

## NANOPARTİKÜL İÇERİKLİ SIVI BESİYERLERİNDE *Lactococcus garvieae* İZOLATLARININ GELİŞİM FARKLILIKLARININ SPEKTROFOTOMETRİK OLARAK BELİRLENMESİ

Şükrü Önalan<sup>1</sup>, Halil İbrahim YAVUZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzcüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 65080, Van, Türkiye

<sup>2</sup>Van Yüzcüncü Yıl Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, 65080, Van, Türkiye

E-posta: sukruonalan@yyu.edu.tr

Geliş tarihi: 28.03.2019 Kabul tarihi: 11.06.2019

**Atf bilgisi/Cite as:** Önalan Ş., Yavuz H.İ., 2019. Nanopartikül İçerikli Sıvı Besiyerlerinde *Lactococcus garvieae* İzolatlarının Gelişim Farklılıklarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi. *Menba Su Ürünleri Dergisi*, 5(1), 6-15.

**Öz:** Bu çalışmada nanopartikül halinde sıfır değerlikli demir (Fe)'in bakteriler üzerine gelişimlerinin etkilerinin pozitif-negatif etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Lactococcus garvieae* izolatlarının gelişimlerine nanopartiküllerin etki oranının hesaplanabilmesi amacıyla katı besiyerinde ekimleri ve fenotipik-moleküler identifikasyonları belirlenmesinin ardından 10ml Tryptic Soy Broth (TSB), 9ml TSB-1ml nanopartikül (NP), 5ml TSB-5ml nanopartikül, 1ml TSB-9ml nanopartikül ve 0,5ml TSB-9,5ml nanopartikül oranlarındaki besiyerlerine optik dansitesi (OD) 600nm'de 0,2 olan 100ul *L. garvieae* (LG) izolatı eklenmiştir. Çalışmada bakteri süspansiyonu eklenmemiş 10 ml TSB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kontrol grubu örnekleri hem gelişim hızı hem de inkübasyon süresi sonunda maksimum OD değerine ulaştığı görülmüştür. Nanopartikül eklemesi yapılan diğer gruplar içerisinde en hızlı gelişimin 3. grupta (5TSB+5NP+LG) olduğu, en düşük ise 5. grupta (0,5TSB+9,5NP+LG) olduğu görülmüştür. Nanopartikül içerikli besiyerlerinde maksimum bakteriyel OD gelişimleri ise sırasıyla 2. (9 TSB +1 NP + LG), 3. (5 TSB + 5 NP + LG), 4. (1 TSB + 9 NP + LG) ve 5. (0,5 TSB + 9,5 NP + LG) gruplarda olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre bakteriyel gelişim için nanopartikülün (Fe) kullanımının %50 oranında olmasının en uygun gelişim miktarı olduğu görülmektedir. Ancak besiyeri oranının %5'in altında olmasının bakteriyel gelişimi engellediği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Balık hastalıkları, *L. garvieae*, Nanopartikül, Spektrofotometrik ölçüm, Real-Time PCR

### Spectrophotometric Determination of Growth Differences of *Lactococcus garvieae* Isolates in Nanoparticles Containing Liquid Media

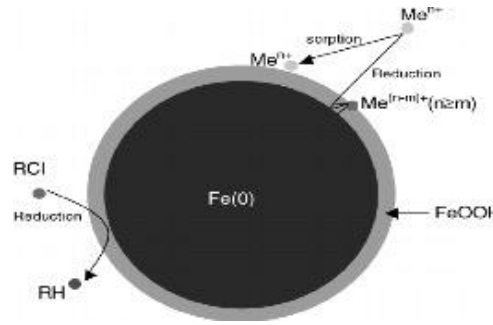
**Abstract:** In this study, it was aimed to determine the positive-negative effects of the effects of the development of nanoparticle formation on bacteria. To determine the rate of action of nanoparticles on the growth of *Lactococcus garvieae* isolates and their phenotypic-molecular identification in solid medium, 10ml Tryptic Soy Broth (TSB), 9ml TSB-1ml nanoparticle (NP), 5ml TSB-5ml nanoparticle, 1ml TSB-9ml nanoparticle and 0.5ml TSB-9,5ml nanoparticle. 100 ul of *L. garvieae* (LG) isolate was added to the media with optical density (OD) of 0.2 at 600nm. 10 ml of TSB was used as negative control with no bacterial suspension added. At the end of the study, it was found that the maximum OD was reached at the end of the control group samples and at the end of the incubation period. Among the other groups with the addition of nanoparticles, the fastest development was in the 3rd group (5TSB + 5NP + LG) and the lowest in the 5th group (0,5TSB + 9,5NP + LG). The maximum bacterial optical density development of nanoparticle containing media was 2. (9 TSB +1 NP + LG), 3. (5 TSB + 5 NP + LG), 4. (1 TSB + 9 NP + LG) and 5 (respectively). 0.5 TSB + 9.5 NP + LG groups were observed. According to these results, it is seen that the use of nanoparticle (Fe) for bacterial development is 50%. However, the rate of less than 5% of the medium inhibits bacterial growth.

**Keywords:** Fish diseases, *L. garvieae*, Nanoparticle, Spectrophotometric measurement, Real-Time PCR

## GİRİŞ

Hastalık sorunları içerisinde bakteriyel hastalıklar önemli bir yer tutmakta olup, son on yıl içerisinde gram pozitif koklar önemli balık patojenleri olarak tanımlanmışlardır. Dünyanın çeşitli yerlerinde gram pozitif patojenlerin neden olduğu birçok epidemik ve sporadik vakalar rapor edilmiştir (Arda ve ark., 2002). Singapur,

Avustralya, İsrail, İtalya, İspanya, Güney Afrika ve Amerika gram pozitif kokların neden olduğu salgınlardan etkilenmiş ülkelerin başında gelmektedir (Eldar ve ark., 1999). Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de alabalık üretimi yapılan çiftliklerde oldukça sık rastlanan başlıca patojen bakteriyel etkenler; *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Flexibacter* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia* spp., *Renibacterium* spp., *Streptococcus* spp., olarak rapor edilmektedir (Akşit, 2007). Bakteriyel balık patojenleri arasında yer alan Laktokokkozis enfeksiyonu gram pozitif bakterilerin neden olduğu hastalıklar içerisinde ekonomik kayıplara neden olan en önemli hastalıklardan birisidir. Laktokokkozis enfeksiyonu yaz aylarında su sıcaklığı 15 °C’ye ulaştığında yetiştiriciliği yapılan birçok balık türünde özellikle gökkuşağı alabalıklarında ekonomik kayıplara neden olan septisemik bir hastalıktır (Çağırğan, 2004; Diler ve ark., 2002). Laktokokkozis enfeksiyonunun etkeni *Lactococcus garvieae*’dir. *L. garvieae*, dünyada ilk defa 1974 yılında sarıkuşuk (*Seriola quinqueradiata*) balığından izole edilmiş (Kusuda ve Salati, 1999) ve neden olduğu hastalık Laktokokkozis olarak adlandırılmıştır (Austin ve Austin, 1999). Türkiye’de bu bakterinin sebep olduğu hastalık ilk defa 1992 yılı Eylül ayında Aydın’ın Karacasu ilçesindeki küçük bir aile işletmesinde görülmüş olup, aynı yıl işletmede 5 ayrı epizooti meydana gelmiştir (Çağırğan, 2007). Laktokokkozis enfeksiyonu 2008 yılı itibarıyla ülkemizde birçok bölgeye yayılmıştır (Türe ve Altınok, 2012). *L. garvieae*; Gram pozitif, hareketsiz, fermentatif, oksidaz ve katalaz negatif, %0-6,5 sodyum klorür içeren ve pH 4,5-9,6 olan besiyerinde (Cheng ve Chen, 1999), 10-45 °C arasında üreyebilen (Toranzo ve ark., 1994), 2-10 adet ovoid kok zincirleri halinde görülen bir bakteridir. Nano düzeyde, maddenin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri değişim göstermektedir. Tek tek atomların, moleküllerin ve kütlelerin niteliklerinde değişimler söz konusudur. Bu düzeyde, kimyasal kompozisyon değişmeden, bazı temel madde sabitlerinde değişimler gözlenebilmektedir. Maddenin boyutları küçüldükçe yüzey alanının hacmine oranı artmakta ve nano düzeylere ulaşıldığında bu oran olağanüstü artış göstermektedir (Baykara, 2016). Yüzeiden itibaren 500°C sıcaklıkta erimeye bağlı olarak nano parçacıklar tüm teknolojilerde büyük bir avantaj sağlayabilmektedir (Borel ve Buffat, 1976). Alevli sentez süreçlerinde, alev sıcaklığı 1000-2400°C, alevde kalma süresi 10-100 milisaniye olarak bildirilmiştir (Raab, 2011). Sıfır değerlikli nano demirin yüzey alanı çok geniş olduğundan dolayı granüle demire nazaran reaksiyon hızı ve indirgeme kapasitesi 25-30 kat daha yüksek olmaktadır. Bu özelliği ile nano malzemelerin normal işlevinin dışında farklı etki mekanizmasının da olması muhtemeldir (Cook, 2009).



Şekil 1. Sıfır değerlikli nano demirin çekirdek kabuk modeli (Cook, 2009).



## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Hayvan deneyleri yerel etik kurulunun 01.03.2018 tarih ve 2018/2 nolu kararı ile alınan izin sonrasında gerçekleştirilmiştir. Denemeler, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatları kültür halinde muhafaza edilen bakterilerden kullanılmıştır. Çalışma gruplarında kullanılan sıfır değerlikli nano-demir Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkez laboratuvarında elde edilmiştir.

### Mikrobiyolojik identifikasyon

TSA besiyerinde 21 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası gelişen bakterilerin Gram boyaması için lam üzerinde 1 damla % 0,6'lık FTS damlatılarak karıştırılan bakteri süspansiyonu alevden 3 kez geçirilerek sabitlenmiştir. Ardından 1 dk kristal viole, 1 dk lügol, 15 sn alkol ve 1 dk safranin ile muamele edilerek boyama işlemi tamamlanmıştır. Kurumaya bırakılan preparatlar önce 4X sonra sırası ile 10X, 40X ve 100X'lik büyütmelemler ile binoküler mikroskopta (Leica ICC50 HD) incelenmiştir. Gram boyama sonrasında mavi-mor renk alan izolatlar Gr (+), kırmızı-pembe renk alan izolatlar Gr (-) olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 1995). Oksidaz testi için Bactident Oksidase ticari kiti kullanılmıştır. TSA besiyerinde 21°C'de 24 saat inkübasyon süresi sonrasında üreyen kolonilerden steril öze yardımı ile bir miktar alınarak oksidaz kiti ile ıslatılmış steril filtre kağıtlarına sürülmüştür. 30 saniye içerisinde kâğıt yüzeyindeki renk değişimleri incelenmiştir. Mavi renk oluşumu oksidaz pozitif değerlendirilirken, herhangi bir renk oluşmaması ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Çağırğan, 2007). Katalaz testi için lam üzerine 1-2 damla % 3'lük hidrojen peroksit damlatılıp üzerine TSA besiyerinde 21 °C'de 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında üreyen kolonilerden steril öze ile karıştırılmıştır. Lam üzerinde oksijen açığa çıkışına bağlı olarak gaz oluşturan izolatları katalaz pozitif, herhangi bir gaz oluşumu gözlemlenmeyen izolatlar ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Austin ve Austin, 1999). İzolatların biyokimyasal özellikleri API Rapid ID 32 Strep ile belirlenmiştir. Bu amaçla Kanlı Agar (BA) besiyerinde 21 °C'de 24 saat inkübasyon periyodu sonrasında gelişen kolonilerden süspansiyon içerisine steril swap ile McFarland 4 yoğunluğa kadar inoküle edilmiştir. Bakteri süspansiyonu reaktif için 55 µl olarak dağıtılmıştır. API Stribi 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar API okuma tablosundan üretici firmanın talimatları doğrultusunda değerlendirilmiştir (Önalın ve Arabacı, 2016).

### Moleküler identifikasyon

*L. garvieae* izolatının moleküler olarak tür teşhisinin belirlenmesi için 16S rRNA gen bölgesi kullanılmıştır. 16S rRNA gen bölgesine ait Primer assay Primerdesign (UK) ile sentezlenmiştir. RealTime-PCR için hazırlanan karışım sırasıyla; DNase ve RNase bulundurmeyen su, primer assay, SYBRGreen qPCR Master mix ve genomik DNA'dan oluşmaktadır. Toplam hacim 25 µl olarak ayarlanmıştır. RT-PCR bileşenleri ve karışım miktarları aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1.** *L. garvieae* izolatlarının tür teşhisi için RT-PCR'da kullanılacak karışımın bileşenleri ve miktarları

PCR Bileşenleri	Miktar
2X SYBRGreen qPCR Master Mix	11 µl
DNase-RNase içermeyen su	9 µl
Primer assay	3 µl
Template DNA	2 µl
Toplam hacim	25 µl

Örneklerin 16S rRNA spesifik gen bölgelerinin çoğaltılması RotorGene Q (Qiagen) ile gerçekleştirilmiştir. İlk adımda 95 °C'de 10 dakikalık bir denatürasyon işleminin ardından 94 °C'de 60 sn, 60 °C'de 45 sn ve 72 °C'de 60 sn 45 döngü takip etmiştir. Son uzama işlemi 72 °C'de 7 dk'da tamamlanmıştır. Real-Time PCR işlemi sonrasında elde edilen sigmoidal eğrilerin ct değerlerine göre pozitif-negatif sonuçlar değerlendirilmiştir.



### Nanopartiküllerin sıvı formda hazırlanması

Çalışmada Sodyum-bor-hüdrür hidrojen kaynağı ve indirgen olarak kullanılmıştır. Bu amaçla sodyum bor hüdrür demir tuzlarından nanoörgü yapılı 0 değerlikte (ZeroValent-NanoIron) parçacıkların sentezlenmesinde kullanılmıştır. Reaksiyon 20-25 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında aglomerasyonu engellemek için borhidür 0.1 M'lık demir tuzu çözeltisine yavaş yavaş eklenmiştir. Her iki reaktan saf su içinde çözülmüştür (Raab, 2011).

### Farklı oranlarda nanopartikül içerikli besiyeri ortamlarının hazırlanması

TSA besiyerinde gelişen *L. garvieae* izolatları TSB sıvı besiyerine ekilerek 24 saat 21 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Taze kültür bakterilerin yoğunlukları spektrofotometre cihazı (DR500-Hach) ile 600nm de 0,2 OD ye ayarlanmıştır. Aynı şartlarda ve eşit yoğunlukta bulunan izolatlar farklı oranlarda sıvı nanopartikül içeren besiyerlerine eklenerek gelişimlerine bağlı olarak spektrofotometrik gelişimleri her 2 saatte bir ölçülmüştür. Ölçüm işlemi gelişimlerin duraksadığı saate kadar gerçekleşmiştir. Bu amaçla ilk grupta 10ml TSB besiyerine 0,2 OD yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan 100 µl ekilmiştir. İkinci grupta 9ml TSB 1 ml sıvı nanopartikül içeren ortama 0,2 OD yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan 100 µl ekilmiştir. Üçüncü grupta 5ml TSB 5 ml sıvı nanopartikül içeren ortama 0,2 OD yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan 100 µl ekilmiştir. Dördüncü grupta 1ml TSB 9 ml sıvı nanopartikül içeren ortama 0,2 OD yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan 100 µl ekilmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2.** Çalışma düzeneği ve gruplar

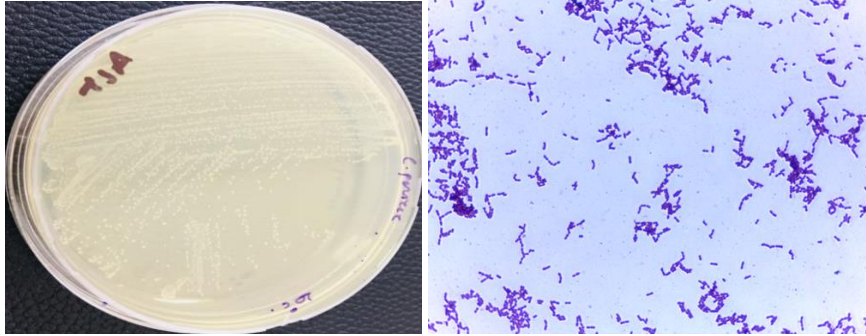
Grup No	Grup düzenekleri	Tekerrür Grupları
1.Grup (Kontrol)	10ml TSB, 100 µl LG	10ml TSB, 100 µl LG
2. Grup	10ml TSB, 100 µl LG	10ml TSB, 100 µl LG
3. Grup	9ml TSB, 1ml Nano sıvı 100 µl LG	9ml TSB, 1ml Nano sıvı 100 µl LG
4. Grup	5ml TSB, 5ml Nano sıvı 100 µl LG	5ml TSB, 5ml Nano sıvı 100 µl LG
5. Grup	1ml TSB, 9ml Nano sıvı 100 µl LG	1ml TSB, 9ml Nano sıvı 100 µl LG
6. Grup	0,5ml TSB, 9,5ml Nano sıvı 100 µl LG	0,5ml TSB, 9,5ml Nano sıvı 100 µl LG

Örnekleri aynı inkübatör içerisinde 22 °C'de inkübasyona bırakılarak her 2 saatte bir 600nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler Graphpad Prism 8.0 programı ile grafiksel olarak değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

### Mikrobiyolojik sonuçlar

Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının Gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, hareketsiz oldukları tespit edilmiştir. TSA besiyerinde bakterilerin krem renkli düzgün kenarlı morfolojik görünüm verdikleri görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. TSA besiyerinde gelişen *L. garvieae* izolatı ve Gram boyama görüntüsü

### Biyokimyasal test sonuçları

İzolatların biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla API Rapid ID 32 Strep (Biomerioux) ile gerçekleştirilen test sonrasında colorimetrik olarak manuel okuma sonrasında elde edilen test sonuçları aşağıda verilmiştir. Bu sonuçlara doğrultusunda izolatların %94 doğrulukta *L. garvieae* izolatı oldukları belirlenmiştir (Tablo 3).

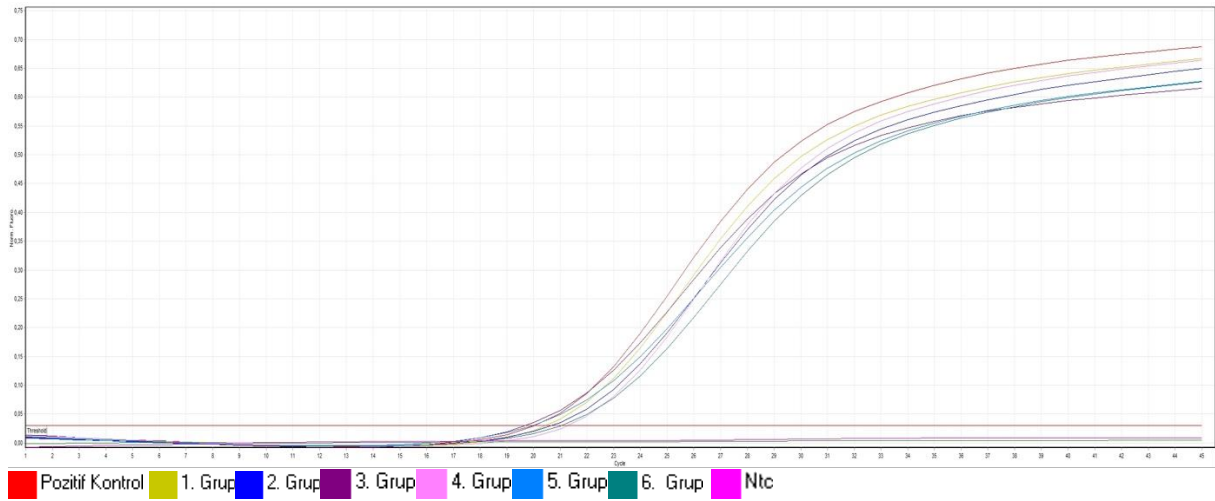
**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan *L. garvieae* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

Test	Sonuç	Test	Sonuç	Test	Sonuç	Test	Sonuç
ADH	+	SOR	-	BNAG	-	SAC	+
bGLU	+	LAC	+	GTA	-	LARA	-
bGAR	-	TRE	+	HIP	-	DARL	-
bGUR	-	RAF	-	GLYG	-	MBDG	+
AGAL	-	VP	+	PUL	-	TAG	+
PAL	-	APPA	+	MAL	+	BMAN	-
RIB	-	BGAL	-	MEL	-	CDEX	+
MAN	+	PYRA	+	MLZ	-	URE	-

\* (+): Pozitif, (-): Negatif

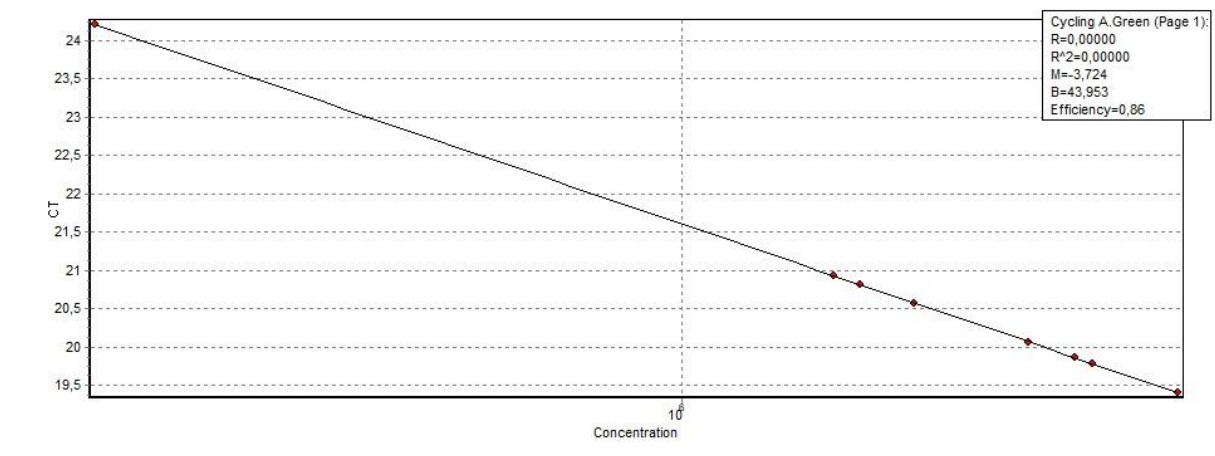
### Moleküler sonuçlar

Çalışmada 6 farklı grup için ayrı ayrı kullanılan *L. garvieae* izolatlarının Real-Time PCR ile gerçekleştirilen tür teşhisi teyidinde tüm bakteriyel DNA'lar ile sigmoidal eğriler vererek ve otomatik Ct değerinin üzerinde bulunarak pozitif oldukları görülmüştür. Analizde bir adet pozitif kontrol (*L. garvieae* referans ATCC 49156 suşu), 1 adet ise negatif kontrol (İlki DNA'sız diğer bileşenler) kullanılmıştır. (Şekil 3).



Şekil 3. *L. garvieae* izolatlarının Real-Time PCR teşhis görüntüsü

SYBRGreen tabanlı gerçekleştirilen Real-Time PCR (Rotor Gene Q) analizi sonrasında PCR ampliconları ile Standart Curve tablosu elde edilmiştir. Bu analiz için kantitasyon oluşturulurken 3 adet external standart kullanılmıştır. Analiz sonuçlarına doğrultusunda; Primer bağlanma kararlılığının, en küçük kopya değerine karşılık gelen eşik değerinin ve örnekler arası Ct oranının medyan ortalamasının optimum değerlere çok yakın oldukları görülmüştür (Şekil 4).

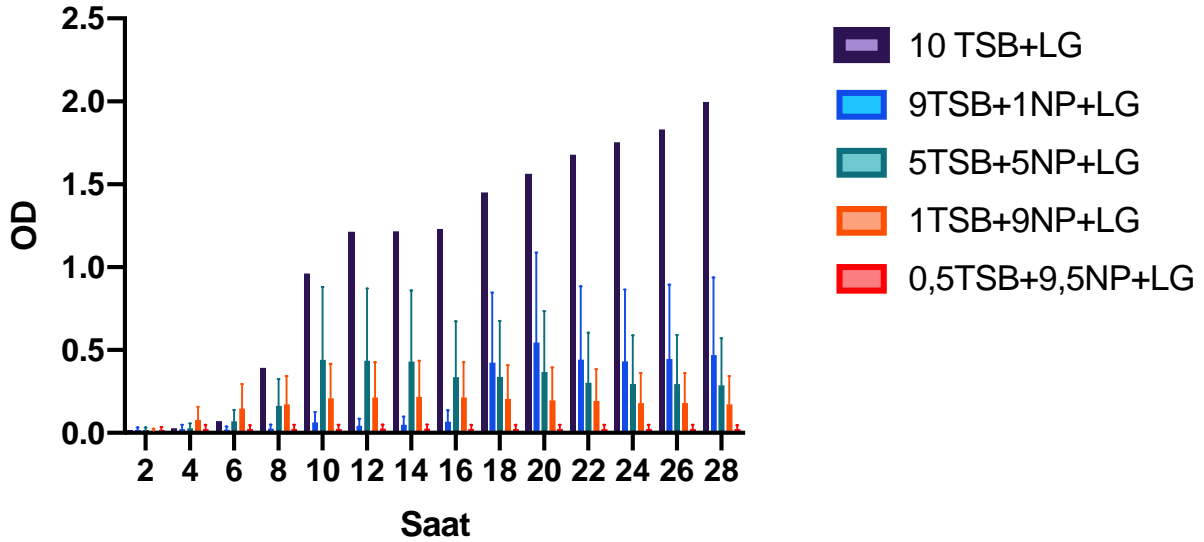


Şekil 4. Real-Time PCR sonrası gerçekleştirilen Standart Curve analizi sonucu.

### Spektrofotometrik sonuçlar

Besiyerinde geliştirilen ve fenotipik bazı özellikleri belirlenen bakteriler 600 nm'de 0,6 OD yoğunlukta hazırlanarak farklı yoğunlukta nanopartikül Fe içeren ortamlara (10ml TSB<sup>[1]</sup>100 mikrolitre *L. garvieae*, 9ml TSB, 1ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae*, 5ml TSB, 5ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae*, 1ml TSB, 9ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae* ve 5ml TSB, 9,5ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae*) inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. Ardından 600 nm dalga boyunda 0,000 yoğunluk 0. saat olarak hesaplanmıştır. Her grubun bakteriyel artış miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kontrol grubu olarak kullanılan 1. grupta (TSB+LG) hem bakteriyel gelişim hızının hem de inkübasyon süresi sonunda maksimum yoğunluğa aynı hacim içerisinde ulaşıldığı görülmüştür. Nanopartikül eklemesi yapılan diğer gruplar içerisinde en hızlı gelişim başlangıç seviyesinin 3. grupta (5TSB+5NP+LG) olduğu en düşük ise 5. grupta (0,5TSB+9,5NP+LG) olduğu görülmüştür. Nanopartikül içerikli besiyerlerinde maksimum bakteriyel yoğunluk

gelişimleri ise sırasıyla 2. (9TSB+1NP+LG), 3. (5TSB+5NP+LG), 4. (1TSB+9NP+LG) ve 5. (0,5TSB+9,5NP+LG) gruplarda olduğu gözlenmiştir. Elde edilen veriler ile oluşturulan OD yoğunluk değişim grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Farklı nanopartikül (Fe) içerikli besiyeri ortamlarında bakteriyel gelişimlerin 28 saatlik yoğunluk değişim grafiği.

## TARTIŞMA

Su ürünleri alanında gerçekleştirilen mikrobiyal çalışmalarda besiyeri temelli akademik çalışmalar sıklıkla yürütülmektedir. Bu kapsamda besiyerinde bakterilerin izolasyonları gerçekleştirilen çalışmaların temel basamağını oluşturmaktadır. Bu aşamada karşılaşılan sorunlar çalışma sonuçlarını temelde etkilemektedir. Ayrıca kantitatif PCR çalışmalarında bakteriyel yoğunlukla doğru orantılı olarak DNA miktarları da büyük öneme sahiptir. Bakteri üzerinden gerçekleştirilecek mikrobiyolojik ve moleküler çalışmalarda bakterilerin geliştiği ortamların etkileri çalışmanın amacına göre değişmektedir. Ayrıca fenotipik ve biyokimyasal çalışmalarda da besiyeri farklılıklarına göre analiz sonuçları reaksiyona bakterilerin verdikleri kolorimetrik sonuçlarda değişmektedir. Besiyerlerinin içerikleri aynı zamanda spesiviteyi belirlemektedir. Günümüzde ticari olarak satılan besiyerleri bulunmasına karşın bazı çalışmalarda besiyeri muhteviyatının manuel olarak dizaynı ve hazırlanması gerekebilmektedir. Bu çalışma nanopartikül halinde elde edilen sıfır değerlikli Fe kullanılarak *L. garvieae* üzerindeki olumlu/olumsuz etkileri incelenmiş ve farklı bakterilerin direnç aralıklarına göre ekonomik olarak uygun fiyatlarda elde edilebilecek nanopartiküllerin besiyerlerinde bakterilerin duyarlılıklarına göre farklı oranlarda katılarak spesifik besiyerlerinin daha uygun maliyetli olarak elde edilebilmesi amacıyla yürütülmüştür.

Çalışmada gerçekleştirilen Gram boyama, katalaz, oksidaz ve hareket testleri neticesinde elde edilen sonuçlar *L. garvieae*'ye ait oldukları görülmüştür. Birçok araştırmacı tarafından aynı etken üzerinde gerçekleştirilen değişik çalışmalarda mikrobiyolojik özellikleri yönünden benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Çağırğan, 2004; Duman ve ark., 2018). Benzer şekilde biyokimyasal testler yönünden elde edilen sonuçlar birçok araştırmacının API kitleri ile gerçekleştirdikleri sonuçlar ile örtüşmektedir. Ancak, aynı türe ait biyokimyasal testlerde izolatları arası farklılıklar ve kullanılan besiyeri, inkübasyon sıcaklıkları farklılıkları veya izole edilen konak farklılığı nedeniyle bazı biyokimyasal test sonuçlarında farklılıklar olduğu da bildirilmiştir (Çağırğan, 2004; Önalın ve Arabacı, 2016; Duman ve ark., 2018).

Bakteriyel çalışmalarda DNA izolasyonunda sıklıkla ticari kitler kullanılmaktadır. Bu kitlerin kullanımı bakteri izolasyonunun dokudan (Ibraheem ve ark., 2017), sıvıdan, besiyerinden (Prasad ve ark., 2018) ve materyal üzerinden (Torres ve Kelley, 2018) alınmasına göre değişiklik göstermektedir. Her bir çalışmanın spesivitesine göre kullanılan ticari kitler değişmektedir. Bakteriyel etkenlerin moleküler identifikasyonu amacıyla birçok araştırmacı 16S rRNA gen bölgesini kullandıklarını belirtmişlerdir (Önalın ve Arabacı, 2016; Ibraheem ve ark.,



2017; Ürkü ve Önal, 2017). Bazı araştırmacılar kendi primer setlerini dizayn ettiklerini (Zlotkin ve ark., 1998; Önal ve Arabacı, 2016) belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise gen bölgesi spesifik primer assaylar sentezlenerek Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin moleküler olarak identifikasyonları teyit edilmiştir.

Sıfır değerlikli nano demir ile benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak genellikle endüstriyel alanda olmakla birlikte sıfır değerlikli nano demir kullanılarak gerçekleştirilmiş bazı çalışmalar bildirilmiştir (Chew ve Zhang, 1999; Choe ve ark., 2000).

Besiyerinde geliştirilen ve fenotipik bazı özellikleri belirlenen bakteriler 600 nm'de 0,6 OD yoğunlukta hazırlanarak farklı yoğunluktaki nanopartikül (Nano-Fe) içeren ortamlara (10ml TSB+100 mikrolitre *L. garvieae*, 9ml TSB, 1ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae*, 5ml TSB, 5ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae*, 1ml TSB, 9ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae* ve 5ml TSB, 9,5ml Nano sıvı 100 mikrolitre *L. garvieae*) inokülasyonları gerçekleştirilmiştir. Ardından 600 nm dalga boyunda 0,000 yoğunluk 0. Saat olarak hesaplanmıştır. Her grubun bakteriyel artış miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kontrol grubu olarak kullanılan 1. grafik sütunlarında (TSB+LG) hem başlangıç sonrası bakteriyel gelişim hızının hem de inkübasyon süresi sonunda maksimum yoğunluğa aynı hacim içerisinde ulaşıldığı görülmüştür. Bunun yanında nanopartikül eklemesi yapılan diğer gruplar içerisinde en hızlı gelişim başlangıç ivmelenmesinin 3. grupta (5TSB+5NP+LG) olduğu en düşük oran ise 5. Grupta (0,5TSB+9,5NP+LG) olduğu görülmüştür. Nanopartikül içerikli besiyerlerinde maksimum bakteriyel yoğunluk gelişimleri ise sırasıyla 2 (9TSB+1NP+LG), 3 (5TSB+5NP+LG), 4 (1TSB+9NP+LG) ve 5 (0,5TSB+9,5NP+LG) gruplarda olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre bakteriyel gelişim için nanopartikülün (Fe) kullanımının %50 oranında olmasının en uygun gelişim miktarı olduğu görülmektedir. Ancak %5 oranında besiyeri içeren ortamda ise neredeyse bakteriyel gelişimin olmadığı da görülmektedir. Dolayısıyla besiyeri kullanımının bir bakteriye spesifik çalışmalardan ziyade farklı nanopartikül kullanımı ile bakteriyel gelişimlerde farklılık gösteren türler arasında kullanımının daha uygun olacağı anlaşılmıştır. Sonuçta, bakteri türlerine göre tolerans aralığı farklılıklarından yola çıkılarak spesifik besiyeri geliştirmede nano boyutta hazırlanan malzemeler ile besiyerlerinin optimize edilebileceği ve farklı sonuçlar oluşabileceği düşünülmektedir.

### **Teşekkür**

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen FBA-2018-7040 nolu proje ile gerçekleştirilmiştir.





## KAYNAKLAR

- Akşit, D., 2007. Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, VFT-YL-2007-0001.
- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftci, A., Büyükekiz, A.G., ve Duman, M., 2013. Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 19, 375-381.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyüpoglu, M., 2002. Balık Hastalıkları, Medisan Yayın Serisi, 1. Baskı, Ankara.
- Austin, B., ve Austin, D.A., 1999. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 3rd (Revised) Edition. Praxis Publishing, Chichester, UK.
- Baykara, T., 2016. Nanoteknolojiler Dünyasına Doğru Ankara, Nobel Yayıncılık.
- Bilgehan, H., 1995. Klinik mikrobiyolojik tanı, 2. Baskı, Fakülteler Kitapevi, Barış Yayınları, s: 641-705, Ankara.
- Borel, J.P., ve Buffat, PH., 1976. Size effect on the melting temperature of gold particles. Nano ACS, 2-23.
- Cheng, W., ve Chen, J.C., 1999. Effect of Cultivation Broth pH, Temperature and NaCl Concentration on Virulence of an Enterococcus-like Bacterium to The Giant Freshwater Prawn. Dis. Aquat. Org., 36, 233–237.
- Chew, C.F., ve Zhang, T.C., 1999. Abiotic degradation of nitrites using zero-valent iron and electrokinetic processes. Environmental Engineering Science, 16(5), 389–401.
- Choe, S., Chang, Y.Y., Hwang, K.Y., Khim, J., 2000. Kinetics of reductive denitrification by nanoscale zero-valent iron, Chemosphere, 41,1307–1311.
- Cook, S.M., 2009. Assessing the Use and Application of Zero-Valent Iron Nanoparticle.
- Çağırğan, H., 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, (21): 3-4, 267–269.
- Çağırğan, H., 2007. Gökkuşluğu Alabalığı Hastalıkları. Doğu Anadolu Kalkınma Programı, Tarım ve Kırsal Kalkınma Bileşeni.
- Diler, O., Altun, S., Adıloğlu, A., Kubilay, A., ve Işıklı, B., 2002. First Occurance of Streptococcosis Affecting Farmed Rainbow Trout in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22(1) 21-26.
- Duman, M., Satıcıoğlu, I., Altun, S., 2018. Biochemical Differences and Rapid Identification of *Yersinia ruckeri* and *Lactococcus garvieae* Isolated from Aquaculture. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 37 (1), 37-47. DOI: 10.30782/uluvfd.399275.
- Eldar, A., Goria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A., ve Bercovier, H., 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia. Appl. Environ. Microbiol. March 1999 vol. 65 no. 31005-1008.
- Ibraheem, A.S., Önalın, Ş., ve Arabacı, M., 2017. Investigation of zoonotic disease pathogens (*Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus iniae*) seen in carp farms in the Northern Iraq-Erbil region by molecular methods. In AIP Conference Proceedings (Vol. 1833, No. 1, p. 020077). AIP Publishing.
- Kusuda, R., ve Salati, F., 1999. *Enterococcus seriolicida* and *Streptococcus iniae*. Fish Disease Lab. Faculty of Agriculture Kochi University Nankoku Kochi 783.
- Önalın, Ş., ve Arabacı, M., 2016. Van, Bitlis, Muş ve Hakkari illerinde bulunan gökkuşluğu alabalığı çiftliklerinden elde edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarının fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.



- Prasad, N., Singh, K., Gupta, A., ve Prasad, K.N., 2018. Isolation of bacterial DNA followed by sequencing and differing cytokine response in peritoneal dialysis effluent help in identifying bacteria in culture negative peritonitis. *Nephrology*, 23(2), 148-154.
- Raab, C., 2011. Production of nanoparticles and nanomaterials, Institute of Technology Assesment of the Austrian Academy of Science.
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S., ve Barja, J.L., 1994. Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by an Enterococcus-like Bacterium. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14: 19–23.
- Torres, P.J., ve Kelley, S.T., 2018. Sampling, Extraction, and High-Throughput Sequencing Methods for Environmental Microbial and Viral Communities. In *Next Generation Sequencing* (pp. 163-173). Humana Press, New York, NY.
- Türe, M., ve Altınok, İ., 2012. PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi. TAGEM/HS/10/09/02 /179, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü-Trabzon.
- Ürkü, Ç., ve Önalın, Ş., 2017. Determination of *Lactococcus garvieae* in cultured rainbow trout by different diagnostic techniques.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C., ve Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 36(4), 983-985.