

# Gökkuşığı Alabalıklarından İzole Edilen Potansiyel Probiyotik Bakterilerin Hidrofobisite, Safra ve pH Toleranslarının Tespiti

Behire Işıl Didinen<sup>1</sup>, Alper Çiftçi<sup>2</sup>, Esengül Morsümbül<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği. Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye;

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul Tarihi / Accepted: 11.12.2017

**Özet:** Bu çalışmada, gökkuşığı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen bakterilerin, *Lactococcus garvieae*'ye karşı in vitro antagonistik etkileri, hidrofobisite, safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına toleransları araştırıldı. Bu amaçla sağlıklı 20 adet gökkuşığı alabalığının (250 g) bağırsaklarından bakterilerinin izolasyonu yapıldı. İzole edilen 157 adet bakterinin Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanılarak *L. garvieae*'ye karşı antagonistik aktiviteleri belirlendi. Dört izolat *L. garvieae*'ye karşı in vitro antagonistik etki gösterdi. Antagonistik suşların fenotipik özelliklerinin saptanmasında geleneksel testler, API 20 NE ve API STREP test kitleri; moleküler identifikasyon için, *L. garvieae* spesifik PCR ve 16S rRNA gen sekans analizi kullanıldı. Çalışmanın sonucunda, aday probiyotik suşlar, *Aeromonas sobria* (TUB/2013/L63), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) ve *L.garvieae* (TUB/2013/L32) hidrofobik (bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyetinde), safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına(balığın sindirim sisteminde hayatta kalma özelliğinde) toleranslı bulundu.

**Anahtar kelimeler:** *Aeromonas*, *Bacillus*, *Lactococcus garvieae*, *Oncorhynchus mykiss*, Probiyotik, hidrofobisite, safra ve pH toleransı

## Determination of Hydrophobicity, Bile and pH Tolerances of Potential Probiotics Isolated From Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)

**Abstract:** In this study, bacterial isolates from the intestines of rainbow trout were investigated for in vitro antagonistic effects against *Lactococcus garvieae*, hydrophobicity, bile salts and low pH conditions. For this purpose, bacteria were isolated from the intestines of 20 healthy rainbow trout (250g). Antagonistic activities of 157 bacterial isolates against *L. garvieae* by Agar Well Diffusion method. Four isolates showed antagonistic effect against *L. garvieae* in vitro. Phenotypic characteristics of antagonistic strains were determined by conventional tests, API 20 NE and API STREP test kits. For molecular identification, *L. garvieae* specific PCR and 16S rRNA gene sequence analysis were used. As a result of the study, candidate probiotic strains, *Aeromonas sobria* (TUB / 2013 / L63), *Bacillus* sp. (TUB / 2013 / L97) and *L. garvieae* (TUB / 2013 / L32) were found hydrophobic (ability to bind to intestinal epithelial cells), bile salts and low pH conditions (ability of the fish to survive in the digestive system).

**Key words:** Fish, Probiotic, Hydrophobicity, Bile and pH Tolerances

## Giriş

Hemorojik septisemi ile karakterize sistemik bir enfeksiyon olan Laktokokkozis özellikle su sıcaklığının 16°C'nin üzerine çıktığı yaz aylarında etkili olmakta ve gökkuşığı alabalıklarında her boyda (porسیونluk ve anaçlar dahil) yüksek mortaliteye neden olması sebebiyle balık işletmelerinde büyük ekonomik kayıplar yaratmaktadır [15]. Laktokokkozis ülkemizde ise ilk defa 2001 yılında Ege bölgesindeki gökkuşığı alabalığı işletmelerinde görülmüş ve o tarihten itibaren ülkemizde görülme sıklığı artmıştır [2,11,19]. Su ürünleri yetiştiriciliğinde *Lactococcus garvieae* salgınları antibiyotiklerle tedavi edilmektedir. Bununla birlikte, tedaviler sıklıkla başarısız

olmakta ve antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı antibiyotik direncinin artmasına sebep olmaktadır [24].

Akuakültürde hastalıkların görülme sıklığını azaltmak için, antibiyotik tedavilerine alternatif olarak probiyotiklerin kullanımına ilişkin çalışmalar artmıştır [5]. Potansiyel probiyotik suşlar farklı etki mekanizmaları ve özellikler göstermektedirler. Bu etki mekanizmaları ve özellikler arasında pH'yı düşürmek suretiyle patojenlere antagonistik etki gösterme, antibakteriyel maddeler üretme, besinler ve tutunma bölgeleri için rekabet, vitamin ve enzim üretmeleri, kolonizasyon ya da tutunma yetenekleri ve bağışıklık sistemini güçlendirme yer almaktadır [1,12].

Probiyotik suşlar, sucul hayvanların kendi mikrofloralarından ya da buldukları ortamdan izole edilmektedir. Etkili probiyotik bakterilerin keşfedilmesi için, aday probiyotik bakteriler sıklıkla ön eleme işleminden geçirilirler [25]. Bu işlem, öncelikle *in vitro* antagonizm, tutunma ve bağırsak mukusunda gelişme özelliklerinin belirlenmesi ile başlamaktadır [14,26].

Bu çalışmada, gökkuşuğu alabalıklarının bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin *in vitro* şartlar altında *L. garvieae*'ya karşı antogonistik etkileri, tür düzeyinde teşhisleri, balıkların mide bağırsak kanalında hayatta kalabilme yetenekleri (safra tuzları ve düşük pH şartlarına tolerans) ve bağırsak epitel hücrelerine tutunma özellikleri (hidrofobisite) belirlenmiştir.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada kullanılan 20 adet sağlıklı gökkuşuğu alabalığı (ort.250 g) Isparta ili sınırları içerisindeki iki işletmeden temin edildi.

### Aday probiyotik bakterilerin fenotipik karakterizasyonları

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

### Aday probiyotik bakterilerin moleküler analizi

**L. garvieae spesifik PCR:** İzolatların DNA ekstraksiyonları prensibi spin kolon ile filtrasyon sistemine dayanan ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific, GeneJET Genomic DNA Purifikasyon Kiti) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. *L. garvieae*'nın moleküler identifikasyonu tür spesifik pLG-1 (5'-CATAACAATGAGAATCGC-3') ve pLG-2 (5'-GCACCCTCGCGGT-TG-3') oligonukleotid primer setinin kullanıldığı PCR metodu ile gerçekleştirildi [27]. Bu amaçla PCR amplifikasyonunda DEPC'li su, 1xPCR çözümü, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, her bir dNTP'den 0.2 mM, 1.0 U Taq polimeraz (Fermentas), 1µM her bir primer ve 5 µl hedef DNA içeren 25 µl'lik PCR karışımı oluşturuldu. Oluşturulan bu karışım Thermo PxE termal

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

**16S rRNA sekans analizi:** *L. garvieae* spesifik PCR ile identifiye edilemeyen izolatların 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi Macrogen (Seoul, Kore) firmasının 16S rRNA tam sekanslama servisi tarafından Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer kullanılarak gerçekleştirildi. Özetle, izolatlara ait 16S rRNA gen bölgesi 27F (AGAGTTTGATC-MTGGCTCAG) ve 1492R (TACGGYTACCTT-GTTACGACTT) üniversal primerlerinin kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. PCR ürünü saflaştırıldıktan sonra 785F (GGATTAGATACCCTGGTA) ve 907R (CCGTCAATTCMTTTRAGTTT) primerleri kullanılarak sekans analizi gerçekleştirildi. Elde edilen sekans dizgileri Genbank kütüphanesinde bulunan referans sekanslar ile Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak karşılaştırıldı.

### Potansiyel Probiyotik Bakterilerin İzolasyonu ve *L. garvieae*'ya Karşı *in vitro* Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etki gösteren aday probiyotik bakterilerin seçimi yapıldı. Bu amaçla antagonistik etki gösterebilecek aday probiyotik bakterilerin izolasyonu sağlıklı 20 adet gökkuşuğu alabalıkların (ort. 250g) bağırsaklarından yapıldı. Bunun için bağırsaklar steril şartlar altında kesilip Steril Peptonlu Su ile homojenize edildikten sonra seri dilüsyonları(10<sup>-1</sup>-10<sup>-8</sup>) hazırlandı ve Triptik Soy Agar (TSA)'a ekimler yapılarak, 22°C'de 48 saat inkübe edildi [6]. Balıkların bağırsak mikroflorasından izole edilen bakterilerin *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkilerinin araştırılmasında Agar Kuyu Difüzyon yöntemi kullanıldı [13].

## Hidrofobisite Testi

Aday probiyotik bakterilerin hidrofobisitelemlerini belirlemek için %0.03 Kongo Kırmızısı (Sigma-Aldrich) karıştırılmış TSA hazırlandı. Kongo kırmızısı TSA'nın sterilizasyonundan sonra eklendi. Aday probiyotik bakteriler Kongo kırmızısı ilave edilen TSA'ya ekildi ve 25°C' de 24 saat inkübe edildi. Kırmızı koloniler pozitif (hidrofobik) ve beyaz veya renksiz koloniler ise negatif (non-hidrofobik) olarak değerlendirildi [23].

## Safra tuzlarına ve düşük pH şartlarına tolerans Testleri

Aday probiyotik bakterilerin PBS içerisindeki süspansiyonları 10<sup>7</sup> kob/ml olarak hazırlandı. Gökkuşuğu alabalıklarından safra kesesinin patlatılmasıyla safra örnekleri toplandı ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Bakteriyel süspansiyon, %, 0,6, 1 ve 1.5 safra içeren PBS içerisine inoküle edildi. Örnekler 22°C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra steril PBS içinde seyreltilerek, TSA'da bakteri sayımı yapıldı. Aday probiyotik bakterilerin farklı pH şartlarına toleransının belirlenmesi için farklı pH değerlerine (pH 2-7) sahip PBS içerisinde 10<sup>7</sup> kob/ml olarak hazırlanan süspansiyonları 22°C'de 1.5 saat inkübe edildikten sonra steril PBS içinde seyreltilerek TSA'da bakteri sayımı yapıldı [4,20].

## İstatistiksel hesaplamalar

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

## Bulgular

### Aday Probiyotik Bakterilerin Fenotipik Karakterizasyonları

*L. garvieae*' ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakterilerin geleneksel metotlarla, API 20 Strep ve API 20 NE hızlı teşhis kitleriyle belirlenen belirlenen fenotipik özellikleri Tablo 1 ve Tablo 2'te verilmiştir.

### Aday Probiyotik Bakterilerin Moleküler Analizi

*L. garvieae* spesifik PCR analizi sonucu TUB/2013/L32 ve TUB/2013/L95 no'lu izolatların *L. garvieae*

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

**Tablo 1.** *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösteren Gram Pozitif Kokların geleneksel metotlarla ve API 20 STREP ile belirlenen fenotipik özellikleri

	TUB/2013/L32	TUB/2013/L95
Gram boyama	Pozitif kok	Pozitif kok
Hareket	-	-
Oksidaz	-	-
Katalaz	-	-
O/F Testi	F	F
VP	+	+
Hippurat hidrolizi	-	-
Eskulin hidrolizi	+	+
Piyrolidonil arylamidaz	+	+
α-Galaktosidaz	-	-
β-Glukuronidaz	-	-
β-Galaktosidaz	-	-
Alkalin fosfataz	-	-
Lösin arilamidaz	+	+
Arjinin dihidrolaz	+	+
<i>Asit üretimi:</i>		
Riboz	+	+
L-Arabinoz	-	-
Mannitol	-	-
Sorbitol	-	-
Laktoz	-	-
Trehaloz	+	+
İnülin	-	-
Rafinoz	-	-
Niştasta	+	+
Glikojen	-	-

**Tablo 2.** *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösteren diğer izolatların geleneksel metotlarla ve API 20 NE ile belirlenen fenotipik özellikleri

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

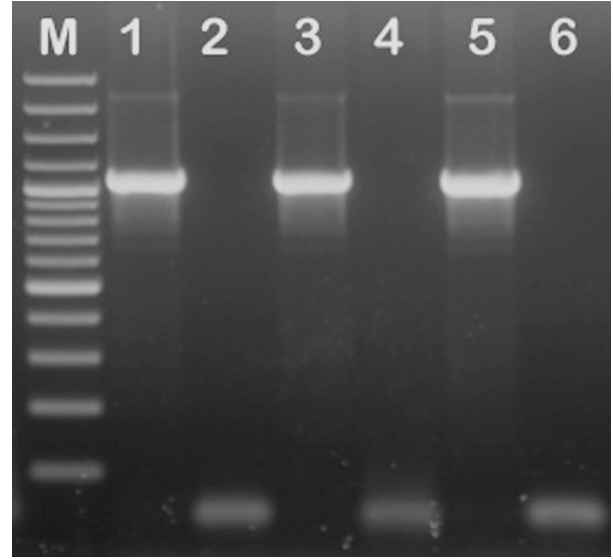
### Potansiyel Probiyotik Bakterilerin *L. garvieae*'ya Karşı *in vitro* Antagonistik Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen 157 suştan 4'ünün *L. garvieae*'ya karşı *in vitro* antagonistik etki gösterdikleri saptandı (Tablo 3).

### Potansiyel Probiyotik Bakteri Suşlarının Hidrofobisite, pH ve Safra Toleransları

*L. garvieae* (TUB/2013/L95) hariç, diğer antagonistik suşların hidrofobik özellikte, başka bir deyişle

non spesifik olarak konakçının bağırsak epiteline tutunma kabiliyetlerinin oldukları belirlenmiştir. Antagonistik suşların tamamı, düşük pH şartlarına ve safra tuzlarına dirençli bulunmuşlardır (Tablo 4 ve Tablo 5 ) (p>0.05).



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

**Tablo 3.** *L. garvieae*'ya karşı inhibitör aktivite gösteren bakteriyel izolatlar

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

**Tablo 4.** Farklı pH şartlarında aday probiyotik suşların toleransı (log kob/ml, SD\*)

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

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

**Tablo 5.** Farklı safra konsantrasyonlarına aday probiyotik suşlarının toleransı (log kob/ml, SD\*)

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

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

## Tartışma

Patojen oldukları bilinen *Vibrio* spp., *A. sobria* ve *A. hydrophila* gibi bakterilerin apatojen suşları balık ve karides kültüründe probiyotik bakteri olarak kullanılmaktadır [7,14,17]. Sazan balıklarının (*Cyprinus* sp.) sindirim sisteminde izole edilen *A. sobria* GC2 suşunun *A.salmonicida*, *L.garvieae*, *S.iniae*, *V.anguillarum*, *V.ordalii* ve *Y.ruckeri*'ye karşı antagonistik etkileri saptanmıştır [7]. Bir çalışmada, ergin gökkuşuğu alabalıklarının yetiştiricilik sularından izole edilen *Vibrio* sp. A3 ve A8 suşları ile *Aeromonas* sp. A1, A5 ve G1 suşlarının *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkisi olduğu rapor edilmiştir [9]. Benzer şekilde, bu çalışmada gökkuşuğu alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *A. sobria* (TUB/2013/L63) suşunun *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda potansiyel probiyotik *L. garvieae* suşlarının, patojen *L. garvieae*'ye karşı antagonistik etkisi saptanmıştır. Benzer şekilde, daha önce yapılan çalışmalarda, gökkuşuğu alabalıklarının bağırsaklarından [10] ve yetiştiricilik suyundan [9] izole edilen *L. garvieae* suşlarının, patojen *L. garvieae*'yi inhibe edici özellik gösterdikleri belirtilmektedir.

Brunt ve ark. [7] gökkuşuğu alabalıklarının sindirim sisteminden izole ettikleri *Bacillus* sp.'nin *L. garvieae* ve *Streptococcus iniae*'ye karşı etki antagonistik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Benzer şekilde, çalışmamızda *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97)'nin *L. garvieae*'ya karşı antagonistik etkisi saptanmıştır.

Bağırsak epitel hücrelerine tutunma kabiliyeti (konakçıya kolonizasyon), potansiyel probiyotik suşlar için önemli bir özelliktir. Pozitif hidrofobisite sonuçları bakterilerin bağırsak epitel hücrelerine

tutunma kabiliyetlerinin olduğunu göstermektedir [3,21]. Bu çalışmada da, izole edilen *L.garvieae* (TUB/2013/L95) suşunun hidrofobisite göstermediği; diğer üç suşun (*L. garvieae* TUB/2013/L32, *Bacillus* sp. TUB/2013/L97 ve *A.Sobria* TUB/2013/L63) hidrofobik özellikte oldukları saptanmıştır. Benzer şekilde, gökkuşuğu alabalıklarının yetiştiricilik sularından izole edilen *L. garvieae* ve *Aeromonas* spp. [9], hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole edilen *Bacillus infantis*'in [8] hidrofobik özellikte oldukları bildirilmiştir.

Yüksek ölçüde hidrofobik özelliğe sahip suşların asite ve safraya dirençli olmaları nedeniyle mide bağırsak boşluğu boyunca daha çok hayatta kalma kabiliyetine sahiptirler ve potansiyel olarak balığın bağırsak yüzeyine kolonize olabilmektedirler [18]. Probiyotik suş seçiminde kullanılan safra konsantrasyonları için araştırmacılar arasında bir fikir birliği sağlanamamıştır. Bazı araştırmacılar %10 safra konsantrasyonuna kadar toleransın tespit edilmesini önerirken [18], diğer bir kısmı %1'e kadar toleransın tespitinin yeterli olduğu görüşünü bildirmişlerdir [20]. Öyle ki, Balcázar ve ark. [4], salmonid balıklarda bağırsaktaki fizyolojik safra konsantrasyonunun %0.4-1.3 arasında hesapladığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, çalışmamızda aday probiyotik bakterilerin % 0.6, 1 ve 1.5 safra konsantrasyonlarına toleransları araştırılmış ve antagonistik etki gösteren suşların tamamının safra tuzlarına toleranslı oldukları saptanmıştır. Dharmaraj ve Rajendren [8], hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole ettikleri *Bacillus infantis*'in %2.5 safra konsantrasyonunda 3 saat sonra %63.33'ünün hayatta kalabildiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Sansawat ve Thirabunyanon [22], tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak kanallarından izole ettikleri *B.subtilis* P33 ve72 suşlarının % 0.3 safra konsantrasyonunda 24 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, Didinen ve ark. [10], gökkuşuğu alabalıklarının bağırsaklarından izole ettikleri *L. garvieae* 1-3 suşunun %2.5-10 safra konsantrasyonlarına tolerans gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gökkuşuğu alabalıklarının mide pH'larının 2.5-3.5 olduğu bildirilmiştir [16]. Bu nedenle aday probiyotik suşların bu aralıklardaki pH değerlerine toleranslı olması mideden geçişleri esnasında hayatta kalmalarını sağlayacağı düşünülmüştür. Bu

çalışmada aday probiyotik suşların tamamının 2-3 pH şartlarında hayatta kalabildikleri saptandı. Dharmaraj ve Rajendren [8] de, hint sazanlarının (*Labeo rohita*) bağırsaklarından izole etikleri *B.infantis*'in 2 pH'da hayatta kalabildiğini bildirmişlerdir. Sansawat ve Thirabunyanon [22], tatlı su karideslerinin (*Macrobrachium rosenbergii*) mide-bağırsak boşluklarından izole edilen *B.subtilis* P33 and 72 suşlarının pH 2.5'da 3 saat süreyle hayatta kalabildiklerini belirtmişlerdir. Didinen ve ark. [10] aday probiyotik *L. garvieae* 1-3 suşunun 2.5 pH şartlarında hayatta kalabildiğini belirtmişlerdir.

Sonuç olarak, bu çalışmada gökkuşluğu alabalıklarının bağırsaklarından izole edilen *L.garvieae* (TUB/2013/L32), *L. garvieae* (TUB/2013/L95), *Bacillus* sp. (TUB/2013/L97) ve *A.sobria* (TUB/2013/L63) suşlarının *L. garvieae*'ya karşı inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Antagonistik suşlar arasında *L.garvieae* (TUB/2013/L95) hidrofobisite göstermemiştir. Diğer suşlar in vitro şartlarda probiyotik (hidrofobik, yüksek safra ve düşük pH şartlarına dirençli olma) özellik göstermişlerdir. Gelecekteki çalışmalarda bu aday probiyotiklerin gökkuşluğu alabalıklarında patojeniteleri belirlendikten sonra, balıkların yemlerine ilave edilerek *L. garvieae*'ye karşı hastalık direnci üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Aguirre-Guzmán G, Lara-Flores M, Sánchez-Martínez JG, Campa-Córdova AI, Luna-González A, (2012). The use of probiotics in aquatic organisms: A review. Afr J Microbiol Res. 6(23), 4845-4857.
2. Altun S, Diler O, Adilolu AK, (2004). Genotyping of Lactococcus garvieae strains from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by 16S rDNA sequencing. Bull Europ Assoc Fish Pathol. 24(2), 119-125.
3. An Y, Friedman RJ, (2000). Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications, Totowa, New Jersey, Humana Press.
4. Balcázar JL, Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL, (2006). The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol. 114, 173-186.
5. Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Gironés O, Múzquiz JL, (2007). In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet Microbiol.122, 373-380.
6. Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Múzquiz JL, Gironés O, (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278,188-191.
7. Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B, (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J Fish Dis. 30, 573-579.
8. Dharmaraj R, Rajendren V, (2014). Probiotic assessment of Bacillus infantis isolated from gastrointestinal tract of Labeo rohita. Int J Sci Res Pub. 4(7), 1-6.
9. Didinen BI, Metin S, Onuk EE, Takmaz H, Ersoy AT, (2014). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from Rainbow Trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum) rearing units against bacterial pathogens. Isr J Aquacult. 66, 1-8.
10. Didinen BI, Onuk EE, Metin S, Cayli O, (2017). 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 Nut. 00, 1-8 (DOI: 10.1111/anu.12571).
11. Diler Ö, Altun S, Adiloğlu AK, Kubilay A, Işıklı BI, (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol. 22(1), 21-26.
12. Ganguly S, Paul I, Mukhopadhyay SK, (2010). Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in Aquaculture, A Review. Isr J Aquacult. 62(3), 130-138.
13. Hjelm M, Bergh O, Riaza A, Nielsen J, Melcheiørsen J, Jensen S, Duncan H, Ahrens P, Birkbeck H, Gram L, (2004). Selection and identification of autochthonous candidate probiotic bacteria from Turbot larvae (Scophthalmus maximus) rearing units system. Appl Microbiol. 27, 360-371.
14. Irianto A, Austin B, (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J Fish Dis. 25, 333-342.
15. Kusuda R, Salati F, (1999). Enterococcus seriolicida and Streptococcus iniae. In "Fish Diseases and Disorders" Vol, 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections (Woo and Bruno, Eds.), CABI Publishing, pp. 303-312.
16. Lavelle EC, Haris JE, (1997). The processing of an orally administered protein antigen in the digestive tract of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Compar Biochem Physiol A. 117, 263-275.
17. Mujeeb RKM, Jesmi Y, Thomas AP, Mohamed HAA, (2010). Probiotic effect of Bacillus NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of Macrobrachium rosenbergii (de Man). Aquacult Res. 41, 120-134.
18. Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand A, (2001). Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. Appl Environ Microbiol. 67, 2430-2435.
19. Öztürk T, Didinen BI, Doğan G, Özer A, Bircan R, (2013). Lactococcosis in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) in the Middle Black Sea Region in Turkey and antimicrobial susceptibility of the aetiological agent, Lactococcus garvieae. Etlik Vet Mikrobiyol Derg. 24, 7-12.

20. Perez-Sanchez T, Balcazar JL, Garcia Y, Halaihel N, Vendrell D, De Blas I, Merrifield DL, Ruiz-Zarzuola I, (2011). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis.* 34, 499–507.
21. Rinkinen M, (2004). Methods for assessing the adhesion of probiotic and canine gut-derived lactic acid producing bacteria to the canine intestinal mucosa in vitro and measuring mucosal secretory IgA, Academic dissertation. PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland.
22. Sansawat A, Thirabunyanon M, (2009). Anti-Aeromonas hydrophila activity and characterisation of novel probiotic strains of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tract of giant freshwater prawns. *Maejo Int J Sci Technol.* 3(1), 77–87.
23. Sharma KK, Soni SS, Meharchandani S, (2006). Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Vet Arhiv.* 76, 363–366.
24. Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Girone's O, Mu'zquiz L, (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 29, 177–198.
25. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W, (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64, 655–671.
26. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T, (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J Fish Dis.* 27, 319–326.
27. Zlotkin A, Eldar A, Ghittino C, Bercovier H, (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol.* 36, 983–985.