



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI BAĞIRSAKLARINDAN İZOLE  
EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN *LACTOCOCCUS  
GARVIEAE*'YE KARŞI PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN *İN  
VİTRO* OLARAK BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Dilek PEHLİVAN**

**Samsun  
Haziran-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANABİLİM DALI

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI BAĞIRSAKLARINDAN İZOLE  
EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN *LACTOCOCCUS  
GARVİEAE*'YE KARŞI PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN *İN  
VİTRO* OLARAK BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Dilek PEHLİVAN**

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

**Samsun  
Haziran-2019**



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Dilek PEHLİVAN tarafından Doç. Dr. Ertan Emek ONUK danışmanlığında hazırlanan “Gökkuşığı alabalığı bağırsaklarından izole edilen Laktik Asit Bakterilerinin *Lactococcus garvieae*'ye karşı probiyotik potansiyelinin *in vitro* olarak belirlenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 27/06/2019 tarihinde yapılan sınav ile Su Ürünleri Hastalıkları (Veteriner) Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Behire Işıl Didinen, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Ertan Emek ONUK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Banu YARDIMCI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... /.....  
**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ertan Emek ONUK'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ ve Doç. Dr. Banu YARDIMCI'ya, doktora öğrencisi Veteriner Hekim Selahattin İnönü'ye destekleri için sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.17.005 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ÖZET

### GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI BAĞIRSAKLARINDAN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN *LACTOCOCCUS GARVIEAE*'YE KARŞI PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN *İN VİTRO* OLARAK BELİRLENMESİ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, Gökkuşığı alabalıklarının bağırsak mikroflorasından *Lactococcus garvieae*'ye karşı antagonistik etkiye sahip Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) izole edilmesi ve antagonistik etkiye sahip olduğu belirlenen bakteriyel türlerin olası probiyotik potansiyelinin in vitro olarak ortaya konulmasıdır.

**Materyal ve Metot:** Gökkuşığı alabalıklarının bağırsak florasından LAB türleri konvansiyonel kültür metotları kullanılarak izole edildi. Elde edilen izolatların *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkinlikleri agar well difüzyon testi ile belirlendi. Sonraki aşamada antagonistik aktiviteye sahip olduğu belirlenen izolatların hidrofobisitesi, pH ve safra tolerans düzeyleri ve antibiyotik duyarlılık profilleri belirlendi. Elde edilen aday probiyotik bakterilerinin genetik identifikasyonu PCR metodu ile gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Gökkuşığı alabalığının bağırsak florasından toplamda 47 izolat elde edildi. Bu izolatların 6'sının *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkinliğe sahip olduğu belirlendi. İleri testlerde izolatların hidrofobik özellikte oldukları, yüksek safra ve düşük pH şartlarına dirençli oldukları ve izolatların tamamının beş farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlendi. Genetik identifikasyon sonucu izolatlardan beşi *Lactobacillus acidophilus* olarak tanımlandı. Bir izolat ise *Lactobacillus* spp. olarak tanımlandı.

**Sonuç:** Son yıllarda patojenik mikroorganizmaları önlemek ve balık hastalıklarının görülme sıklığını azaltmak için yararlı mikroorganizmaların kullanımı yoluyla probiyotik uygulamaları giderek artan bir ilgi görmektedir. Bu çalışma ile ülkemiz kültür balığı yetiştiriciliğinde yaygın olarak görülen *L. garvieae*'nin kontrol altına alınmasında kullanılabilecek olası probiyotik bakteriler elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Gökkuşığı alabalığı, Laktik asit bakterileri, *Lactococcus garvieae*, Probiyotik

Dilek PEHLİVAN, Yüksek Lisans Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran - 2019

## ABSTRACT

### ***IN VITRO* EVALUATION OF PROBIOTIC POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAINBOW TROUT GUT AGAINST *LACTOCOCCUS GARVIEAE***

**Aim:** The purpose of this study are to isolate Lactic Acid Bacteria (LAB), which have an antagonistic activity against *Lactococcus garvieae*, in the intestinal microflora of rainbow trouts and to reveal in vitro, the probable probiotic potential of the bacterial species, which were determined to have an antagonistic effect.

**Material and Method:** LAB species were isolated from the intestinal flora of rainbow trouts using conventional culture methods. The antagonistic efficiencies of the obtained isolates against *L. garvieae* were determined with the agar well diffusion test. The hydrophobicity, pH and bile tolerance levels and antibiotic susceptibility profiles of the isolates, which were found to have antagonistic activity, were determined in the next stage. Genetic identification of the obtained candidate probiotic bacteria was performed with PCR method.

**Results:** A total of 47 isolates were obtained from the intestinal flora of the rainbow trout. Six of these isolates were determined to have antagonistic activity against *L. garvieae*. Further tests revealed that the isolates were hydrophobic, resistant to high bile and low pH conditions, and that all isolates were resistant to five different antibiotics. Following genetic identification, five of the isolates were identified as *Lactobacillus acidophilus*. One of the isolates was defined as *Lactobacillus* spp.

**Conclusion:** In recent years, the probiotic applications through the use of beneficial microorganisms in order to prevent pathogenic microorganisms and reduce the prevalence of fish diseases have received increasing attention. With this study, possible probiotic bacteria were obtained, which can be used to control *L. garvieae*, widespread in our country's culture fish farming.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, *Lactococcus garvieae*, Probiotic, Rainbow trout

**Dilek PEHLİVAN, Master's Thesis  
University of Ondokuz Mayıs - Samsun, June - 2019**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>LAB</b>	: Laktik asit bakterisi
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>MRS</b>	: de Man, Rogosa and Sharpe
<b>g</b>	: Gram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>sn</b>	: Saniye
<b>mM</b>	: Milimol
<b>µM</b>	: Mikromol
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>U</b>	: Ünite
<b>pmol</b>	: Pikomol
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>dk</b>	: Dakika



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>3</b>
2.1. Probiyotikler .....	4
2.2. Probiyotiklerin Seçimi .....	5
2.3. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları .....	6
2.3.1. Adezyon Bölgeleri için Yarışma ve Kolonizasyon .....	6
2.3.2. İmmun Yanıtı Arttırma .....	7
2.3.3. Antimikrobiyal Madde Üretme .....	8
2.3.4. Su Kalitesini İyileştirme.....	9
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>10</b>
3.1. Materyal.....	10
3.2. Metot.....	10
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu .....	10
3.2.2. Patojen Bakteri ve Kültür Koşulu .....	11
3.2.3. Antagonistik Aktivite Testi .....	11
3.2.4. Aday Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi.....	12
3.2.5. Aday Probiyotik Bakterilerin Safra Toleranslarının Belirlenmesi.....	12
3.2.6. Aday Probiyotik Bakterilerin pH Toleranslarının Belirlenmesi .....	13
3.2.7. Aday Probiyotik Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılıkları.....	13
3.2.8. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler İdentifikasyonu .....	13
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>16</b>
4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu .....	16
4.2. Antagonistik Aktivite Testi.....	16
4.3. Aday Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi .....	17
4.4. Aday Probiyotik Bakterilerin Safra Toleranslarının Belirlenmesi .....	17
4.5. Aday Probiyotik Bakterilerin pH Toleranslarının Belirlenmesi.....	18
4.6. Aday Probiyotik Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılıkları .....	18
4.7. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler İdentifikasyonu.....	19
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>21</b>

<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	25
<b>KAYNAKLAR</b> .....	26
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	33



## 1. GİRİŞ

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliği sektörü hızlı bir gelişim sürecine girmiş ve 2017 verilerine göre 276 bin 502 ton üretim hacmine ulaşmıştır. Bu üretim hacmi içerisinde yetiştiriciliği en fazla yapılan tür ise 109 bin 657 ton üretim ile gökkuşuğu alabalığı olmuştur (TOB, 2019). Su ürünleri üretiminde yaşanan hızlı gelişim sürecini olumsuz yönde etkileyen bir takım faktörler bulunmakta, bunların en başında ise enfeksiyöz hastalıklar gelmektedir. Balıkların entansif olarak yüksek populasyon yoğunluğunda yetiştiriciliğinin yapılması, enfeksiyonların görülme sıklığını artırmakta ve dolayısıyla hastalıkların kolay yayılmasına, yerleşmesine ve daha uzun süre devam etmesine neden olmaktadır. İşletmelere hastalıkların girişinin engellenmesinde ve hastalıkların tedavi edilmesinde aşı ve antibiyotik uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu uygulamalar bir takım problemlerin oluşmasına yol açmaktadır. Akuakültürde bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi amacıyla her yıl yüzlerce ton antimikrobiyal kullanılmaktadır. Bu durum hastalıklara karşı dirençli bakterilerin gelişmesine, antibiyotiklerin balık doku ve organlarında birikmesine dolaylı olarak da sucul ortam ve insan sağlığı açısından zararlı sonuçların oluşumuna neden olmaktadır. Ülkemizde balıklarda görülen başlıca hastalık etkenleri olan *Listonella anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae* ve *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'ya karşı ruhsatlı kullanılabilir aşılar bulunmaktadır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2018). Netice de sınırlı sayıda ticari ürünün bulunması sektörde görülen hastalıkların tamamı ile mücadeleyi kısıtlamaktadır ki, bu hastalık etkenlerinin dışında kalan diğer etkenlerin işletmelerden elemine edilmesinde antibiyotikler en fazla tercih edilen uygulama olmaktadır.

Sucul ortamda dirençli bakteri ve direnç genlerinin bulunması bakteriyel mutasyonu, rekombinasyonu ve yatay gen transferinin oluşmasını teşvik ederek akuvatik ve insan patojen resistomları arasındaki muhtemel köprülenme ile yeni antimikrobiyal dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu dirençli bakterileri ve sahip oldukları antimikrobiyal direnç genleri de hastalıkların hayvan ve insan popülasyonlarına küresel olarak yayılmasına yol açmaktadır (Cabello ve ark., 2016).

Özellikle aşılama mümkün olmadığında akuakültürde antibiyotik kullanımını azaltacak birçok alternatif çözümler önerilmektedir. Bu çözümler arasında antimikrobiyal peptitler, bitkisel ekstraktlar, probiyotikler, prebiyotikler, sinbiyotikler

yer almaktadır. Bunların arasında, özellikle probiyotikler uygulama kolaylığı, fazla bulunması ve düşük maliyetlerinden dolayı dikkat çekmektedir (Hoseinifar ve ark., 2018).

Bu tez çalışması ile ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan balık türü olan gökkuşacağı alabalıklarının bağırsaklarından laktik asit bakterileri (LAB) izole edilmiştir. Elde edilen izolatlar arasından *in vitro* olarak *L. garvieae*'ye karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenen izolatların probiyotik potansiyelleri yine *in vitro* testler ile değerlendirilerek, etkenin kontrolünde kullanılabilecek aday probiyotik bakteriler ortaya konulmuştur.



## 2. GENEL BİLGİLER

Su ürünleri yetiştiricilik sektöründe meydana gelen enfeksiyonlar ekonomik olarak büyük kayıplara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların %54,9'undan bakteriyel patojenlerin, %22,6'sından virüslerin, %3,1'inden mikotik ve %19,4'ünden paraziter ajanların sorumlu olduğu bildirilmiştir (Dhar ve ark., 2014). Ayrıca yetiştiricilik sistemlerinde görülen hastalıkların yetiştiriciliği yapılan birçok akuatik türün büyümesini birincil derecede kısıtladığı bildirilmektedir. Bununla birlikte bu hastalıklar dünyanın birçok ülkesinde hem ekonomik hem de sosyo-ekonomik kalkınmanın engellenmesinden büyük ölçüde sorumlu tutulmaktadır (Subasinghe, 2009).

Ülkemiz su ürünleri sektöründe en sık karşılaşılan bakteriyel kökenli hastalık etkenlerinden birisi *L. garvieae*'dir (Altun ve ark., 2013; Didinen ve ark., 2014). Etken balıklarda hiperakut hemorojik septisemiyle seyreden lactococcosis hastalığının etiyolojik ajanıdır (Meyburg ve ark., 2017). Hastalığa hem tatlı hem de tuzlu suda yetiştiriciliği yapılan balıklarda rastlanmaktadır (Gibello ve ark., 2016). Ülkemizde ilk hastalık bildirimini gökkuşağı alabalıklarında 2001 yılında yapılmıştır (Diler ve ark., 2002). İlerleyen yıllarda hastalık tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de ortaya çıkan epizootilerden sonra hızlı bir yayılım sürecine girmiş ve özellikle alabalık işletmelerinde önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur (Altun ve ark., 2004; Didinen ve ark., 2014).

Günümüzde, balıkların enfeksiyonlara karşı korunmasında aşılama ve antibiyotik uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır (Onuk ve Fındık, 2015). Ancak bu metotlar sağlıklı intestinal mikrofloranın profilini değiştirebilmekte ve balıklarda strese neden olabilmektedir. Bununla beraber, su ürünleri yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin kullanımı antimikrobiyal direnç gelişimine neden olabilmekte ve halk sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Smith ve ark., 1994; Heuer ve ark., 2009). Bu sebeple son yıllarda su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıkların kontrol altına alınması ve büyümeyi teşvik edici amaçla antibiyotiklere alternatif olabilecek yeni probiyotik mikroorganizmaların elde edilmesi ve bu mikroorganizmaların çeşitli probiyotik özelliklerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemler ile belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Capkin ve Altınok, 2009; Didinen ve ark., 2014; Didinen ve ark., 2018).

Gastro intestinal kanalda kolonize olan bakteriler arasında LAB'lar konakçı gastro intestinal kanalının gelişimini sağlaması, sindirim fonksiyonlarını düzenlemesi, mukozal toleransı ve immun yanıtı uyarması ve hastalıklara karşı direnci arttırması nedeniyle probiyotik bakteri olarak kullanılabilir en favori mikroorganizmalardır. LAB'lar taksonomik olarak Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı ve Latobacillales takımı içerisinde sınıflandırılmaktadır. Gram-pozitif, endosporsuz, çomak ya da kokoid şeklinde morfolojiye sahiptirler, katalaz ve oksidaz negatiftirler ve birçoğu hareketsizdir ve genellikle pH 5.5-5.8 arası en uygun üreme şartlarıdır. LAB'lar içerisinde *Carnobacterium*, *Dolosigranulum* ve *Lactobacillus* cinsleri çomak şeklinde, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsleri kok şeklinde ve *Weissella* cinsi kokoid veya çomak şeklinde morfolojiye sahiptirler (Ringo ve ark., 2018). Günümüze kadar akuakültürde yem katkı maddesi olarak LAB'ların olası kullanımlarını ele alan bir çok literatür bulunmaktadır (Lopez-Cazorla ve ark., 2015; Safari ve ark., 2016; Soltani ve ark., 2019). Ancak probiyotiklerin konakçı fizyolojisi üzerindeki etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için halen çalışmaların yapılması gerektiği bir gerçektir (Ringo ve ark., 2018).

## 2.1. Probiyotikler

Probiyotiklerin su ürünlerinde kullanımı karasal hayvanlar ve insanlarda kullanımlarından farklıdır. Bu farklılığı oluşturan önemli faktör akuatik hayvanların bulunduğu ortamdır. Bundan dolayı karasal hayvanlardaki tanımın aksine akuatik hayvanlar için farklı bir tanım yapılması gerektiği kabul edilmektedir. Birçok yazar akuakültür için çeşitli tanımlar önermektedir. Tanımlar benzer olmakla birlikte her bir tanımın kendine özgü spesifitesi vardır (Wang ve ark., 2019). Bir tanımlamada probiyotikler, hayvan ve insanlarda patojen mikroorganizmaların intestinal süperfisiyal hücrelere yapışarak çoğalmalarını engelleyen ve ürettikleri antimikrobiyal metabolitlerle bu mikroorganizmaların üremelerini baskılayan canlı bakteri kültürlerinden oluşan biyolojik ürünler olarak tanımlanmıştır (Fuller, 1989; Vine ve ark., 2004). Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü probiyotikleri konakçı üzerinde uygun miktarda uygulandığında konakçı üzerinde sağlık yönünden fayda veren canlı mikroorganizmalar olarak tanımlamıştır (Wang ve ark., 2019'dan alındı). Verschuere ve ark. (2000), akuatik hayvanlar için probiyotik tanımını "konakçı

organizmanın bulunduğu ortama karşı direncini, hastalıklara karşı immun yanıtı, beslenme değerini ya da yemden yararlanımını arttıran, konakçı mikrobiyal ortamında faydalı etkilere sahip canlı mikrobiyal katkılar” olarak yapmıştır. Dikkat çeken bir önemli hususta bazı bilim adamlarının akuatik probiyotikleri bir mikroorganizmanın tümü ya da bir parçası olarak tanımlamasıdır (Salminen ve ark., 1999; Irianto ve Austin, 2002). Probiyotiklerin fonksiyonel komponentleri çok önemli olmasına rağmen probiyotik olarak düşünilemeyen bu komponentleri probiyotik efektörleri olarak tanımlamanın daha doğru bir yaklaşım olacağı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2019).

## 2.2. Probiyotiklerin Seçimi

Probiyotiklerin seçimindeki başlıca metot, patojen bakteriler ile olası probiyotiklerin katı veya sıvı ortamda birbirlerine maruz bırakıldığı *in vitro* antogonizim testleridir (Balcazar ve ark., 2006). Ancak Gram ve ark., (1999) *in vitro* etkinliklerin olası *in vivo* etkileri tahmin etmede kullanılamayacağını belirtmişlerdir. *Pseudomonas fluorescens*'in *in vitro* olarak antagolistik aktivite gösterdiği *Aeromonas salmonicida*'ya karşı *in vivo* etkin olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla probiyotik bakterinin orijininin, güvenilirliğinin ve konakçı gastrointestinal kanalından geçerken hayatta kalabilme yeteneğinin bilinmesi birinci derecede önem taşımaktadır (Balcazar ve ark., 2006). Potansiyel probiyotikler için ana seçim kriterlerinden biri de kolonizasyon yeteneğidir. Bu özellik sayesinde patojen türlerin konakçı barsak mukozasına adezyonu engellenebilmektedir (Vine ve ark., 2004). Bununla beraber probiyotik olarak kullanılacak mikroorganizmaların, depolama koşullarına dayanıklı olması, gastrointestinal sistemde aktif hale gelebilmesi, güvenli olması ve konakçıya yararlı etkilerinin olması gerekir (Fuller, 1989).

Akuakültürde probiyotik olarak kullanılacak bakterilerin seçim metotları arasında (a) geçmiş bilgilerin toplanması, (b) probiyotik bakteri ile mücadele eden patojen türlerin değerlendirilmesi, (c) probiyotiklerin olası patojenitesinin değerlendirilmesi, (d) probiyotiklerin konakçıdaki etkilerinin değerlendirilmesi ve (e) ekonomik olarak fiyat, fayda analizinin yapılması yer almaktadır (Gomez-Gill ve ark., 2000).

## 2.3. Probiyotiklerin Etki Mekanizmaları

Balık yetiştiriciliğinde kullanılabilen probiyotiklerin konakçı üzerinde gösterdikleri sağlık açısından faydalı etkiler bir takım mekanizmalar sonucunda ortaya çıkmaktadır.

### 2.3.1. Adezyon Bölgeleri için Yarışma ve Kolonizasyon

Probiyotiklerin intestinal yüzeye adezyonu ve gastro-intestinal kanala kolonizasyonu istenilen en önemli özelliktir. Probiyotiklerin adherent türleri intestinal kanalda uzun süre kalabilmekte ve non-adherent türlere oranla metabolik ve immunmodulator etkilerini daha iyi gösterebilmektedir. Adezyon ile bağırsağın mukozal yüzeyine bağlanan bakteri bölgesel lenf yumrularının aktifleşmesini sağlamak suretiyle lokal ve daha sonra sistemik immün etkiye neden olarak intestinal mukozal bariyeri dengelediği ifade edilmektedir (Salminen ve ark., 1996). Adezyon aynı zamanda intestinal epiteldeki patojen bakteriler ile kompetatif ekslüzyon (yarışmadan dışlama) sağlamaktadır. *İn vitro* ortamda patojenlerin adezyonunun baskılanmasında hem canlı hem de ısı ile inaktive edilmiş *Lactobacillus acidophilus* bakterileri etkili olmuştur (Coconnier ve ark., 1993). Konakçı spesifitesinin probiyotik bakterilerin istenilen bir özelliği olarak ele alınmasına rağmen (Saarela ve ark., 2000) konakçı spesifikliğı tartışılmaktadır. Bununla beraber, yapılan çalışmaların birçoğunda türler arası farklılık üzerinde durulmamış ve birçok probiyotik ürün farklı hayvanlar türlerinde kullanılmıştır.

*İn vitro* adezyon çalışmaları farklı probiyotik türlerinin adezyon potansiyellerinin farklı olduğunu göstermiştir (Tuomola ve Salminen, 1998). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, probiyotik laktik asit bakterilerinin aslında insanlardan izole edilmiş olsa da *in vitro* ortamda hem karnivor (Rinkinen ve ark., 2000) hem de balık mukus'una (Nikoskelainen ve ark., 2001) yapıştığını göstermektedir. Deney hayvanlarında ki LAB popülasyonunun konakçı genetiğine bağlı olmadığı, daha ziyade çevresel faktörlerden etkilendiği gösterilmiştir (Benno ve Mitsuoka, 1986).

Rinkinen ve ark., (2003) yapmış oldukları probiyotik bakterilerin adezyonu ile ilgili çalışmada, adezyon özelliğinin konakçı spesifitesine değil de LAB türlerinin özelliklerine bağlı olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçta mukus adezyon özelliğinin konakçı spesifitesinden daha çok LAB türlerine dayandığını saptamışlardır.



Patojenlerle kompetatif eklsuzyon veya immun sistemin regulasyonu gibi sağlık açısından yararlı etkiler için en etkili probiyotik en azından geçici bir sure bağırsak mukozasında kolonize olmalıdır (Saarela ve ark., 2000). Probiyotik adayların kolonizasyon kapasitesini değerlendirmek için kullanılabilir bazı parametreler şunlardır: (a) simüle edilmiş mide suyunda hayatta kalma oranı, (b) simüle edilmiş bağırsak koşullarında hayatta kalma, (c) adezyon kapasitesi ve (d) balık bağırsak mukusunda üreme yeteneği (Geraylou ve ark. 2014).

Patojenlerin kolonizasyonunun engellenmesinde en önemli mekanizma probiyotiklerin barsak veya diğer dokular üzerindeki adezyon bölgeleri için yarışmasıdır. Enterik mukus veya bağırsak duvar yüzeyine bağlanma yeteneğinin bakterinin balık bağırsaklarına yerleşmesi için gerekli olduğu bilinmektedir (Olsson ve ark., 1992). Doku yüzeyine bakteriyel adezyon, patojenik enfeksiyonların ilk evresinde önemli olmaktadır ve patojenlerle adezyon reseptörleri için yarışma probiyotiklerin konakçıdaki önemli etkilerinden birisidir (Montes ve Pugh, 1993). Adezyon kapasitesi, intestinal veya eksternal mukus içerisinde ya da üzerinde reme *V. anguillarum* ve *A. hydrophila* gibi balık patojenleri ile yapılan *in vitro* alışmalarda gösterilmiştir (Gatesoupe, 1991). Yapılan bu çalışmaların amacı türlerin *in vitro* olarak adezyon kapasitesini ölçmek ve hastalıklara karşı koruyuculuk düzeylerini belirlemektir. Gatesoupe (1999) tarafından yapılan bir araştırmada mayaların gökkuşağı alabalıklarında uzun süre dayanıklılık gösterdiği bildirilmektedir. Mayalar balık bağırsak florasına etkili bir şekilde yapışması ve kolonize olması nedeniyle önem taşımaktadır.

### **2.3.2. İmmun Yanıtı Arttırma**

İmmunositumulanlar hayvanlarda immun sistemi aktive eden ve onları viral, bakteriyel, paraziter ve mantarlar tarafından oluşturulan enfeksiyonlara karşı daha dirençli hale getiren kimyasal maddelerdir (Raa, 1996). Balık larvalarında immun sistem erişkin balıklara göre daha az gelişmiştir ve bu sistem nonspesifik immun yanıt şeklindeydir (Soderhall ve Cerenius, 1998). Bağırsak mukozal epitel hücreleri, mukus, antimikrobiyal ürünler, bağırsakta bulunan kommensal organizmalar ile mukoza ve submukozadaki bağışıklık hücreleri arasındaki ilişki balıkların sağlığı için hayati öneme sahiptir (Mohapatra ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda farklı balık türlerinde probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çeşitli immun sistem parametrelerini

uyardığı gösterilmiştir. Salinas ve ark. (2006) çipura (*Sparus aurata* L.) balıklarında ısı ile inaktive edilmiş *L. delbrueckii* ssp. *lactis* uygulamasının respiratori b6rst aktivitesini arttırdığını bildirmiştir. Benzer şekilde Nikoskelainen ve ark. (2003), 2 hafta boyunca *L. rhamnosus* ilave edilmiş yemler ile beslenen g6kkuşığı alabalıklarında kontrol grubuna oranla respiratori b6rst aktivitesini anlamlı bir şekilde arttırdığını belirlemiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile probiyotik uygulamalarının total protein içeriğini, albumin konsantrasyonunu, globulin konsantrasyonunu, lizozim aktivitesini, IgM üretimini (Nandi ve ark., 2017) ve sitokin genlerinin (IL-4, IL-12 ve IFN) ekspresyon düzeylerini (Hamdan ve ark., 2016) arttırdığı ortaya konulmuştur.

### 2.3.3. Antimikrobiyal Madde Üretme

Mikrobiyal populasyonlar ortamda bulunan diğ6r mikrobiyal populasyonlar üzerine bakterisidal veya bakteriyostatik etkiye sahip kimyasal maddeleri salgırlar (Lemos ve ark., 1991). Genel olarak antimikrobiyal etki antibiyotiklerin, bakteriyosinlerin (Bruno ve Montville, 1993), proteazların, lizozimlerin, hidrojen peroksitin ve organik asitlerin üretimi ile ortam pH'sının değıştirilmesi şeklindedir. Söz konusu bu maddeler gerek tek gerekse kombine olarak antibakteriyal etki gösterebilirler (Sugita ve ark., 1997).

Probiyotiklerin kolonik flora üzerinde güçlü bir etkiye sahip olması patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal madde üretimi veya kompetatif eklüzyon yoluyla antogonizm göstermesi için önemlidir. Yapılan araştırmaların çoğunda bakteriosinlerin etkisi üzerinde durulmaktadır. Bakteriyosinler, ribozomlarda sentezlenen antimikrobiyal peptitlerdir ve LAB'lar en yaygın bakteriyosin üreticileridir (Ringo ve ark., 2018). Satish Kumar ve ark. (2011), topan kefalinden (*Mugil cephalus*) enterosin adı verilen bir bakteriyosin üreten *Enterococcus faecium* MC13 izole etmişler ve özelliklerini belirlemişlerdir. Elde edilen enterosin'in *Listeria monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, ve *V. vulnificus*'a karşı inhibit6r etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Bir başka çalışmada Atlantic som (*Salmo salar*) balıklarının gastrointestinal kanalından izole edilmiş olan LAB'larda (*L. farraginis*, *Pediococcus acidilactici*, ve *P. pentosaceus*) bakteriyosin kodlayan genlerin var olduğu belirlenmiştir (Amin ve ark., 2017). Bakteriyosinlerin *in vivo* patojenleri baskılamadaki rolleri sınırlı olabilmektedir. Bunun nedeni bu bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin Laktobasiller, Bacillus veya Clostridium gibi sporlu formlar üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olmasıdır (Holzapfel

ve ark., 1995). Bununla beraber hidrojen peroksit, laktik ve asetik asit gibi düşük moleküler ağırlıktaki metabolitlerin *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* ve *Helicobacter* gibi bir çok zararlı mikroorganizmaya karşı geniş baskılayıcı etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (Niku-Paavola ve ark., 1999).

#### **2.3.4. Su Kalitesini İyileştirme**

Uygun ve iyi su kalitesinin sağlanması ve korunması için gerekli olan temel hijyen kuralları balık yetiştiriciliğinde önem taşır (Austin ve Austin, 1985). Bakteriyel hastalıklar başlıca fakültatif bakteriyel patojenler tarafından oluşturulur. Bu patojenler normalde balıklarda ya da çevrede bulunabilir. Akvatik ortamda balık ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler mortalite için önemli bir potansiyeldir. Ancak standart hijyen kuralları uygulandığında mortalite riski büyük oranda azalır. Düşük çözünmüş oksijen miktarı, yüksek amonyak, yüksek sıcaklık, çeşitli kirlilikler, yoğunluk gibi bazı stres durumlarında doğal bağışıklık zayıflar ve bakteriler kolonize ve penetre olarak sağlıklı dokuları enfekte ederler (Hansen ve Olafsen, 1999). Yapılan birçok çalışmada, su kalitesi probiyotiklerin, özellikle, *Bacillus* spp. eklenmesi ile elde edilmiştir. Bunun nedeni, Gram pozitif *Bacillus* spp.'nin genellikle Gram negatif türlere göre organik maddeleri CO<sub>2</sub> daha iyi dönüştürmesidir (Dalmin ve ark., 2001).

### 3. MATERYAL METOT

#### 3.1. MATERYAL

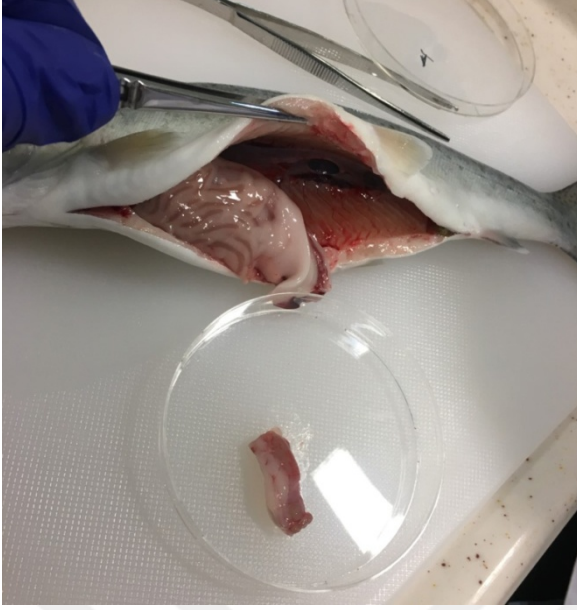
Çalışmanın materyal kısmını Samsun, Bafra, Derbent barajında bulunan ticari bir işletmeden tüketime sunulmak amacıyla yeni hasat edilen 25 adet sağlıklı gökkuşuğu alabalığı (ort. 200 g) oluşturdu. Rutin prosedür olarak balıklar hasat öncesi 48 saat yemlenmedikleri için sindirim kanalları temiz olmaktadır. Balık örnekleri soğuk zincir altında iki saat içerisinde Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi. Balıklar laboratuvara ulaşır ulaşmaz rutin nekropsi aşamaları uygulandı.

#### 3.2. METOT

##### 3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Laboratuvar şartlarında balıkların ventral yüzeyleri %70 etanol ile sterilize edildi ve diseksiyon ile her bir balığın gastrointestinal kanalını aseptik olarak çıkartıldı (Şekil 1). Kanal içerisinde bulunan non-adherent mikrobiyom'un uzaklaştırılması için çıkartılan gastrointestinal kanal uzunlamasına ensize edildi ve % 0,9 steril tuzlu su ile 3 kez yıkandı. Gastrointestinal kanalın distal kısmı (hindgut) ayrılarak steril peptonlu su ile homojenize edildi (1:10; ağırlık:hacim) ve 10 katlı seri dilüsyonları ( $10^{-2}$ - $10^{-8}$ ) hazırlandı.  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  ve  $10^{-4}$ 'lük dilüsyonlardan 100 µl alınarak 3 adet MRS agar'a (de Man, Rogosa and Sharpe; MRS, Merck) yayma tarzında ekim yapıldı (Lin ve ark., 2013). Ekim yapılan pleytler aerobik şartlarda 28 °C'de 3-5 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası farklı morfolojiye sahip koloniler değerlendirmeye alındı.

Değerlendirme öncelikle izolatların Gram morfolojisi, katalaz ve oksidaz aktivitesinin test edilmesiyle yapıldı. Sadece Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif olan izolatlar seçildi. Elde edilen izolatlar MRS agara ekim yapılarak, saflaştırıldı ve ilerleyen aşamadaki testlerde kullanılmak üzere gliserinli buyyon (%15) içerisinde -20 °C'de saklandı.



**Şekil 1.** Gökkuşacağı alabalıklarında gastrointestinal kanalın distal kısmının çıkarılması.

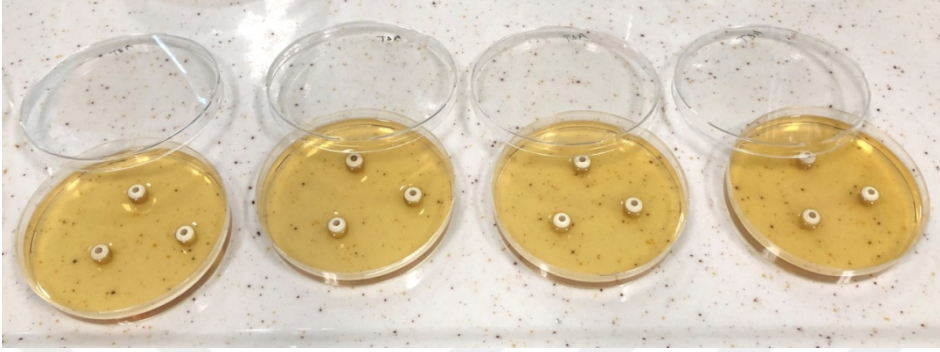
### **3.2.2. Patojen Bakteri ve Kültür Koşulu**

Çalışmada patojen bakteri olarak daha önce yetiştiriciliği yapılan gökkuşacağı alabalıklarından izole ve identifiye edilmiş olan *L. garvieae* saha izolatu (E7) kullanıldı. Bu izolat trypticase soy agar'da 25 °C'de 24-48 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

### **3.2.3. Antagonistik Aktivite Testi**

Balıkların bağırsak mikroflorasından izole edilen LAB'ların, *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında agar well difüzyon testi kullanıldı. Bu amaçla patojen mikroorganizmanın (*L. garvieae* E7) MRS broth içerisinde bir gecelik kültürü hazırlandı ve bu kültür Mc Farland 0,5'e göre ayarlandı. Sonrasında bu kültürden 5 ml (%1) alınarak, döküm sıcaklığına kadar soğutulmuş 500 ml MRS agar'a ilave edildi. Bakterinin besi yerinde homojen bir şekilde dağılımı için döküm öncesinde iyice karıştırıldı. Döküm aşamasında kuyucukların açılması amacıyla petrilere içerisinde daha önce sterilize edilmiş steril porselen boncuklar yerleştirildi (Şekil 2). Patojen bakterinin ilave edildiği besiyeri steril boncukların yerleştirildiği petrilere döküldü ve 15 dakika beklendikten sonra boncuklar çıkarılarak kuyular hazır hale getirildi. Kuyucukların içerisine aday probiyotik bakteri kültürlerinden (MRS broth içerisinde 24 saatlik kültürler) 100 µl ilave edildi ve 28 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası LAB'ların etrafında oluşan şeffaf inhibisyon zonları

ölçüldü ve 0 (0-5 mm), 1 (düşük, 6-10 mm), 2 (orta, 11-20 mm), 3 (yüksek, 21-25 mm) ve 4 (çok yüksek,  $\geq 26$  mm) olarak skorlama yapıldı (Mukherjee ve Ghosh, 2016). *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği belirlenen izolatlar sonraki testlerde kullanıldı.



Şekil 2. Agar well difüzyon testinde kuyucukların hazırlanması.

#### 3.2.4. Aday Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisitelerinin Belirlenmesi

*L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği belirlenen aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitelerini belirlemek için % 0,03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış MRS agar hazırlandı ve aday probiyotik bakteriler kongo kırmızısı ilave edilen MRS agar'a ekildi. Ekim yapılan petriler 28°C'de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat içerisinde görülen kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik) olarak, beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak değerlendirildi (Sharma ve ark., 2006).

#### 3.2.5. Aday Probiyotik Bakterilerin Safra Toleranslarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan safra örnekleri, örnekleme yapılan alabalıklarının safra keselerinden steril enjektör yardımıyla toplandı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Aday probiyotik bakterilerin safra toleranslarının belirlenmesi amacıyla her bir aday probiyotik bakterinin PBS içerisindeki süspansiyonları  $10^8$  kob/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bakteriyel süspansiyonların 0.5 ml alınarak, farklı oranda (% 2.5, 5, 10) safra içeren 4,5 ml steril PBS içeren tüplere inoküle edildi. Örnekler 28 °C'de 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örneklerin steril PBS içerisinde seri dilüsyonları hazırlandı ve bu dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak MRS agar'a yayma plak tekniği ile ekim yapılarak canlı bakteri sayımı yapıldı (Balcazar ve ark., 2008).

### 3.2.6. Aday Probiyotik Bakterilerin pH Toleranslarının Belirlenmesi

Aday probiyotik bakterilerin farklı pH şartlarına toleransının belirlenmesi amacıyla her bir aday probiyotik bakterinin PBS içerisindeki süspansiyonları  $10^8$  kob/ml olacak şekilde hazırlandı. Her bir bakteri süspansiyonundan 0,5 ml alınarak HCl (1M) eklenerek farklı pH değerlerinde (pH 1, 2 ve 3) ayarlanmış olan 4,5 ml PBS içerisine inokule edildi. Örnekler 28 °C’de 1,5 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası örneklerin steril PBS içerisinde seri dilüsyonları hazırlandı ve bu dilüsyonlardan 0.1 ml alınarak MRS agar’a yayma plak tekniği ile ekim yapılarak canlı bakteri sayımı yapıldı (Balcazar ve ark., 2008; Perez-Sanchez ve ark., 2011).

### 3.2.7. Aday Probiyotik Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılıkları

Belirlenen potansiyel probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi ile değerlendirildi. Bu amaçla öncelikle her bir izolatin MRS broth içerisinde bir gecelik subkültürleri hazırlandı ve yoğunlukları Mc Farland No 0,5’e göre ayarlandı. Daha sonra hazırlanmış olan bakteriyel süspansiyonlardan 0.1 ml alınarak MRS agar’a steril svap yardımıyla ekildi. Ekim sonrası petriyer 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı ve bu süre sonunda agar yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirildi. Çalışmada amoksisilin/klavulanik asit (30 µg), ampisilin (10 µg), doksisisiklin (30 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), florfenikol (30 µg), flumequin (30 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), klortetrasiklin (30 mcg), nalidiksik asit (30 µg), oksolinik asit (2 µg), penisilin (10 U), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/sulfamethakzol (1.25/23.75 µg) olmak üzere 15 farklı antibiyotik diski kullanıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirilen petriyer 28° C’de 48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü. Zon çaplarına göre sonuçlar duyarlı ( $\geq 21$  mm), orta düzeyde duyarlı (16–20 mm) ve dirençli ( $\leq 15$  mm) olarak değerlendirildi (Vlkova ve ark., 2006).

### 3.2.8. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler İdentifikasyonu

Aday probiyotik bakterinin moleküler identifikasyonu *Lactobacillus* spp. ve *L. acidophilus* spesifik primer dizilerinin kullanıldığı PCR denemeleri ile yapıldı. Bu amaçla öncelikle izolatların genomik DNA’ları prensibi spin kolon ile filtrasyon esasına dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak (Blood&Tissue, Invitrogen, Kanada) üretici firma talimatlarına göre elde edildi. Kit içeriğine ek olarak Gram pozitif

bakteriler için 0,06 g Tris-HCl, 0,15 g EDTA, 240 µl Triton X-100, 0,4 g lizozim'den oluşan 20 ml lizozim lizis buffer hazırlandı.

İzolatların bir gecelik subkültürlerinden 1 ml alındı (yaklaşık  $2 \times 10^9$  hücre) ve hücreler santrifüj edilerek toplandı. Elde edilen pelet 180 µl lizozim lizis buffer içerisinde süspansiyon edildi. Süspansiyon 37 °C'de 30 dk süre ile su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra süspansiyon üzerine 20 µl proteinaz K eklendi ve vortekslenerek homojen hale getirildi. Sonrasında bu karışımın üzerine 200 µl PureLink® Genomik Lysis/Binding buffer eklenerek homojen bir hale gelinceye kadar vortekslendi ve 55 °C'de 30 dk süre ile su banyosunda inkübe edildi. İnkubasyon sonrası karışımın üzerine 200 µl % 96-100'lük etanol eklendi ve yaklaşık 10 sn homojen bir solüsyon elde edilinceye kadar vortekslendi. Hazırlanmış olan lizat PureLink® Spin kolonu içerisine aktarıldı ve 10000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta yer alan koleksiyon tüpleri atıldı ve spin kolonlarına yeni koleksiyon tüpleri takıldı. Sonrasında kolon üzerine 500 µl yıkama tamponu 1 eklendi. Kolon 10000xg'de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon tekrar atıldı ve yeni koleksiyon tüpü takıldı ve kolon'a 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi. Kolon 15000xg'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki kolon atıldı ve DNase-RNase içermeyen mikrotüp üzerine konulan koleksiyon tüpüne 100 µl elüsyon buffer eklendi. Kolon 2 dk süre ile oda ısısında inkübe edildikten sonra 8000xg'de 1 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen DNA'ların konsantrasyonları Nanodrop (Thermo) ile 260 nm'de ölçüldü. İzolatlara ait DNA konsantrasyonları genotiplendirme çalışmalarında kullanılmak üzere 15 ng/µl olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında DNA'lar PCR çalışmalarında hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

*Lactobacillus* spp.'nin PCR ile cins düzeyinde identifikasyonunda Lacto F (TGG AAA CAG GTG CTA ATA CCG) ve Lacto R (CCA TTG TGG AAG ATT CCC) primerleri kullanıldı (Markiewicz ve Biedrzycka, 2005). *Lactobacillus* spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *L. acidophilus* spesifik PCR ile tanımlandı. Bu aşamada PCR'da LacidoF (CAC TTC GGT GAT GAC GTT GG) ve LacidoR (CGA TGC AGT TCC TCG GTT AAG C) primerleri kullanıldı (Sul ve ark., 2007). PCR amplifikasyonlarında PCR water, 25 µl 2×PCR master mix (0,05 U/µl Taq DNA polymerase, reaction buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM her bir dNTP) (Thermo), 50 pmol her bir primer ve 2 µl template DNA'dan oluşan 50 µl hacimde PCR master mix'i



oluşturuldu. Oluşturulan karışımlar *Lactobacillus* spp. için 94°C'de 1 dk 6n denat6rasyonu takiben 94°C'de 30 sn denat6rasyon, 52 °C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak 6zere 30 siklus ve 72°C'de 5 dk final uzama koşullarında, *L. acidophilus* için 95°C'de 5 dk 6n denat6rasyonu takiben 95°C'de 30 sn denat6rasyon, 56 °C'de 30 sn primer bağlanma, 72°C'de 30 sn uzama olmak 6zere 30 siklus ve 72°C'de 5 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon sonrasında oluşan PCR 6r6nleri ethidium bromide (2μg/ml) içeren % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile g6r6nt6lendi. Jel 6zerinde *Lactobacillus* spp. ve *L. acidophilus* için sırasıyla 230 bp ve 575 bp'lik amplifikasyon 6r6nlerinin g6r6lmesi pozitif olarak değerlendirildi.



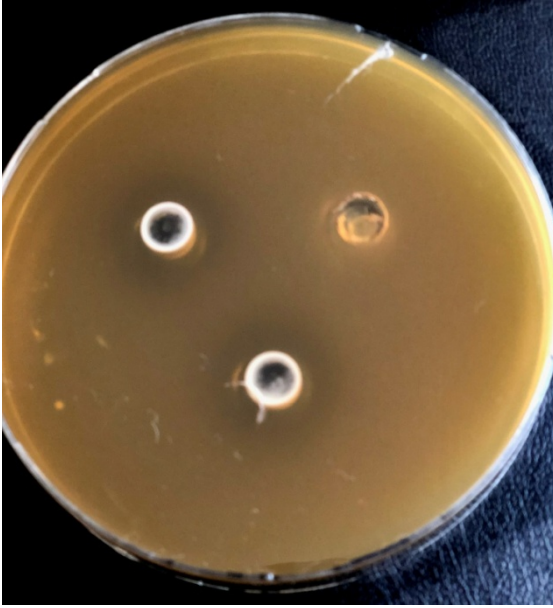
## 4.BULGULAR

### 4.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Sağlıklı görünümde olan 25 gökkuşuğu alabalığının bağırsak florasından toplamda 47 Gram pozitif, katalaz ve oksidaz aktivitesi negatif olan bakteriyel izolat elde edildi. Elde edilen izolatlar MRS agar'a ekim yapılarak, saflaştırıldı ve ilerleyen aşamadaki testlerde kullanıldı.

### 4.2. Antagonistik Aktivite Testi

Balıkların bağırsak mikroflorasından izole edilen LAB'ların, *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında agar well difüzyon testi kullanıldı. Test sonucunda toplam altı izolatın etrafında *L. garvieae*'ye karşı şeffaf inhibisyon zonu olduğu saptandı (Şekil 3) dolayısıyla bu izolatlar *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olarak değerlendirildi. Yapılan skorlama sonucu izolatlardan ikisinin orta, dördünün ise yüksek düzeyde antagonistik aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Tablo 1).



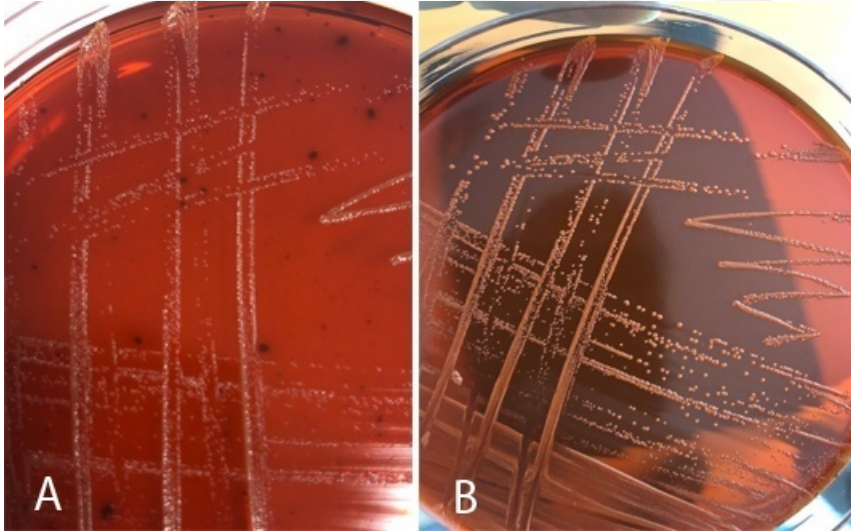
Şekil 3. *L. garvieae*'ye karşı oluşan şeffaf inhibisyon zonları.

**Tablo 1.** *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktivite gösteren LAB'lar

İzolatlar	İnhibisyon zonu (mm)	Skorlama
2	19,81	2 (orta)
9	23,27	3 (yüksek)
10	19,63	2 (orta)
19	22,79	3 (yüksek)
20	22,81	3 (yüksek)
27	20,99	3 (yüksek)

#### 4.3. Aday Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisitilerinin Belirlenmesi

*L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu belirlenen 6 izolatın % 0,03 Kongo Kırmızısı ilave edilmiş MRS agar'da 72 saat sonunda kırmızı renkli koloniler oluşturduğu saptandı. Dolayısıyla aday probiyotik bakterilerin tamamı hidrofobik olarak değerlendirildi (Şekil 4).



**Şekil 4.** İzolatların hidrofobisitilerinin belirlenmesi. A: 24 saatlik inkubasyon sonrası oluşan beyaz koloniler, B: 72 saatlik inkubasyon sonrası oluşan kırmızı koloniler.

#### 4.4. Aday Probiyotik Bakterilerin Safra Toleranslarının Belirlenmesi

Aday probiyotik bakterilerin safra tolerans testi sonuçları Tablo 2'de verildi. Buna göre izolatların 2, 10, 19 ve 27 nolu izolatların % 2,5-10 arasındaki tüm safra konsantrasyonlarına toleranslı oldukları saptandı. % 2,5 safra oranının 9 ve 20 nolu izolatların üremelerini kısmen inhibe ettikleri belirlendi.

**Tablo 2.** LAB izolatlarının farklı safra konsantrasyonlarına toleransları (kob/ml)

% safra	İzolatlar					
	2	9	10	19	20	27
0	4,0x10 <sup>8</sup>	1,3x10 <sup>8</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>8</sup>	1,86x10 <sup>8</sup>
2,5	4,45x10 <sup>8</sup>	6,0x10 <sup>7</sup>	1,7x10 <sup>8</sup>	1,53x10 <sup>8</sup>	9,0x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>
5	4,5x10 <sup>8</sup>	8,6x10 <sup>7</sup>	1,13x10 <sup>8</sup>	1,3x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>
10	4,73x10 <sup>8</sup>	1,26x10 <sup>8</sup>	1,36x10 <sup>8</sup>	1,36x10 <sup>8</sup>	1,33x10 <sup>8</sup>	1,46x10 <sup>8</sup>

#### 4.5. Aday Probiyotik Bakterilerin pH Toleranslarının Belirlenmesi

Aday probiyotik bakterilerin pH tolerans testi sonuçları Tablo 3’de verildi. Tüm izolatların 1 pH’da inhibe oldukları, 2 ve 3 pH’da ise hayatta kalabildikleri saptandı.

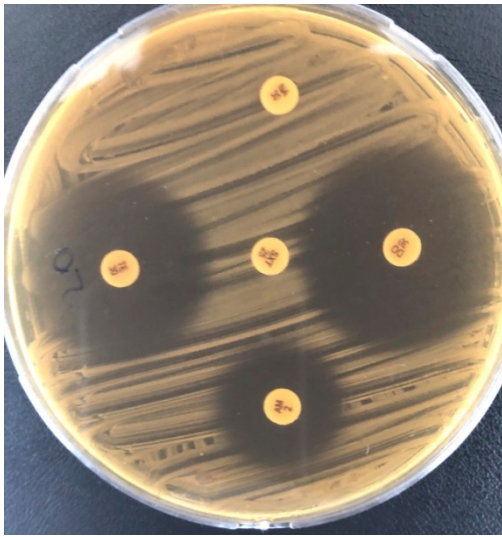
**Tablo 3.** LAB izolatların farklı pH konsantrasyonlarına toleransları (kob/ml)

pH	İzolatlar					
	2	9	10	19	20	27
1	-	-	-	-	-	-
2	1,0x10 <sup>6</sup>	6,5x10 <sup>5</sup>	7,0x10 <sup>5</sup>	8,0x10 <sup>5</sup>	9,0x10 <sup>5</sup>	5,5x10 <sup>6</sup>
3	1,27x10 <sup>8</sup>	3,9x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>7</sup>	1,3x10 <sup>8</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>

- saptanamadı

#### 4.6. Aday Probiyotik Bakterilerin Antimikrobiyal Duyarlılıkları

Potansiyel probiyotik bakterilerin 15 farklı antibiyotiğe karşı antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi ile değerlendirildi (Şekil 5).



**Şekil 5.** Disk difüzyon testinde görülen antibiyotik inhibisyon zonları.

İzolatların tamamının 5 farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlendi. Bununla birlikte izolatların tamamının amoksisilin/klavulanik asit, doksisisiklin, eritromisin, florfenikol, klortetrasiklin, penisilin ve tetrasiklin'e karşı duyarlı olduğu saptandı. İzolatların sergilediği antimikrobiyal profiller Tablo 4'de sunuldu.

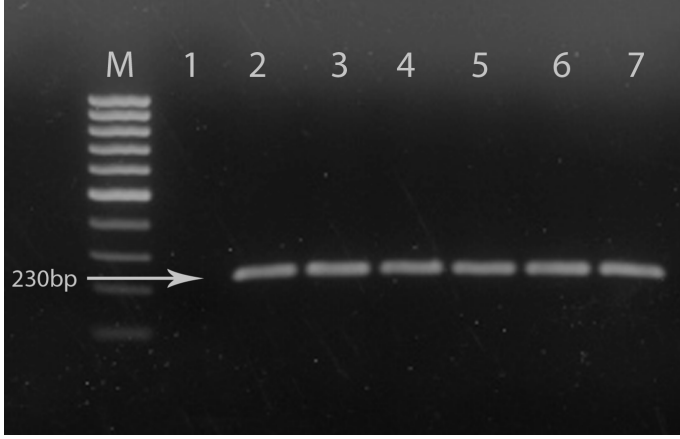
**Tablo 4.** Disk difüzyon test sonuçları ve sonuçların değerlendirilmesi

Antibiyotikler	İzolatlar					
	2	9	10	19	20	27
Amoksisilin/klavulanik asit (30 µg)	S(34)	S(36)	S(38)	S(36)	S(41)	S(40)
Ampisilin (10 µg)	R(15)	R(14)	I(17)	I(20)	S(21)	S(21)
Doksisisiklin (30 µg)	S(39)	S(36)	S(35)	S(34)	S(33)	S(34)
Enrofloksasin (5 µg)	I(18)	I(18)	S(21)	I(20)	I(19)	I(18)
Eritromisin (15 µg)	S(30)	S(27)	S(29)	S(26)	S(28)	S(27)
Florfenikol (30 µg)	S(37)	S(30)	S(36)	S(34)	S(40)	S(35)
Flumekuini (30 µg)	I(16)	R(14)	R(15)	R(14)	R(8)	R(0)
Gentamisin (10 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
Kanamisin (30 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
Klortetrasiklin (30 mcg)	S(36)	S(37)	S(38)	S(39)	S(40)	S(34)
Nalidiksik asit (30 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
Oksolinik asit (2 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
Penisilin (10 U)	S(38)	S(40)	S(39)	S(39)	S(42)	S(40)
Tetrasiklin (30 µg)	S(31)	S(26)	S(31)	S(26)	S(30)	S(30)
Trimetoprim/sulfametoksazol (1.25/23.75 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)

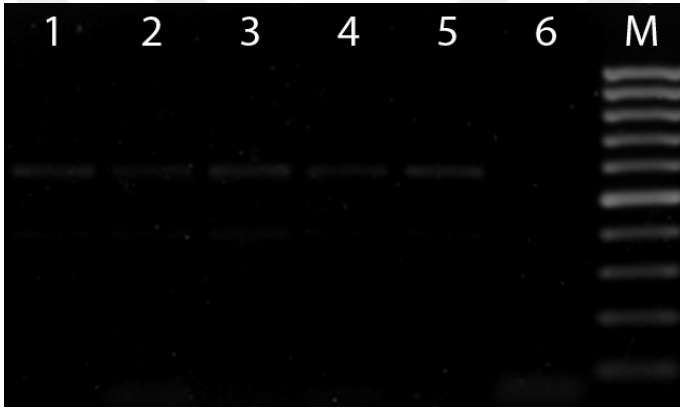
S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli

#### 4.7. Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler İdentifikasyonu

Aday probiyotik bakterilerin cins düzeyinde identifikasyonu sonucu tüm izolatların 230 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünleri verdiği saptandı (Şekil 6). Dolayısıyla tüm izolatlara *L. acidophilus* spesifik PCR uygulandı. Bu PCR uygulaması sonucunda 2, 9, 10, 19 ve 20 nolu izolatların 575 bp'lik amplifikasyon ürünü verdiği saptandı (Şekil 7) ve bu izolatlar *L. acidophilus* olarak identifiye edildi. Diğer 27 nolu izolat ise *Lactobacillus* spp. olarak değerlendirildi.



**Şekil 6.** *Lactobacillus* spp. PCR (230 bp). M; Marker (100 bp Plus DNA Marker) 1; Negatif kontrol (distile su), 2-7; Aday probiyotik bakteriler.



**Şekil 7.** *L. acidophilus* spesifik PCR (575 bp). 1-6; Aday probiyotik bakteriler, M; Marker (100 bp Plus DNA Marker)

## 5. TARTIŞMA

Balıklarda gastrointestinal kanal, çevre ile balık arasındaki etkileşimin olduğu en önemli yapılardan bir tanesidir. Bu nedenle bu kanal içerisinde LAB gibi faydalı bakterilerin bulunması olası patojenler ile karşılaşmada hayati önem taşımaktadır (Ringo ve ark., 1996). Balıkların sahip olduğu intestinal mikrobiyaya beslenme, fizyoloji ve balığın etrafında bulunan çevresel koşullardan etkilenmektedir. Dolayısıyla türler arasında değişkenlik göstermektedir (Cahill, 1990). Eskiden balıkların gastro intestinal kanal mikrobiyatasın belirlenmesinde kültüre bağımlı metotlar kullanılmaktaydı. Ancak bu tür metotları kullanımında görülen sınırlamalar, son yıllarda kültür bağımsız genetik metotların kullanımını arttırmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu balıklarda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* ve *Pediococcus* cinslerinin bağırsak florasının yerel türleri olduğu ortaya konulmuştur. Gastro intestinal kanala kolonize olan bakteriler arasında özellikle LAB'lar sindirim kanalının gelişimine katkı sağlaması, immun yanıtı uyarması ve hastalıklara karşı direnci artırması nedeniyle su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak kullanılabilir en önemli bakterilerdendir (Ringo ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında gökkuşacağı balıklarının bağırsaklarından LAB'lar izole edilmiş ve izole edilen bakterilerin probiyotik potansiyelleri ortaya konulmuştur.

Farklı balık türlerinde LAB'ların izole edildiği ve izolatların çeşitli patojenlere karşı antagonistik aktiviteye sahip olup olmadıklarının değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Balcazar ve ark. (2007), sağlıklı salmonidlerin bağırsaklarından izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis* CLFP100, *L. lactis* subsp. *cremoris* CLFP102'in *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*'a, *L. lactis* subsp. *cremoris* DSM 20069'in *L. garvieae*'ye karşı, *L. curvatus* CLFP150 izolatının ise *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Perez-Sanchez ve ark. (2011), gökkuşacağı alabalığı bağırsaklarından izole ettikleri *L. plantarum*, *L. lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Nguyen ve ark. (2017), *L. lactis* WFLU12 suşunu Japon pisi balıklarının (*Paralichthys olivaceus*) bağırsaklarından izole etmişler ve bu suşun *Streptococcus parauberis*'e karşı etkin olduğunu bildirmişlerdir. Didinen ve ark. (2018), gökkuşacağı alabalıklarının mikrobiotasından izole edilen *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. garvieae*, *P. acidilactici* ve *Lactobacillus sakei* türlerinin *Vagococcus salmoninarum*'a

karşı antagonistik etkiye sahip olduklarını, aynı izolatların *L. garvieae* 'ye karşı herhangi bir antagonistik aktivite göstermediklerini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilmiş LAB'lardan altısının *L. garvieae* 'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip oldukları belirlendi. Genetik olarak spesifik primer çiftlerinin kullanıldığı PCR metodu ile bu izolatlardan beşi *L. acidophilus* olarak biri ise *Lactobacillus* spp. olarak tanımlanmıştır.

Patojenlere karşı antagonistik etkilere sahip olan probiyotik adaylarının balıkların gastrointestinal kanalında kolonize olması ve yüksek safra konsantrasyonunu ve asidik pH'yi tolere edebilmesi istenilen en önemli özelliklerindedir. Balıkların sindirim kanalındaki fizyolojik safra konsantrasyonu %0,4-1,3 aralığında değiştiği, ancak % 2,5-10 arası konsantrasyonlardaki safradanda yararlanılabildiği bildirilmiştir (Balcazar ve ark., 2008). Bu tez çalışmasında elde edilen probiyotik bakteri adaylarının tamamının %10 safrayı tolere edebildiği belirlendi. Benzer şekilde Didinen ve ark. (2018), *V. salmoninarum*'a karşı antagonistik etki gösteren suşlardan *L. lactis* subsp. *cremoris* suşlarının ve *L. garvieae* (1-3) suşunun % 2,5-10 arasındaki tüm safra konsantrasyonlarına toleranslı olduklarını saptamışlardır. Ancak araştırmacılar bazı izolatların ise (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. garvieae* 1-4 ve *P. acidilactici* 3-5) % 2,5 safraya duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Perez-Sanchez ve ark. (2011), *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* izolatlarının % 1 safra koşullarında 3 saat inkübasyona toleranslı olduğunu saptamışlardır. Yine bir başka çalışmada Sorroza ve ark. (2012), %10 deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) safrasının dil balıklarının (*Solea solea*) bağırsaklarından izole ettikleri *V. fluvialis*'in üremesini %66,7 oranında inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Balıklarda mide pH'sı türler arasında değişkenlik göstermektedir. Örneğin gökkuşağı alabalıklarının mide pH'sı 2,5-3,5 arasında (Lavelle ve Harris, 1997) iken tilapia'larda (*Oreochromis niloticus*) bu değer 1,4-1,5 arasındadır (Getachew, 1989). Probiyotik adayı mikroorganizmaların mide pH'sından etkilenmeden geçebilmeleri için türlere özgü pH aralıklarına toleranslı olmaları gerekmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen aday probiyotik bakterilerin tamamının pH 2 ve 3 değerlerinde hayatta kalabildikleri belirlendi. Dolayısıyla izolatların tamamı gökkuşağı alabalığının midesinden etkilenmeden geçebilecek potansiye sahip olduğu ortaya konuldu. Çalışmamızda izolatların genel olarak aside dirençleri oldukları görüldü. Didinen ve



ark. (2018), probiyotik olarak değerlendirdikleri bakterileri pH 1,5-3 arasında değişken düzeyde toleransa sahip olduklarını belirlemişlerdir. Balcazar ve ark., (2008) gökkuşağı alabalıklarından izole ettikleri *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.

Probiyotik bakterilerin konakçı organizmanın bağırsak epitel hücrelerine tutunma yani kolonize olma yeteneğinin olması probiyotikler için önemli bir özelliktir (Perez-Sanchez ve ark., 2011). Probiyotik bakterilerin bağırsağa ulaşması sonrasında, bağırsaktaki peristaltik hareketler ile bağırsaktan atılmaması için bağırsak epitel hücrelerine tutunması gerekmektedir. Probiyotiklerin patojen mikroorganizmalara karşı intestinal sistemde bir bariyer oluşturarak, epitel hücrelerinin bu mikroorganizmalarla bağlanma derecesini azalttığı düşünülmektedir. Laktik asit bakterileri sahip oldukları çeşitli yüzey determinantları sayesinde intestinal epitel hücrelere adeze olabilmektedir. Laktik asit bakterilerinin adezyonunun pasif kuvvetler, elektrostatik ilişkiler, hidrofobisite, sterik kuvvetler, lipoteikoik asit ve lektinlerle kaplı özgün yapılarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Servin ve Coconnier, 2003). Bakterilerin hidrofobik özellikte olmaları, bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir (An ve Friedman, 2000; Rinkinen ve ark., 2004). Bu tez çalışmasında *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu belirlenen aday probiyotik bakterilerin intestinal mukozaya tutunma yetenekleri, hidrofobisite özelliklerinin incelenmesi ile belirlendi. Bu amaçla % 0,03 Kongo Kırmızısı ilave edilmiş MRS agar'a ekimler yapılmış ve 72 saat inkubasyon sonrası besiyeri üzerinde kırmızı renkli koloniler olduğu saptandı. Dolayısıyla aday probiyotik bakterilerin tamamı hidrofobik olarak değerlendirildi. Perez-Sanchez ve ark. (2011), *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olduklarını belirledikleri *L. plantarum* ve *L. lactis* suşlarının hidrofobik olduğunu belirlemişlerdir.

Su ürünleri sektöründe antimikrobiyal bileşikler yeme ilave edilerek yada immersiyon şeklinde kullanılmaktadır. Ancak kemoterapi uygulamaları bağırsak fizyolojisinin homeostazisini bozabilmekte ve balıkların enfeksiyonlara karşı savunmasız olmasına neden olabilmektedir. Bu bakımdan, antibiyotiklere dirençli probiyotikler balıklarda antibiyotik uygulamaları sırasında bağırsaklarda faydalı mikroorganizmaların uzun süreler boyunca yerleşmesine neden olabilir (Kim ve Austin,

2008). Ancak antibiyotik direncinin genetik mekanizmalar yoluyla diğer mikroorganizmalara transfer olabildiği gerçeği unutulmamalıdır (Marti ve ark., 2014). Dolayısıyla probiyotiklerin güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için dirençsiz organizmaların seçilmesi gerekir. Bu tez çalışmasında da probiyotik bakteri adaylarının kullanılan antibiyotiklerin en az yarısına (yedi adet) duyarlı bulunması bakterilerin probiyotik olarak kullanılabilirliği açısından önemli bir bulgudur. Ancak genetik olarak antibiyotik direnç geni veya genlerini taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi gerekir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Balık yetiştiriciliğinde probiyotikler bakterileri elimine etmek, hayvanların immun sistemini stimüle etmek, büyüme performansını artırmak ve hastalıklara karşı dirençli hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, probiyotiklerin söz konusu etkilerini hangi mekanizmalar yoluyla gösterdikleri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, genellikle, probiyotiklerin etki mekanizmaları üzerinde durulduğu ve önemli sonuçların elde edildiği görülmektedir. Bununla beraber, ani stres durumlarında direnç düştüğünde probiyotiklerin nasıl etkili olabildiği tartışmaya açık bir konu olarak güncelliğini korumaktadır. Bu nedenle yapılacak çalışmalarla bu konunun aydınlatılması amaçlanmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Altun S, Diler Ö, Adiloğlu AK. Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. Bull Eur Ass Fish Pathol, 2004;24:119-125.
- Altun S, Onuk EE, Çiftci A, Büyükekiz AG, Duman M. Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2013;19:375-381.
- Amin M, Adams M, Bolch CJ, Burke CM. In vitro screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. Aquacult Int, 2017;25(1):485-498.
- An Y, Friedman RJ. Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000.
- Austin B, Austin B. Bacterial pathogens of fish. J Appl Bacteriol, 1985;58:483-506.
- Balcazar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol, 2006;114(3-4):173-186.
- Balcazar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Girones O, Muzquiz JL. In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet Microbiol, 2007;122:373-380.
- Balcazar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Muzquiz O, Girones JL. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 2008;278(1):188-191.
- Benno Y, Mitsuoka T. Development of intestinal microflora in humans and animals. Bifidobact Microflora, 1986;5:13-25.
- Bruno MEC, Montville TJ. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol, 1993;59:3003-3010.
- Cabello FC, Godfrey HP, Buschmann AH, Dölz HJ. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. Lancet Infect Dis, 2016;16:127-133.
- Cahill MM. Bacterial flora of fishes: a review. Microb Ecol, 1990;19(1):21-41.
- Capkin E, Altinok I. Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. J Appl Microbiol, 2009;106(4):1147-1153.
- Coconnier MH, Bernet MF, Chauviere G, Servin AL. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of

- diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. J Diarrh Dis, 1993;11:235-242.
- Dalmin G, Kathiresan K, Purushothaman A. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. Indian J Exp Biol, 2001;39:939-942.
- Dhar AK, Manna SK, Allnut FCT. Viral vaccines for farmed finfish. Virus Dis, 2014;25(1):1-17.
- Didinen BI, Metin S, Onuk EE, Takmaz H, Ersoy AT. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, (*Walbaum*) rearing units against bacterial pathogens. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 2014;66:1006-1014.
- Didinen BI, Onuk EE, Metin S, Çaylı Ö. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*, *Walbaum* 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. Aquacult Nutr, 2018;24:400-407.
- Didinen BI, Yardımcı B, Onuk EE, Metin S, Yıldırım P. Naturally *Lactococcus garvieae* infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* *Walbaum*, 1792): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification. Rev Med Vet, 2014;165(1-2):12-19.
- Diler O, Altun S, Adiloglu AK, Kubilay A, Işıklı B. First Occurrence of *Streptococcosis* Affecting Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol, 2002;22:21-25.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bact, 1989;66:365-378.
- Gatesoupe FJ. 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, 1991;96:335-342.
- Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, 1999;180:48-165.
- Geraylou Z, Vanhove MPM, Souffreau C, Rurangwa E, Buyse J, Ollevier F. *In vitro* selection and characterization of putative probiotics isolated from the gut of *Acipenser baerii* (Brandt, 1869). Aquac Res, 2014;45(2):341-352.
- Getachew T. Stomach pH, feeding rhythm and ingestion rate in *Oreochromis niloticus* L. (Pisces: Cichlidae) in Lake Awasa, Ethiopia. Hydrobiologia 1989;174(1):43-48.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası (GMP) Bakanlığımızca Verilmiş veya Kabul Edilmiş Pazarlama İzinli Veteriner Biyolojik

Ürünler. <https://www.tarim.gov.tr/Konular/Veteriner-Hizmetleri/Veteriner-Saglik-Urunleri>. İnternet Erişimi: 28.05.2018.

- Gibello A, Galan-Sanchez F, Mar Blanco M, Rodríguez-Iglesias M, Domínguez L, Fernandez-Garayzabal JF. The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Res Vet Sci*, 2016;109:59-70.
- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 2000;191;259-270.
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen T. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl Environ Microbiol*, 1999;65:969-973.
- Hamdan AM, El-Sayed AFM, Mahmoud MM. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Appl Microbiol*, 2016;120(4):1061-1073.
- Hansen GH, Olafsen JA. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb Ecol*, 1999;38:1-26.
- Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis*, 2009;49:1248-1253.
- Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger GU. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol*, 1995;24:343-362.
- Hoseinifar SH, Sun Y, Wang A, Zhou Z. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, A Review of current knowledge and future perspectives, *Front Microbiol*, 2018;9:2429.
- Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis*, 2002;25(11):633-642.
- Kim DH, Austin B. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett Appl Microbiol*, 2008;47:141-147.
- Lavelle EC, Haris JE. The processing of an orally administered protein antigen in the digestive tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A*, 1997;117:263-275.
- Lemos ML, Dopazo CP, Toranzo AE, Barja JL. Competitive dominance of antibiotic-producing marine bacteria in mixed cultures. *J Appl Bacteriol*, 1991;71;228-232.
- Lin YH, Chen YS, Wu HC, Pan SF, Yu B, Chiang CM, Chiu CM, Yanagida F. Screening and characterization of LAB-produced bacteriocin-like substances from

- the intestine of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) as potential biocontrol agents in aquaculture. *J Appl Microbiol*, 2013;114(2):299-307.
- Lopez-Cazorla A, Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA. Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *J Appl Ichthyol*, 2015;31:88-94.
- Markiewicz L, Biedrzycka E. Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Polish J Food Nutr Sci*, 2005;55(4):359-365.
- Marti E, Variatza E, Balcazar JL. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol*, 2014;22(1):36-41.
- Meyburgh CM, Bragg RR, Boucher CE. *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org*, 2017;123:67-79.
- Mohapatra S, Chakraborty T, Kumar V, DeBoeck G, Mohanta KN. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 2013;97(3):405-430.
- Montes AJ, Pugh DG. The use of probiotics in food-animal practice. *Vet Med*, 1993;88:282-288.
- Mukherjee A, Ghosh K. Antagonism against fish pathogens by cellular components and verification of probiotic properties in autochthonous bacteria isolated from the gut of an Indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). *Aquacult Res*, 2016;47(7):2243-2255.
- Nandi A, Banerjee G, Dan SK, Ghosh K, Ray AK. Probiotic efficiency of *Bacillus* sp. in *Labeo rohita* challenged by *Aeromonas hydrophila*: assessment of stress profile, haemato-biochemical parameters and immune responses. *Aquac Res*, 2017;48(8):4334-4345.
- Nguyen TL, Park C-I, Kim D-H. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*, 2017;471:113-120.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius EM. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol*, 2003;15:443-452.
- Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Salminen S, Bylund G. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 2001;198:229-236.

- Niku-Paavola ML, Latva-Kala K, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A,. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol, 1999;86:29-35.
- Olsson JC, Westerdahl A, Conway P, Kjelleberg S. Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. Appl Environ Microbiol, 1992;58:551-556.
- Onuk EE, Fındık A. Balıklarda antibiyotik dirençliliği. Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji Özel Dergisi, 2015;1(2):35-41.
- Perez-Sanchez T, Balcazar JL, Garcia Y, Halaihel N, Vendrell D, De Blas I, Merrifield DL, Ruiz-Zarzuola I. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. J Fish Dis, 2011;34:499-507.
- Raa J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Rev Fish Sc, 1996;4:229-288.
- Ringo E, Birkbeck TH, Munro PD, Vadstein O, Hjelmeland K. The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. J Appl Bacteriol, 1996;81:207-211.
- Ringo E, Hossein S, Ghosh K, Doan HV, Beck BR, Song S. Lactic acid bacteria in finfish—an update. Front Microbiol, 2018;9:1818.
- Rinkinen M, Matto J, Salminen S, Westermarck E, Ouwehand AC. In vitro adhesion of lactic acid bacteria to canine small intestinal mucus. J Anim Physiol Anim Nutr, 2000;84:43-47.
- Rinkinen ML, Koort JMK, Ouwehand AC, Westermarck E, Björkroth KJ. *Streptococcus alactolyticus* is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs. FEMS Microbiol Lett, 2004;230:35-39.
- Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand AC. Absence of host specificity for in vitro adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. Vet. Microbiol, 2003;97:55-61.
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol, 2000;84:197-215.
- Safari R, Adel M, Lazado CC, Caipang CMA, Dadar M. Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. Fish Shellfish Immunol, 2016;52:198-205.



- Salinas I, Diaz-Rosales P, Cuesta A. Effect of heat-inactivated fish and nonfish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus auratus* L.). *Vet Immunol Immunopathol*, 2006;111:279-286.
- Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 1996;5:53-56.
- Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee Y. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci Technol*, 1999;10(3):107-110.
- Satish Kumar R, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul, V. Purification and characterization of enterocin MC13 produced by potential aquaculture probiont *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of Mugil cephalus. *Can J Microbiol*, 2011;57:993-1001.
- Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2003;17(5):741-754.
- Sharma KK, Soni SS, Meharchandani S. Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Veterinarski Arhiv*, 2006;76:363-366.
- Smith P, Hiney MP, Samuelson OB. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu Rev Fish Dis*, 1994;4:273-313.
- Soderhall K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*, 1998;10:23-28.
- Soltani M, Pakzad K, Taheri-Mirghaed A, Mirzargar S, Shekarabi SPH, Yosefi P, Soleymani, N. Dietary application of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 426951 enhances immune status and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2019;11(1):207-219.
- Sorroza L, Padilla D, Acosta F, Roman L, Grasso V, Vega J, Real F. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluviialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Vet Microbiol*, 2012;155:369-373.
- Subasinghe R. 2009. Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: the issues, prospects and challenges. In "Options Mediterraneennes: Serie A. Seminaires Mediterraneens; n. 86, The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture", Ed., C Rogers, B Basurco, 5-11, Zaragoza, CIHEAM.

- Sugita H, Matsuo N, Hirose Y, Iwato M, Deguchi Y. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. *Appl Environ Microbiol*, 1997;63:4986-4989.
- Sul SY, Hyun-Joong K, Tae-Woon K, Hae-Yeong K. Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using Multiplex PCR. *J Microbiol Biotechnol*, 2007;17(3):490-495.
- TOB, 2019. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Su Ürünleri İstatistikleri. <https://www.tarimorman.gov.tr/BSGM/Belgeler/Icerikler/Su%20Ürünleri%20Veri%20ve%20Dökümanları/Su-Ürünleri-İstatistikleri-Mart-2019.pdf>.
- Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int J Food Microbiol*, 1998;41:45-51.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000;64(4):655-671.
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J Fish Dis*, 2004;27:319-326.
- Vlkova E, Rada V, Popelarova P, Trojanova I, Killer J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livestock Science*, 2006;105:253-259.
- Wang A, Ran C, Wang Y, Zhang Z, Ding Q, Yang Y, Olsen RE, Ringo E, Bindelle J, Zhou Z. Use of probiotics in aquaculture of China-a review of the past decade. *Fish Shellfish Immunol*, 2019;86:734-755

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dilek PEHLİVAN

Doğum Yeri: Malatya

Doğum Tarihi: 20.01.1979

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1997- 2002, Ankara

Batıkent Lisesi, 1993-1997, Ankara

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Amasya tarım Orman aile Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı Yetiştiriciliği ve Su Ürünleri Şubesi. 2005-

E-posta: dikkepehlivan@hotmail.com