



## Gökkuşuğu Alabalığı Bağırsaklarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin *Lactococcus garvieae*'ye Karşı Probiyotik Potansiyelinin *in vitro* Olarak Belirlenmesi<sup>[\*]</sup>

Dilek PEHLİVAN Ertan Emek ONUK\*

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun, TÜRKİYE

Geliş/Received: 05.11.2020

Kabul/Accepted: 02.12.2020

Atf yapmak için: Pehlivan, D. & Onuk, E.E. (2020). Gökkuşuğu Alabalığı Bağırsaklarından İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin *Lactococcus garvieae*'ye Karşı Probiyotik Potansiyelinin *in vitro* Olarak Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(4), 647-654.

How to cite: Pehlivan, D. & Onuk, E.E. (2020). *In vitro* Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rainbow Trout Gut against *Lactococcus garvieae*. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(4), 647-654.

\* : <https://orcid.org/0000-0001-7643-046X>  
 : <https://orcid.org/0000-0001-9296-0495>

\*Sorumlu yazarın:  
Ertan Emek ONUK  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner  
Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim  
Dalı, Samsun, TÜRKİYE.  
✉: [eeonuk@omu.edu.tr](mailto:eeonuk@omu.edu.tr)  
Cep telefonu : +90 (532) 563 66 04  
Telefon : +90 (362) 312 19 19  
Faks : +90 (362) 457 69 22

**Öz:** Bu çalışmanın amacı, gökkuşuğu 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. Bu amaçla Gökkuşuğu 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. Balıkların 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 antibiyotige karşı dirençli olduğu belirlendi. Genetik identifikasyon sonucu izolatlardan beşi *Lactobacillus acidophilus* olarak tanımlandı. Bir izolat ise *Lactobacillus* spp. olarak tanımlandı. Bu çalışma ile ülkemiz kültür balığı yetiştiriciliğinde yaygın olarak görülen *L. garvieae*'nin kontrol altına alınmasında kullanılabilecek olası probiyotik bakteriler elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Gökkuşuğu alabalığı, laktik asit bakterileri, *Lactococcus garvieae*, probiyotik.

## *In vitro* Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Rainbow Trout Gut against *Lactococcus garvieae*

\*Corresponding author's:  
Ertan Emek ONUK  
Department of Aquatic Animal Diseases,  
Faculty of Veterinary Medicine, University of  
Ondokuz Mayıs, 55200 Kurupelit Samsun,  
Turkey.  
✉: [eeonuk@omu.edu.tr](mailto:eeonuk@omu.edu.tr)  
Mobile telephone : +90 (532) 563 66 04  
Telephone : +90 (362) 312 19 19  
Fax : +90 (362) 457 69 22

**Abstract:** 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. For this aim 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 from further analysis. Genetic identification of the obtained candidate probiotic bacteria was performed with PCR method. 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. 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.

[\*] Bu çalışma, yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis.

## GİRİŞ

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 vd., 2014). Ülkemiz su ürünleri sektöründe en sık karşılaşılan bakteriyel kökenli hastalık etkenlerinden birisi *L. garvieae*'dir (Altun vd., 2013; Didinen vd., 2014b). Etken balıklarda hiperakut hemorajik septisemiyle seyreden lactococcosis hastalığının etiyolojik ajanıdır (Meyburg vd., 2017). Hastalığa hem tatlı hem de tuzlu suda yetiştiriciliği yapılan balıklarda rastlanmaktadır (Gibello vd., 2016). Ülkemizde ilk hastalık bildirimini gökkuşağı alabalıklarında 2001 yılında yapılmıştır (Diler vd., 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 vd., 2004; Didinen vd., 2014b; Balta & Dengiz Balta, 2019).

Günümüzde, balıkların enfeksiyonlara karşı korunmasında aşılama ve antibiyotik uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır (Onuk & 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 vd., 1994; Heuer vd., 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 & Altınok, 2009; Didinen vd., 2014a; Didinen vd., 2018).

Gastrointestinal kanalda kolonize olan bakteriler arasında LAB'lar konakçı gastrointestinal kanalının gelişimini sağlaması, sindirim fonksiyonlarını düzenlemesi, mukozal toleransı ve immün yanıtı uyarması ve hastalıklara karşı direnci artırması 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 vd., 2018). Günümüze kadar akuakültürde yem katkı maddesi olarak LAB'ların olası kullanımlarını ele alan bir çok literatür bulunmaktadır (Lopez-Cazorla vd., 2015; Safari vd., 2016; Soltani vd., 2019). Ancak probiyotiklerin konakçı fizyolojisi üzerindeki etkilerinin tam olarak anlaşılabilmesi için halen çalışmaların yapılması gerektiği bir gerçektir (Ringo vd., 2018).

Bu çalışma ile ülkemiz su ürünleri yetiştiricilik sektöründe önemli bir yer tutan gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından LAB'lar izole edilmiş ve *in vitro* olarak *L. garvieae*'ye karşı inhibitör etki gösterdiği belirlenen izolatların probiyotik potansiyelleri yine *in vitro* testler ile değerlendirilerek, etkenin kontrolünde kullanılabilir aday probiyotik bakteriler ortaya konulmuştur.

## MATERYAL VE METOT

**Balık örneklerinin alınması:** Çalışmada laktik asit bakterilerinin izolasyonu için 25 adet sağlıklı gökkuşağı alabalığı (ort. 200 g), Samsun, Bafra, Derbent barajında bulunan ticari bir işletmeden temin edilmiştir. Rutin prosedür olarak balıklar hasat öncesi 48 saat yemlenmedikleri için sindirim kanalları temiz olmaktadır.

**Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu:** Laboratuvar şartlarında balıkların ventral yüzeyleri %70 etanol ile sterilize edildi ve diseksiyon ile her bir balığın gastrointestinal kanalı aseptik olarak çıkartıldı. Kanal içerisinde bulunan non-adherent mikrobiyom'un uzaklaştırılması için çıkartılan gastrointestinal kanal uzunlamasına enize 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 vd., 2013). Ekim yapılan besiyerleri aerobik şartlarda 28 °C'de 3-5 gün inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif olan izolatlar seçilerek MRS agar'da saflaştırıldı. İzolatlar ilerleyen aşamadaki testlerde kullanılmak üzere gliserinli buyyon (%15) içerisinde -20 °C'de saklandı.

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

**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. Patojen bakterinin ilave edildiği besiyeri steril petrilere döküldü ve 15 dakika beklendikten sonra steril durhaym tüpleri kullanılarak besiyeri üzerine kuyucuklar açıldı. 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. Inkübasyon 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, ≥26 mm) olarak skorlama yapıldı (Mukherjee & Ghosh, 2016). *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği belirlenen izolatlar sonraki testlerde kullanıldı.

**Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitesinin belirlenmesi:** *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktivite gösterdiği belirlenen aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitesini belirlemek için % 0,03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış MRS agar hazırlandı ve aday probiyotik bakteriler hazırlanmış olan bu agara ekildi. Ekim yapılan petrilere 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 vd., 2006).

**Aday probiyotik bakterilerin safra toleranslarının belirlenmesi:** Çalışmada kullanılan safra örnekleri, örnekleme yapılan alabalıklarının safra keselerinden steril enjektör yardımıyla toplandı ve kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı. Aday probiyotik bakterilerin safra toleranslarının belirlenmesi amacıyla her bir aday probiyotik bakterinin PBS içerisindeki süspansiyonları 10<sup>8</sup> 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. Inkübasyon sonrası örneklerin steril PBS içerisinde seri dilusyonları hazırlandı ve bu dilüsyonlardan 0,1 ml alınarak MRS agar'a yayma plak tekniği ile ekim yapılarak canlı bakteri sayımı yapıldı (Balcazar vd., 2008).

**Aday probiyotik bakterilerin pH toleranslarının belirlenmesi:** Aday probiyotik bakterilerin farklı pH şartlarına toleransının belirlenmesi amacıyla her bir aday probiyotik bakterinin PBS içerisindeki süspansiyonları 10<sup>8</sup> 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 inoküle edildi. Örnekler 28 °C'de 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası örneklerin steril PBS içerisinde seri dilusyonları hazırlandı ve bu dilüsyonlardan 0.1 ml alınarak MRS agar'a yayma plak tekniği ile ekim yapılarak canlı bakteri sayımı yapıldı (Balcazar vd., 2008; Perez-Sanchez vd., 2011).

**Aday probiyotik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları:** Belirlenen potansiyel probiyotik bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi ile değerlendirildi. Bu amaçla öncelikle her bir izolatın 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 swap yardımıyla ekildi. Ekim sonrası petrilere 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/sulfametazol (1.25/23.75 µg) (Bioanalyse, Türkiye) olmak üzere 15 farklı antibiyotik diski kullanıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirilen petrilere 28° C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü. Zon çaplarına göre sonuçlar duyarlı (≥ 21 mm), orta düzeyde duyarlı (16–20 mm) ve dirençli (≤ 15 mm) olarak değerlendirildi (Vlkova vd., 2006).

**Aday probiyotik bakterilerin moleküler identifikasyonu:** 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. *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 & Biedrzycka, 2005). *Lactobacillus* spp. pozitif olarak bulunan izolatlar *L. acidophilus* spesifik PCR ile identifiye edildi. 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 vd., 2007). *Lactobacillus* spp. ve *L. acidophilus* için sırasıyla 230 bp ve 575 bp'lik

amplifikasyon ürünlerinin görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

**Laktik Asit Bakterilerinin izolasyonu:** Sağlıklı görünümde olan 25 gökkuşuğu alabalığının bağırsak florasından toplamda 47 Gram pozitif, katalaz ve oksidaz aktivitesi negatif olan bakteriyel izolat elde edildi.

**Antagonistik aktivite testi:** Agar well difüzyon testi ile toplam altı izolatın etrafında *L. garvieae*'ye karşı şeffaf inhibisyon zonu oluştuğu saptandı. Yapılan skorlama sonucu izolatlardan ikisinin orta, dördünün ise yüksek düzeyde antagonistik aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Tablo 1).

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

**Table 1.** LABs that show antagonistic activity against *L. garvieae*.

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)

**Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitesinin 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.

**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 safra toleransları (kob/ml).

**Table 2.** Bile tolerance of LAB isolates (cfu/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>

**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 pH tolerans düzeyleri (kob/ml)

**Table 3.** pH tolerance level of LAB isolates (cfu/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

**Aday probiyotik bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıkları:** 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

**Table 4.** Disk diffusion test results and evaluation of these results

Antibiyotikler	İzolatlar					
	2	9	10	19	20	27
AMC (30 µg)	S(34)	S(36)	S(38)	S(36)	S(41)	S(40)
AM (10 µg)	R(15)	R(14)	I(17)	I(20)	S(21)	S(21)
DO (30 µg)	S(39)	S(36)	S(35)	S(34)	S(33)	S(34)
ENR (5 µg)	I(18)	I(18)	S(21)	I(20)	I(19)	I(18)
E (15 µg)	S(30)	S(27)	S(29)	S(26)	S(28)	S(27)
FFC (30 µg)	S(37)	S(30)	S(36)	S(34)	S(40)	S(35)
FLM (30 µg)	I(16)	R(14)	R(15)	R(14)	R(8)	R(0)
CN (10 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
K (30 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
CHT (30 mcg)	S(36)	S(37)	S(38)	S(39)	S(40)	S(34)
NA (30 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
OA (2 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
P (10 U)	S(38)	S(40)	S(39)	S(39)	S(42)	S(40)
TE (30 µg)	S(31)	S(26)	S(31)	S(26)	S(30)	S(30)
STX (1.25/23.75 µg)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)

AMC: Amoksisilin/klavulanik asit, AM: Ampisilin, DO: Doksisisiklin, E: Eritromisin, ENR: Enrofloksasin, FFC: Florfenikol, FLM: Flumequin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, CHT: Klortetrasiklin, NA: Nalidiksik asit, OA: Oksolinik asit, P: Penisilin, TE Tetrasiklin, STX: Trimetoprim/sulfametoksazol, S: duyarlı, I: Orta derece duyarlı, R: Dirençli.

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

## 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 vd., 1996). Balıkların sahip olduğu intestinal mikrobiyotaya beslenme, fizyoloji ve balığın etrafında bulunan çevresel koşullardan etkilenmektedir. Dolayısıyla türler arasında değişkenlik göstermektedir (Cahill, 1990). Eskiden balıkların gastrointestinal kanal mikrobiyotasının belirlenmesinde

kültüre bağımlı metotlar kullanılmaktaydı. Ancak bu tür metotların 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 vd., 2018).

Farklı balık türlerinde LAB'ların izole edildiği ve izolatların çeşitli patojenlere karşı antagonistik aktiviteye sahip olup olmadıklarının değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır. Balcazar vd., (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 vd., (2011) gökkuşuğu alabalığı bağırsaklarından izole ettikleri *L. plantarum*, *L. lactis* ve *Leuconostoc mesenteroides* suşlarının *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Nguyen vd., (2017) *L. lactis* WFLU12 suşunu Japon pisi balıklarının (*Paralichthys olivaceus*) bağırsaklarından izole etmişler ve bu suşun *Streptococcus parauberis*'e karşı etkin olduğunu bildirmişlerdir. Didinen vd., (2018) gökkuşuğu 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 çalışmada gökkuşuğu alabalıklarının bağırsaklarından izole edilmiş *L. acidophilus* ve *Lactobacillus* spp. izolatlarının *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Patojenlere karşı antagonistik etkilere sahip olan probiyotik adaylarının balıkların gastrointestinal kanalında kolonize olması ve yüksek safra konsantrasyonlarını ve asidik pH'yi tolere edebilmesi istenilen en önemli özelliklerindedir. Salmonid balıkların sindirim kanalındaki fizyolojik safra konsantrasyonu % 0,4-1,3 aralığında değişmektedir. Bununla birlikte aday probiyotiklerin safra tolerans düzeylerinin belirlenmesinde (*in vitro* şartlarda) % 2,5-10 arası safra konsantrasyonları kullanılmıştır (Balcazar vd., 2008). Bu çalışmada elde edilen probiyotik bakteri adaylarının tamamının %10 safrayı tolere edebildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde

Didinen vd., (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 vd., (2011) *L. lactis*, *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* izolatlarının % 1 safra koşullarında 3 saat inkübasyona toleranslı olduğunu saptamışlardır. Yine bir başka çalışmada Sorroza vd., (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 gökkuşuğu alabalıklarının mide pH'sı 2,5-3,5 arasında (Lavelle & 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 çalışmada elde edilen aday probiyotik bakterilerin tamamının pH 2 ve 3 değerlerinde hayatta kalabildikleri belirlendi. Dolayısıyla izolatların tamamı gökkuşuğu alabalığının midesinden etkilenmeden geçebilecek potansiye sahip olduğu ortaya konuldu. Didinen vd., (2018) probiyotik olarak değerlendirdikleri bakterilerin pH 1,5-3 arasında farklı seviyede toleransa sahip olduklarını belirlemişlerdir. Balcazar vd., (2008) gökkuşuğu 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 vd., 2011). Bakterilerin hidrofobik özellikte olmaları, bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir (An & Friedman, 2000; Rinkinen vd., 2004). Bu çalışmada *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteye sahip olduğu belirlenen aday probiyotik bakterilerin intestinal mukozaya tutunma yetenekleri, hidrofobisite özelliklerinin incelenmesi ile belirlendi ve aday probiyotik bakterilerin tamamı hidrofobik olarak değerlendirildi. Perez-Sanchez vd., (2011) de *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 ya da 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 & Austin, 2008). Ancak antibiyotik direncinin genetik mekanizmalar yoluyla diğer mikroorganizmalara transfer olabildiği gerçeği unutulmamalıdır (Marti vd., 2014). Dolayısıyla probiyotiklerin güvenli bir şekilde kullanılabilmesi için dirençsiz organizmaların seçilmesi gerekir. Bu çalışmada 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.

Sonuç olarak bu çalışma ile ülkemiz kültür balığı yetiştiriciliğinde yaygın olarak görülen *L. garvieae*'nin kontrol altına alınmasında kullanılacak olası probiyotik bakteriler elde edilmiştir. Patojenik mikroorganizmaları önlemek ve balık hastalıklarının görülme sıklığını azaltmak için yararlı mikroorganizmaların kullanımı yoluyla probiyotik uygulamaları giderek artan bir ilgi görmektedir. Ancak bu alanda *in vitro* probiyotik özellikle olduğu belirlenen izolatların saha şartlarında etkinliklerinin belirlenebilmesi için *in vivo* çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

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

## KAYNAKLAR

- Altun, S., Diler, Ö. & Adiloğlu A.K. (2004). Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16S rDNA sequencing. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **24**, 119-125.
- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftci, A., Büyükekiz, A.G. & Duman, M. (2013). Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19**, 375-381.
- An, Y. & Friedman, R.J. (2000). Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Balcazar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Girones, O. & Muzquiz, 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-Zarzuola, I., Muzquiz, J.L. & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, **278**(1-4), 188-191.
- Balta F. & Dengiz Balta, Z. (2019). The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, **4**(1), 27-33.
- Cahill, M.M. (1990). Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*, **19**(1), 21-41.
- Capkin, E. & Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of Applied Microbiology*, **106**(4), 1147-1153.
- Dhar, A.K., Manna, S.K. & Allnut, F.T. (2014). Viral vaccines for farmed finfish. *Virusdisease*, **25**(1), 1-17.
- Didinen, B.I., Metin, S., Onuk, E.E., Takmaz, H. & Ersoy, A.T. (2014a). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) rearing units against bacterial pathogens. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, **66**, 1006-1014.
- Didinen, B.I., Onuk, E.E., Metin, S. & Cayli, O. (2018). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792), with inhibitory activity against *Vagococcus salmoninarum* and *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture Nutrition*, **24**(1), 400-407.
- Didinen, B.I., Yardimci, B., Onuk, E.E., Metin, S. & Yildirim, P. (2014b). Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue de Medecine Veterinaire*, **165**(1-2), 12-19.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A. & Isikli, B. (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, **22**(1), 21-26.
- Getachew, T. (1989). Stomach pH, feeding rhythm and ingestion rate in *Oreochromis niloticus* L. (Pisces: Cichlidae) in Lake Awasa, Ethiopia. *Hydrobiologia*, **174**(1), 43-48.

- Gibello, A., Galan-Sanchez, F., Blanco, M.M., Rodríguez-Iglesias, M., Domínguez, L. & Fernández-Garayzábal, J.F. (2016).** The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: an overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*, **109**, 59-70.
- Heuer, O.E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I. & Angulo, F.J. (2009).** Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, **49**(8), 1248-1253.
- Kim, D.H. & Austin, B. (2008).** Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letters in Applied Microbiology*, **47**(3), 141-147.
- Lavelle, E.C. & Harris, J.E. (1997).** The processing of an orally administered protein antigen in the digestive tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, **117**(2), 263-275.
- Lin, Y.H., Chen, Y.S., Wu, H.C., Pan, S.F., Yu, B., Chiang, C.M., Chiu, C.M. & Yanagida, F. (2013).** Screening and characterization of LAB-produced bacteriocin-like substances from the intestine of grey mullet (*Mugil cephalus* L.) as potential biocontrol agents in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*, **114**(2), 299-307.
- Lopez Cazorla, A., Sica, M.G., Brugnoli, L.I., Marucci, P.L. & Cubitto, M.A. (2015).** Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyology*, **31**(1), 88-94.
- Markiewicz, L. & Biedrzycka, E. (2005).** Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species with PCR applied to quality control of fermented dairy beverages. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **14**(4), 359-365.
- Marti, E., Variatza, E. & Balcazar, J.L. (2014).** The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, **22**(1), 36-41.
- Meyburgh, C.M., Bragg, R.R. & Boucher, C.E. (2017).** *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, **123**(1), 67-79.
- Mukherjee, A. & Ghosh, K. (2016).** 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). *Aquaculture Research*, **47**(7), 2243-2255.
- Nguyen, T.L., Park, C.I. & Kim, D.H. (2017).** Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*, **471**, 113-120.
- Onuk, E.E. & Findık, A. (2015).** Balıklarda antibiyotik dirençliliği. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji Özel Dergisi*, **1**(2), 35-41.
- 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.
- Ringo, E., Birkbeck, T.H., Munro, P.O., Vadstein, O. & Hjelmeland, K. (1996).** The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**(2), 207-211.
- Ringo, E., Hoseinifar, S.H., Ghosh, K., Doan, H.V., Beck, B.R. & Song, S.K. (2018).** Lactic acid bacteria in finfish-An update. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 1818.
- Rinkinen, M.L., Koort, J.M., Ouwehand, A.C., Westermarck, E. & Björkroth, K.J. (2004).** *Streptococcus alactolyticus* is the dominating culturable lactic acid bacterium species in canine jejunum and feces of four fistulated dogs. *FEMS Microbiology Letters*, **230**(1), 35-39.
- Safari, R., Adel, M., Lazado, C.C., Caipang, C.M.A. & Dadar, M. (2016).** Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation. *Fish & Shellfish Immunology*, **52**, 198-205.
- 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**(4), 363-366.
- Smith, P., Hiney, M.P. & Samuelsen, O.B. (1994).** Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*, **4**, 273-313.
- Soltani, M., Pakzad, K., Taheri-Mirghaed, A., Mirzargar, S., Shekarabi, S.P.H., Yosefi, P. &**

- Soleymani, N. (2019).** Dietary application of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 426951 enhances immune status and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(1), 207-219.
- Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, F., Roman, L., Grasso, V., Vega, J. & Real, F. (2012).** Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, *155*(2-4), 369-373.
- Sul, S.Y., Kim, H.J., Kim, T.W. & Kim, H.Y. (2007).** Rapid identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(3), 490-495.
- Vikova, E., Rada, V., Popelarova, P., Trojanova, I. & Killer, J. (2006).** Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livestock Science*, *105*, 253-259.