğı alabalıklarında potansiyel probiyotik bakteri uygulamaları
(Lauzon vd., 2014)

Potansiyel probiyotik	Araştırılan parametreler
<i>L. lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. sakei</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki
<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i>	Hastalık direnci, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, gelişim performansı
<i>L. rhamnosus</i>	Hastalık direnci, gelişim performansı
<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>E. faecium</i>	Patojen antagonizmi
<i>L. rhamnosus</i>	Bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, bağışıklık cevabı
<i>L. rhamnosus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecium</i>	Bağışıklık cevabı
<i>L. plantarum</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>L. casei</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki
<i>E. faecalis</i>	Vücut kompozisyonu, hastalık direnci, gelişim performansı, bağışıklık cevabı
<i>B. subtilis</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>B. subtilis</i> + <i>B. licheniformis</i>	Vücut kompozisyonu, yemden yararlanma, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, gelişim performansı
<i>B. subtilis</i> + <i>B. Licheniformis</i> + <i>E. faecium</i>	Vücut kompozisyonu, yemden yararlanma, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, gelişim performansı, bağışıklık cevabı
<i>B. subtilis</i> + <i>B. Licheniformis</i> + <i>E. Faecium</i> + <i>P. acidilactici</i>	Bağırsak histolojisi, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki
<i>Bacillus</i> sp., <i>A. sobria</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>Bacillus</i> sp., <i>A. sobria</i>	Bağışıklık cevabı
<i>P. acidilactici</i>	Vücut kompozisyonu, yemden yararlanma, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, gelişim performansı, bağışıklık cevabı
<i>P. acidilactici</i>	Hastalık direnci, bağırsak histolojisi, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki
<i>P. acidilactici</i>	Bağırsak histolojisi, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, bağışıklık cevabı
<i>P. acidilactici</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Vücut kompozisyonu, yemden yararlanma, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, gelişim performansı, iskelet bozukluğu üzerindeki etki
<i>P. acidilactici</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>C. divergens</i> , <i>C. maltaromaticm</i>	bağışıklık cevabı
<i>C. inhibens</i>	Hastalık direnci, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki

<i>A. sobria</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>A. sobria</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>A. sobria</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı, patojen antagonizmi/rekabet
<i>A. sobria</i> + <i>B. subtilis</i>	Hastalık direnci
<i>A. hydrophila</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>Carnobacterium</i> spp, Gr pozitif koklar	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki
<i>Ps. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas</i> suşları, <i>Carnobacterium</i> suşları	Hastalık direnci, patojen antagonizmi/rekabet
<i>Ps. fluorescens</i>	Hastalık direnci, patojen antagonizmi/rekabet
<i>Pseudomonas</i> M174	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı, patojen antagonizmi/rekabet
<i>Pseudomonas</i> M162	Hastalık direnci, bağırsak mikroflorası üzerindeki etki, bağışıklık cevabı, patojen antagonizmi/rekabet
<i>Pseudomonas</i> MSB1	Patojen antagonizmi/rekabet
<i>Kocuria</i> sp. SM1	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>B. mojavensis</i>	Hastalık direnci, bağışıklık cevabı
<i>E. amnigenus</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>A. sobria</i> , <i>A. caviae</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> , <i>Staphylococcus equorum</i>	Patojen antagonizmi/rekabet

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında materyal olarak kullanılan 20 adet sağlıklı gökkuşağı alabalığı (ort.250 g) Isparta ili sınırları içerisindeki iki işletmeden temin edildi. Çalışma süresince, bakteriyolojik incelemeler Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1.Potansiyel probiyotik bakterilerin izolasyonu

Çalışmada *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etki gösteren aday probiyotik bakterilerin seçimi yapıldı. Bu amaçla antagonistik etki gösterebilecek aday probiyotik bakterilerin izolasyonu sağlıklı 20 adet gökkuşağı alabalıkların (ort. 250g) bağırsaklarından yapıldı. Bunun için bağırsaklar steril şartlar altında kesilip Steril Peptonlu Su ile homojenize edildikten sonra seri dilüsyonları (10^{-1} - 10^{-8}) hazırlandı ve Triptik Soy Agar (TSA)'a ekimler yapılarak 22°C'de 48 saat inkübe edildi (Balcazar vd., 2007a)(Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. Probiyotik bakterilerin izolasyonunda kullanılan TSA besiyerleri

3.2.2. *L. garvieae*'ya karşı *in vitro* antagonistik etkinin belirlenmesi

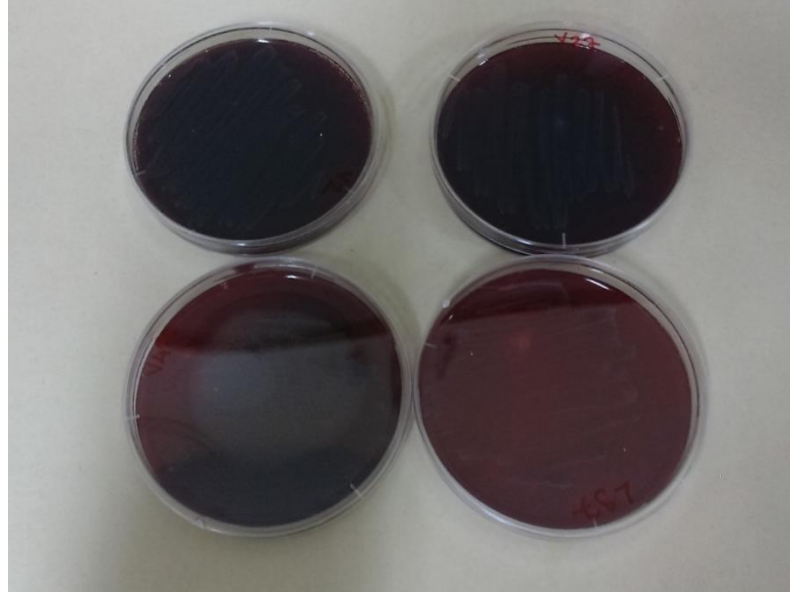
Balıkların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanıldı.

Bu amaçla;

1. TSA'da üretilmiş bakteriler Triptik Soy Broth (TSB)'a alınarak, 25°C'de 48 saatlik bakteri kültürleri elde edildi.
2. *L. garvieae* suşu TSB'ye ekilerek 25°C'de 24 saatlik bakteri kültürü elde edildi.
3. *L. garvieae* suşunun kültüründen 100µl alınarak, döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş 100ml TSA'ya ilave edildi ve bakterinin besiyerinde homojen bir şekilde dağılımı için karıştırıldı.
4. Patojen bakterinin ilave edildiği besiyerlerinin dökümü yapıldıktan sonra 15 dk beklendi ve besiyeri üzerinde steril durhaym tüpleri kullanılarak yaklaşık 3mm çapında çukurlar açıldı.
5. Besiyerleri üzerinde 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 zonlarının ölçümü yapıldı (Hjelm vd., 2004).

3.2.3. Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisiteleri

Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitelerini belirlemek için %0.03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış TSA hazırlandı. Kongo kırmızısı TSA'nın sterilizasyonundan sonra eklendi. Aday probiyotik bakteriler Kongo kırmızısı ilave edilen TSA'ya ekildi ve 25 ° C'de 24 saat inkübe edildi. Kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik) ve beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak değerlendirildi (Sharma vd., 2006)(Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kongo kırmızısı ilave edilmiş TSA’da hidrofobisite test sonucu

3.2.4. Aday probiyotik bakterilerin safra ve pH toleranslarının belirlenmesi

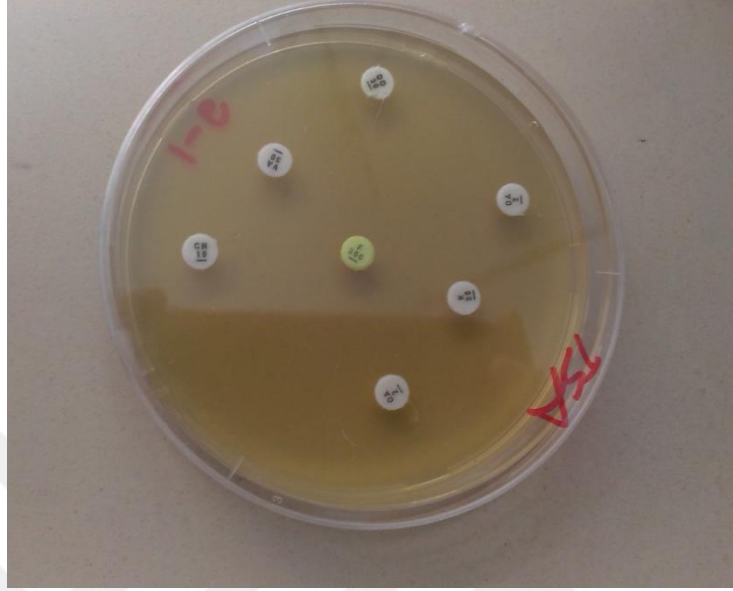
Aday probiyotik bakterilerin PBS içerisindeki süspansiyonları 10^7 kob/ml olarak hazırlandı. Gökkuşáğı alabalıklarından safra kesesinin patlatılmasıyla safra örnekleri toplandı ve kullanılıncaya kadar -20°C ’de saklandı. Bakteriyel süspansiyon, % 0.6-1.5 safra içeren steril PBS ve steril PBS (kontrol) içerisine inoküle edildi. Örnekler 22°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°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), doksisisiklin (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 inkübasyon süresi sonunda inhibisyon çapları ölçüldü.



Şekil 3. 3. Probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları için disk difüzyon testi

3.2.6. Aday probiyotik bakterilerin fenotipik karakterizasyonları

Tüm antagonistik özellik gösteren suşların ilk olarak koloni morfolojileri belirlendi. Daha sonragram boyama, hareket, sitokrom oksidaz, katalaz üretimi ve O/F testleri yapılmıştır. Şuşların diğer fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde API 20 Strep ve API 20 NE hızlı teşhis kitleri (bioMe’rieux) kullanıldı.

3.2.7. Aday probiyotik bakterilerin moleküler analizi

3.2.7.1. *L. garvieae* spesifik PCR

İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon sistemine dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, GeneJET Genomic DNA Purifikasyon Kiti) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır. *L. garvieae*’nın moleküler identifikasyonu tür spesifik pLG-1 (5’-CATAACAATGAGAATCGC-3’) ve pLG-2 (5’-GCACCCTCGCGGGTTG-3’) oligonukleotid primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile gerçekleştirildi (Zlotkin vd., 1998). Bu amaçla PCR amplifikasyonunda DEPC’li su, 1xPCR solüsyonu, 1.5mM MgCl₂, herbir dNTP’den 0.2 mM, 1.0 U Taq polimeraz(Fermentas), 1 μM

herbir primer ve 5 µl hedefDNA içeren 25 µl PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım Thermo PxE termal çevirici (Thermo Scientific) içerisinde 94°C'de 3 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanması, 72°C'de 1.5 dk uzama olmak üzere 35 siklus ve 72°C'de 10 dk sonuzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. PCR amplifikasyonsonrası oluşan ürünler etidium bromid (2mg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Sonuçta *L. garvieae* spesifik 1100 bp'lik amplifikasyon ürününün görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. PCR çalışmasında pozitif kontrol olarak *L. garvieae* ATCC 43921 suşu, negatif kontrol olarak ta distile su kullanıldı.

3.2.7.2. 16S rRNA sekans analizi

L. garvieae spesifik PCR ile identifiye edilemeyen izolatların 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi Macrogen (Seoul, Kore) firmasının 16S rRNA tam sekanslama servisi tarafından Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer kullanılarak gerçekleştirildi. Özetle, izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesi 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) ve 1492R (TACGGYTACCTTGTACGACTT) universal primerlerinin kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra 785F (GGATTAGATACCCTGGTA) ve 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) primerleri kullanılarak sekans analizi gerçekleştirildi. 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 dereceleri karşılaştırılırken Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve önem düzeyi P=0,05 olarak seçildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. *L. garvieae*'ya Karşı İnhibitör Aktivite Gösteren Bakteriler

Gökkuşaağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen 157 bakteriyel suştan 4 adedinin *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösterdiği saptandı (Çizelge4.1.)

Çizelge 4. 1. *L. garvieae* 'ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakteriyel izolatlar

İzolatlar	İnhibisyon zonu (mm)
TUB/2013/L32	16
TUB/2013/L95	8
TUB/2013/L97	8
TUB/2013/L63	8

4.2. Aday Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonları

L. garvieae' ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakterilerin geleneksel metotlarla, API 20 Strep ve API 20 NE hızlı teşhis kitleriyle belirlenen belirlenen fenotipik özellikleri Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. *L. garvieae*’ ya karşı inhibitör aktivite gösteren Gram Pozitif Kokların geleneksel metotlarla ve API 20 STREP ile belirlenen fenotipik özellikleri

	TUB/2013/L32	TUB/2013/L95
Gram boyama	Pozitifkok	pozitifkok
Hareket	-	-
Oksidaz	-	-
Katalaz	-	-
O/F Testi	F	F
VP	+	+
Hippurat hidrolizi	-	-
Eskulin hidrolizi	+	+
Piyrrolidonil arylamidaz	+	+
α-Galaktosidaz	-	-
β-Glukuronidaz	-	-
β-Galaktosidaz	-	-
Alkalın fosfataz	-	-
Lösin arilamidaz	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+
Asit üretimi:		
Riboz	+	+
L-Arabinoz	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Laktoz	-	-
Trehaloz	+	+
İnülin	-	-
Rafinoz	-	-
Nişasta	+	+
Glikojen	-	-

Çizelge 4.3. *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösteren diğer izolatların geleneksel metotlarla ve API 20 NE ile belirlenen fenotipik özellikleri

	TUB/2013/L63	TUB/2013/L97
Gram boyama	Negative basil	Pozitif basil
Hareket	+	-
Oksidaz	+	-
Katalaz	+	+
O/F Testi	F	Glikozu kullanmıyor
Nitrate indirgeme	+	-
İndol üretimi	+	-
Glikoz asidifikasyon	+	-
Arjinin dihidrolaz	+	+
Üre hidrolizi	-	-
Eskülin hidrolizi	+	+
Jelatin hidrolizi	+	-
β- galaktosidaz	+	+
Glikoz asimilasyonu	+	-
Arabinoz asimilasyonu	+	-
Mannoz asimilasyonu	+	-
Mannitol asimilasyonu	+	-
N-Acetyl Glusomine	+	-
Maltose Glusomine asimilasyonu	+	-
Gluconate Glusomine asimilasyonu	+	+
Caprate Glusomine asimilasyonu	-	-
Adipate Glusomine asimilasyonu	-	-
Malate Glusomine asimilasyonu	+	-
Citrate Glusomine asimilasyonu	+	-
Phenyl acetate Glusomine asimilasyonu	-	-

4.3. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler Analizi

L. garvieae spesifik PCR analizi sonucu TUB/2013/L32 ve TUB/2013/L95 no'lu izolatların *L. garvieae* spesifik 1100 bp amplifikasyon ürünü verdiği, TUB/2013/L63 ve TUB/2013/L97 no'lu izolatların ise herhangi bir amplifikasyon ürünü vermediği saptandı (Şekil 4.3.). Dolayısıyla TUB/2013/L32 ve TUB/2013/L95 no'lu izolatlar *L. garvieae* olarak tanımlendi. TUB/2013/L63 ve TUB/2013/L97no'lu izolatlar için sonraki aşamada gerçekleştirilen 16S rRNA gen bölgesi sekans analizi sonucu sırasıyla 1481 ve 590 bp uzunluğunda sekans dizileri elde edildi ve bu diziler GenBank'a (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) KT456272 ve KT456273 erişim numaraları ile kaydedildi. Elde edilen morfolojik, biyokimyasal ve sekans verilerine dayanılarak TUB/2013/L63 no'lu izolat *A. sobria*, TUB/2013/L97no'lu izolat ise *Bacillus* sp. olarak tanımlendi.



Şekil 4. 1. *L. garvieae* spesifik PCR (1100 bp). M; Moleküler Belirteç (100 bp Plus DNA Ladder), 1; *L. garvieae* ATCC 43921, 2; Negatif Kontrol (Distile su), 3; TUB/2013/L32, 4; TUB/2013/L63, 5; TUB/2013/L95, 6; TUB/2013/L97.

4.4. Bakteri Suşlarının Hidrofobisite, pH ve Safra Toleransları ve Antibiyotik Duyarlılıkları

L. garvieae (TUB/2013/L95) hariç, antagonistik suşlar Kongo kırmızısı ilave edilmiş TSA’da kırmızı renkte koloniler oluşturdular. Bu sonuç, diğer suşların hidrofobik özellikte, başka bir deyişle non spesifik olarak konakçının bağırsak epiteline tutunma kabiliyetlerinin olduğunu gösterdi.

Antagonistik suşların düşük pH şartlarına dirençli oldukları görüldü (Çizelge 4.4.) ($p>0.05$).

Çizelge 4. 4. 22 °C’de 1.5 saat için farklı pH şartlarında aday probiyotik suşların toleransı (log kob/ml, SD*)

pH	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/L32	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/L95	<i>Bacillus</i> sp. TUB/2013/L97	<i>A.sobria</i> TUB/2013/L63
7	7,59±0,65	7,58±0,26	7,39±0,45	7,63±0,56
3	7,76±0,47	7,8±0,40	7,65±0,28	7,79±0,49
2	7,82±0,34	7,86±0,65	7,14±0,67	7,61±0,59

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

Antagonistik suşların % 0.6-1.5 arasındaki safra konsantrasyonlarına tolerans gösterdikleri saptanmıştır (Çizelge 4. 5.) ($p>0.05$).

Çizelge 4. 5. 22 °C’de 1.5 saat için farklı safra konsantrasyonlarına aday probiyotik suşlarının toleransı (log kob/ml, SD*)

% Safra	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/L32	<i>L. garvieae</i> TUB/2013/L95	<i>Bacillus</i> sp. TUB/2013/L97	<i>A.sobria</i> TUB/2013/L63
0	6,90±0,54	6,97±0,56	5,73±0,84	6,52±0,58
0.6	6,54±0,50	7,03±0,48	6,55±0,40	7,20±0,95
1	6,14±0,31	7,02±0,52	7,05±0,73	7,05±0,44
1.5	6,55±0,66	7,27±0,47	5,76±0,23	7,24±0,84

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

Antagonistik suşların antibiyotik duyarlılıkları Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4. 6. Aday probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotikler	<i>L.garvieae</i> TUB/2013/ L32	<i>L.garvieae</i> TUB/2013/ L95	<i>Bacillus</i> sp. TUB/2013/ L97	<i>A.sobria</i> TUB/2013/ L63
Amoksisillin/ klavulonik asit	S	S	S	S
Ampisillin	S	S	S	R
Kloramfenikol	S	S	S	S
Klortetrasiklin	S	R	S	S
Klindamisin	R	R	I	R
Doksisiklin	S	S	R	S
Enrofloksasin	I	S	S	I
Eritromisin	S	S	I	I
Florfenikol	S	S	S	R
Flumequin	R	I	I	R
Gentamisin	R	S	S	I
Kanamisin	R	R	S	R
Nalidiksik asit	R	S	S	S
Nitrofurantoin	S	S	S	S
Oksolinik asit	R	R	I	S
Penisilin	S	R	I	R
Streptomisin	R	R	S	R
Tetrasiklin	S	S	S	S
Trimethoprim/ Sülfamethakzol	R	R	R	S
Tiylosin	R	R	S	R
Vankomisin	S	S	S	R

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

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Probiyotik suşlar genellikle, sucul hayvanların bulundukları ortam ya da kendi mikrofloralarından izole edilmektedir (Balcazar vd., 2006). Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen 157 suştan 4'ünün *L. garvieae*'ya karşı *in vitro* antagonistik etki gösterdikleri saptanmıştır. Patojen oldukları bilinen *Vibrio* spp., *A. sobria* ve *A. hydrophila* gibi bakterilerin apatojen suşları balık ve karides kültüründe probiyotik bakteri olarak kullanılmaktadır (Irianto ve Austin, 2002; Brunt vd., 2007; Mujeeb Rahiman vd., 2010). Sazan balıklarının (*Cyprinus* sp.) sindirim sisiteminden izole edilen *A. sobria* GC2 suşunun *A.salmonicida*, *L.garvieae*, *S.iniae*, *V.anguillarum*, *V.ordalii* ve *Y.ruckeri*'ye karşı antagonistik etkileri saptanmıştır (Brunt vd., 2007). Başka bir çalışmada da ergin gökkuşağı alabalıklarının yetiştiricilik sularından izole edilen *Vibrio* sp. A3 ve A8 suşları ile *Aeromonas* sp. A1, A5 ve G1 suşlarının *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkisi olduğu rapor edilmiştir (Didinen vd., 2014b). Benzer şekilde, bu çalışmada da gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *A.sobria* (TUB/2013/L63) suşunun *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır.

Laktik asit bakterilerinin, bakteriyel balık patojenlerine antagonistik etkisi yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Nikoskelainen vd.,2001; Balcazar vd. 2007a; Balcazar vd. (2008); Vendrell vd., 2008; Pérez-Sánchez vd. 2011). Çalışmamızda, *L. garvieae* suşlarının (TUB/2013/L32 ve TUB/2013/L95), patojen *L. garvieae* suşuna karşı antagonistik etkileri saptanmıştır. Daha önce yaptığımız bir çalışmada da gökkuşağı alabalıklarının yetiştiricilik suyundan izole edilen *L. garvieae* A7 suşunun aynı patojene karşı antagonistik etkisi belirlenmiştir (Didinen vd., 2014b). Benzer şekilde, sağlıklı salmonidlerin bağırsaklarından izole edilen *L. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069'in (Balcázar vd., 2007a); *L. mesenteroides* CLFP 196 ve *L. plantarum* CLFP'nin salmonid balıklardan izole edilen suşlarının ve gökkuşağı alabalığı bağırsaklarından izole edilen *L. plantarum*, *L. lactis* ve *L. mesenteroides* suşlarının *L.garvieae*'ye karşı antagonistik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Vendrell vd. 2008).

Çalışmada, *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) suşunun da *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkisi saptandı. Brunt vd. (2007)de, gökkuşağı alabalıklarının sindirim

sisteminden izole ettikleri *Bacillus* sp.'nin *L. garvieae* ve *S. iniae*'ye karşı etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyeti (konakçıya kolonizasyon), potansiyel probiyotik suşlar için önemli bir özelliktir. Pozitif hidrofobisite sonuçları bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir (An ve Friedman, 2000; Rinkinen, 2004). Bu çalışmada da, izole edilen *L. garvieae* suşundan birinin (TUB/2013/L95) hidrofobisite göstermediği; diğer üç suşun (*L. garvieae* TUB/2013/L32, *Bacillus* sp. TUB/2013/L97 ve *A. Sobria* TUB/2013/L63) hidrofobik özellikte oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, Didinen vd. (2014b), gökkuşağı alabalıklarının yetiştiricilik sularından izole edilen *L. garvieae* A7 ve *Aeromonas* suşlarının güçlü hidrofobisite gösterdiklerini, ancak diğer antagonistik *L. garvieae* suşların hidrofobik özelliklerinin zayıf olduğunu belirtmişlerdir. Dharmaraj ve Rajendren (2014)de, hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole ettikleri *Bacillus infantis*'in hidrofobisite gösterdiklerini belirtmişlerdir. Aynı şekilde, Pérez-Sánchez vd. (2011) de gökkuşağı alabalıklarından izole ettikleri laktik asit bakterileri *L. plantarum* ve *L. lactis* suşlarının hidrofobik özellikte olduklarını tespit etmişlerdir.

Yüksek ölçüde hidrofobik özelliğe sahip suşların asite ve safraya dirençli olmaları nedeniyle mide bağırsak boşluğu boyunca daha çok hayatta kalma kabiliyetine sahiptirler 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 görüşünü bildirmişlerdir (Pérez-Sánchez vd. (2011). Nitekim, Balcazar vd. (2008), salmonid balıklarda bağırsaktaki fizyolojik safra konsantrasyonunun %0.4-1.3 arasında hesapladığını bildirmişlerdir. 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 kaldıklarını göstermişlerdir. Dharmaraj ve Rajendren (2014)de, hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole ettikleri *Bacillus infantis*'in %2.5 safra konsantrasyonunda 3 saat sonra %63.33'ünün hayatta kalabildiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Sansawat ve Thirabunyanon(2009), tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak kanallarından izole ettikleri *B.subtilis* P33 ve 72 suşlarının % 0.3 safra konsantrasyonunda 24 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir.

Gökkuşığı alabalıklarının mide pH'larının 2.5-3.5 olduğu bildirilmiştir (Lavelle ve Harris 1997). Bu nedenle aday probiyotik suşların bu aralıklardaki pH değerlerine toleranslı olması mideden geçişleri esnasında hayatta kalmalarını sağlayacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada aday probiyotik suşların tamamının 2-3 pH şartlarında hayatta kalabildikleri saptandı. Dharmaraj ve Rajendren (2014)de, hint sazanlarının(*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole ettikleri *B.infantis*'in 2 pH'da hayatta kalabildiğini bildirmişlerdir. Sansawat ve Thirabunyanon(2009), tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak boşluklarından izole edilen *B.subtilis* P33 and 72 suşlarının pH 2.5'da 3 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Laktik asit bakterileri de düşük pH şartlarına toleranslıdır. Balcazar vd. (2008) de gökkuşığı 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; Pérez-Sánchez vd. (2011) de *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* suşlarının pH 3'de 3 saat inkübasyonu takiben sayılarının değişmediğini belirtmişlerdir.

Pérez-Sánchez vd. (2011) gökkuşığı 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 mikroflorasının ve fizyolojisinin etkilenmemesi açısından olumlu olduğunu belirtmişlerdir. 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 aktarılabilir. Bu nedenle, antibiyotiklere dirençli bulunan

aday probiyotik suşların, bu direnç faktörlerini plazmidler yoluyla aktarma mekanizmalarına sahip olup olmadıklarının araştırılması önerilmektedir (Moubareck vd., 2005; Wang vd., 2008). Çalışmamız esnasında izole edilen antagonistik bakteriler antibiyotik duyarlılıkları açısından karşılaştırıldığında, *Bacillus* sp. TUB/2013/L97'nin antibiyotiklerin çoğuna duyarlı bulunması su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanımı açısından istenilen bir sonuçtur.

Sonuç olarak, bu çalışmada gökkuşığı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *L.garvieae* (TUB/2013/L32), *L. garvieae* (TUB/2013/L95), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97)ve *A.sobria* (TUB/2013/L63) suşlarının *L. garvieae*'ya karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç, ortalama ağırlıkları 250 g olan gökkuşığı alabalıklarının bağırsak mikroflorasında laktokokkkoze karşı antagonistik etki gösteren bakterilerinin varlığını kanıtlamıştır. Antagonistik suşlar arasında *L.garvieae*(TUB/2013/L95) hidrofobisite göstermemiştir. Diğer suşlar probiyotiklerde aranan (hidrofobik, yüksek safra ve düşük pH şartlarına dirençli olma) özellikleri göstermişlerdir. İleride yapılacak çalışmalarda bu suşların patojeniteleri araştırıldıktan sonra, apatojen suşların gökkuşığı alabalıklarının yemlerine ilave edilerek kullanımlarını takiben laktokokkkoze karşı hastalık direnci gösterip göstermedikleri belirlenecektir. Böylece, alınabilecek pozitif sonuçlar doğrultusunda, bu suşları gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği sektöründe laktokokkozisin kontrolünde probiyotik olarak kullanılabilecek ticari bir ürüne dönüştürülebilecektir.

KAYNAKLAR

- Aguirre-Guzmán G., Lara-Flores M., Sánchez-Martínez, J.G., Campa-Córdova A.I., Luna-González A., 2012. The use of probiotics in aquatic organisms, A review. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6(23), 4845-4857.
- Altun, S., Diler, A., Diler, O., Başak, K., Işıklı, B.I., 2005. Histopathology of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25, 131- 135.
- Altun S, Diler O, Adiloglu AK., 2004. Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24(2), 119-125.
- Altun, S., Onuk, E.E., Ciftci, A., Buyukekiz, A.G., Duman, M. 2012, Phenotypic, Genotypic Characterisation And Antimicrobial Susceptibility Determination Of *Lactococcus garvieae* Strains. *Journal of The Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University*, 19, 375-381.
- An, Y., Friedman, R.J., 2000. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications. Totowa, New Jersey, Humana, Press.
- Austin, B., and D. A. Austin (Ed.). 1999. Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish. Springer/Praxis Publishing, Chichester, United Kingdom.
- Austin, B., Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 4th ed, Springer- Praxis, Chichester, UK. ISBN 1402060688.
- Avci, H., Aydoğan, A., Tanrıkul, T.T., Birincioğlu, S., 2010. Pathological and Microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University*, 16, 313-318.
- Baeck, G.W., Kim, J.H., Gomez, D.K., Park, S.C., 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *Journal of Veterinary Science*, 7, 53-58.
- Bairagi, A.; Ghosh, K.; Sen, S. K.; Ray, A. K., 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* 10, 109–121.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K., 2004 Evaluation of The Nutritive Value of *Leucaena leucocephala* Leaf Meal, Inoculated with Fish Intestinal Bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in Formulated Diets for Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings. *Aquaculture Research* 35, 436–446.
- Balcazar, J.L., 2002. Use Of Probiotics In Aquaculture: General Aspects. In: I. de

Blas, Editor, Memorias del Primer Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura Zaragoza, Spain, 877–881.

- Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L., 2006. “The role of probiotics in aquaculture”, *Veterinary Microbiology*, 114, 173-186.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Gironés, O., Muzquiz, J.L., 2007. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 51, 185–193.
- 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.
- Bark, S., McGregor, D., 2001. The first occurrence of lactococcosis in farmed trout in England. *Trout News*, 31, 9-11.
- Bragg, R., Broere, JSE., 1986. Streptococcosis in rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, (6), 89-91.
- Brunt J., Newaj-Fyzul A. and B. Austin., 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 30, 573-579.
- Cagırgan, H., 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. *EU Journal of Fisheries Aquatic Science*, 21, 267-269.
- Cagırgan, H., Tanrıku TT., 1995. A new problem Enterococcus-like Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farms in Turkey (in Turkish). *Veteriner Kontrol ve Arastırma Enstitüsü Dergisi*, 33, 9-19.
- Carson, J., Gudkovs, N., Austi, B., 2006. Characteristics of an Enterococcus-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 16, 381-388.
- Casteks, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J-L., Schmidely, P., Mariojous, C., 2006. Probiotic *P. acidilactici* Application in Shrimp *Litopenaeus stylirostris* Culture Subject to Vibriosis in New Caledonia, *Aquaculture*, 275, 182-93.
- Chang, PH., Lin, CW., Lee, YC., 2006. *Lactococcus garvieae* infection of cultured

rainbow trout, *O. mykiss* in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22, 319-327.

- Chen, SC., Liaw, LL., Su, HY., Ko, SC., Wu, CY., Chaung, HC., Tsaı, YH., Yang, KL., Chen YC., Chen TH., Lin GR., Cheng SY, Lin YD., Lee JL., Lai, CC., Weng, YJ., Chu, SY., 2006. *Lactococcus garvieae*, a cause of disease in grey mullet, *Mugil cephalus* L. in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, 25, 727-732.
- Dharmaraj, R., Rajendren, V., 2014. Probiotic assessment of *Bacillus infantis* isolated from gastrointestinal tract of *Labeo rohita*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4,(7), 1-6.
- Didinen, B.I., Yardımcı, B., Onuk, E.E., Metin, S., Yıldırım, P., 2014a. Naturally *Lactococcus garvieae* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792): New Histopathological Observations, Phenotypic and Molecular Identification. *Revue Méd. Vét.*, 165,(1-2), 12-19.
- Didinen, B.I., Metin, S., Onuk, E.E., Takmaz, H., Ersoy, A.T., 2014b. Isolation and Characterization of Potential Probiotic Bacteria from Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) Rearing Units against Bacterial Pathogens. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*.
- Diler, Ö., Altun, S., Adiloğlu, A.K., Kubilay, A., Işıklı, B.I., 2002. First Occurrence of Streptococcosis Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, 22(1), 21-26.
- Domenech, A., Prieta, J., Fernandez, JF., Collins, MD., Jones, D., Dominguez, L., 1993. Phenotypic and phylogenetic evidence for a close relationship between *Lactococcus garvieae* and *Enterococcus seriolicida*. *Microbiologia*, 9, 63-68.
- Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Loderiors, C., Bolinches, J., Barja, J. L., 1988. Toranzo, A. E. Inhibitory Activity of Antibiotic-Producing Marine Bacteria Against Fish Pathogens. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 97 –101.
- Eldar, A., Ghtino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M., 1996. Bercovier, H. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology*, 32, 85-88.
- Eldar, A., Ghittino, C., 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Similar, but different diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36, 227- 231.
- Evans, JJ., Klesius, PH., Shoemaker, CA., 2009. First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases*, 32, 943–951.

- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghitino, C., Prearo, M., Doue, DG., Chilmonczyk, S., Eldar, A., 2004. Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5132-5137.
- Farzanfar, A., 2006. The Use of Probiotics in Shrimp Aquaculture, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48, 149-58.
- Ganguly S., Paul I. and Mukhopadhyay S.K., 2010. Application and Effectiveness of Immunostimulants, Probiotics, and Prebiotics in Aquaculture, A Review. *Isr. J. Aquacult. - Bamidgeh*, 62(3), 130-138.
- Garroques, D., Arevalo, G., 1995. An Evaluation of The Production and Use of a Live Bacterial Isolate to Manipulate the Microbial Flora in The Commercial Production of *Penaeus vannamei* Postlarvae in Ecuador. In: C.L. Browdy and J.S. Hopkins, Editors, *Swimming Through Troubled Water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95*, Baton Rouge, World Aquaculture Society, Pp. 53–59.
- Gatesoupe, FJ., 1991. The Effect of Three Strains of Lactic Bacteria on The Production Rate of Rotifers, *Brachionus plicatilis*, and Their Dietary Value for Larval Turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 96, 335–342.
- Gomez-Gill, B., Roque, A., Turnbull, J.F., 2000. The Use and Selection of Probiotic Bacteria for Use in The Culture of Larval Aquatic Organisms. *Aquaculture*, 191, 259- 270.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Appl Environ Microbiol*, 65, 969-73.
- Gullian, M., Rodríguez, J., 2002. Immunostimulant Qualities of Probiotic Bacteria, *Global Aquacult. Advocate* 5, 52–54.
- Gullian, M., Thompson, F., Rodriguez, J., 2004. Selection of Probiotic Bacteria and Study of Their Immunostimulatory Effect in *P.vannemei*. *Aquaculture*, 233, (1-4), 1-14.
- Irianto, A., Austin, B., 2002. “Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)”, *Journal of Fish Diseases*, 25, 333-342.
- Hjelm, M., Bergh, O., Riaza, A., Nielsen, J., Melcheierson, 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.
- Kav, K., Erganiş, O., 1998. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* in

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farm. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*, 52, 223-226.

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.

Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, CR., Fryer, L., 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. Nov., a Fish Pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 406-409.

Kusuda R and Salati F (1999). *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. In "Fish Diseases and Disorders"(3), Viral, Bacterial and Fungal Infections (Woo and Bruno, Eds.) pp. 303-312. CABI Publishing.

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.

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.

Mujeeb Rahiman K.M., Jesmi Y., Thomas A.P. and A.A. Mohamed Hatha., 2010. Probiotic effect of *Bacillus* NL110 and *Vibrio* NE17 on the survival, growth performance and immune response of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquacult. Res.*, 41, 120-134.

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.

Nogami, K., Hamasaki, K., Maeda, M., Hirayama, K., 1997. Biocontrol Method in Aquaculture for Rearing the Swimming Crab Larvae *Portunus trituberculatus*, *Hydrobiologia* 358, 291-295.

Nogami, K., Maeda, M., 1996. Bacteria as Biocontrol Agents for Rearing Larvae of The Crab *Portunus trituberculatus*, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2373-2376

Olsson, J.C., Westerdhal, A., Conway, PL., Kjelleberg, S., 1998. Intestinal Colonization Potential of Turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dab (*Limanda limanda*) Associated Bacteria with Inhibitory Effects Against *Vibrio anguillarum*. *Applied Environmental Microbiology* 58, 551 -556.

- Ozer, S., Bulduklu, PS., Dönmez, E., 2008. Streptococcosis occurrence at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultivated in province Mersin-Turkey. *Fisheriessciences.com*,2, 272-283.
- Öztürk, T., Didinen, B.I., Doğan, G., Özer, A., Bircan, R., 2013. Lactococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in the Middle Black Sea Region in Turkey and Antimicrobial Susceptibility of the Aetiological Agent, *Lactococcus garvieae*. *Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 24, 7-12.
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, AE., Romalde, JL., 2004. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*,24, 274- 279.
- Perez-Sanchez, T., Balcazar, J.L., Garcia, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Merrifield, D.L., Ruiz-Zarzuela, I., 2011. "Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*", *Journal of Fish Diseases*, 34,499-507.
- Prabhu NM, Nazar AR, Rajagopal S, Ajmal Khan SA.,1999. Use of probiotics in water quality management during shrimp culture. *J. Aquacult. Trop.* 3,227-236.
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic Acid Bacteria in Fish: a Review. *Aquaculture* 160, 177–203.
- Ringo, E., Strøm, E., Tabacheck, J., 1995. Intestinal Microflora of Salmonids: a Review, *Aquacult. Res.* 26, 773–789.
- 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.
- Romalde J.L. & Toranzo A.E., 2002. Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases* (ed. by C.O. Cunningham), pp. 211–233.
- Ruiz-Zarzuela I., de Blas I., Girones O., Ghittino C. & Mùzquiz J.L., 2005. Isolation of *Vagococcus salmoninarum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum), broodstocks:characterisation of the pathogen. *Vet. Res. Commun.*,29,553-562.
- Sakata, T., 1990 Microflora in The Digestive Tract of Fish and Shell-fish. In: R. Lesel, Editor, *Microbiology in Poecilotherms*, Elsevier, Amsterdam, Pp. 171–176.
- Salatı, F., Tassı, P., Bronzı, P., 1996. Isolation of Enterococcus like bacterium from Diseased Adriatic Sturgeon *Acipenser naccarii*, Farmed Italy. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*,16, 96- 99.

- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M., Cumming, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M., Roberfroid, M., Rowland, I., 1998. Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function, *Br. J. Nutr.*, 80, S147–S171,
- Sansawat, A., Thirabunyanon, M., 2009. Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterisation of novel probiotic strains of Bacillus subtilis isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 3(1), 77-87.
- Savvidis, GK., Anadolus, C., Kanakı, Z., Vafeas, G., 2007. Epizootic outbreaks of lactococcosis disease in rainbow trout (*O. mykiss Walbaum*) culture in Greece. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27, 223-228.
- 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.
- Shariff, M., Yusoff, F.M, Devaraja, T.N., Srinivasa Rao, P.S., 2001. The Effectiveness of a Commercial Microbial Product in Poorly Prepared Tiger Shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius), *Ponds. Aquacult. Res.*, 32, 181–187.
- Sharifiyazdi, H., Akhlaghi, M., Tabataaei, M., Mostafavi, S., 2010. Isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*) cultured in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, 11, 342-350.
- Soltani, M., Nikbatht, GH., Mosavi, HAE., Ahmadzadeh, N., 2008. Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28, 207-212.
- Sugita, H., R. Okano, Y. Suzuki, D. Iwai, M. Mizukami, N. Akiyama and S. Matsuura., 2002. Antibacterial Abilities of Intestinal Bacteria from Larval and Juvenile Japanese Flounder Against Fish Pathogens. *Fisheries Science* 68, 1004-1011.
- 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., Gültepe, N., 2011. Mix Infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*): *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1019-1023.
- Vandenbergh, P., 1993. Lactic Acid Bacteria, Their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 221–238.

- Vela, AI., Vazquez, C., Gibello, A., Blanco, MM., Moreno, MA., Liebana, P., Albendea, C., Alcala, B., Mendez, A., Dominguez, L., Fernandez, JF., 2000. Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from Lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3791-3795.
- Vendrell D., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuela I., De Blas I., Gironés O. & Múzquiz J. L., 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microb.*, 29, 177-198.
- Vendrell, D., Luis Balcázar, J., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Luis Múzquiz, J., 2008. "Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from laktococcosis 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*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1318–1323.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., 2006. Probiotics in Marine Larviculture. *FEMSMicrobiol. Rev.* 30, 4044-427.
- Vine N.G., Leukes W.D., Kaiser H., Daya S., Baxter J. and T. Hecht., 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.*, 27, 319-326.
- Wang, Y., 2007. Effect of Probiotics on Growth, Performance and Digestive Enzyme Activity of the *Shrimp penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269, (1-4), 259-264.
- Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J., 2008. "Probiotics in aquaculture: challenges and outlook", *Aquaculture*, 281(1), 1-4.
- Westerdahl, A., Olsson, J., Kjelleberg, S., Conway, P., 1991. Isolation and Characterization of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Associated Bacteria With Inhibitory Effects Against *Vibrio anguillarum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2223–2228.
- 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 : Esengül MORSÜMBÜL

Doğum Yeri ve Yılı : Senirkent, 1990

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : morsumbuleshen@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Şehit Ali İhsan Kalmaz Lisesi(2003-2006)

Lisans : Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
(2008–2012)