



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BALIK BAĞIRSAK İZOLATI *Sphingomonas* sp. BAKTERİSİNİN  
PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HÜSEYİN ÇAKAR**

**Tez Danışmanı**

**Doç. Dr. SEVDAN YILMAZ**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

**BALIK BAĞIRSAK İZOLATI *Sphingomonas sp.* BAKTERİSİNİN PROBİYOTİK  
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜSEYİN ÇAKAR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. SEVDAN YILMAZ

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)  
kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2021-3525

ÇANAKKALE – 2023



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Hüseyin ÇAKAR tarafından Doç. Dr. Sevdan YILMAZ yönetiminde hazırlanan ve 17/03/2023 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Balık Bağırsak İzolatı *Sphingomonas* sp. Bakterisinin Probiyotik Potansiyelinin Araştırılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Doç. Dr. Sevdan YILMAZ  
(Danışman)

Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ali KÜÇÜKER

.....  
.....  
.....

Tez No : 10534189  
Tez Savunma Tarihi : 17/03/2023

Doç. Dr. Yener PAZARCIK  
Enstitü Müdürü

.././20..

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Hüseyin ÇAKAR

17/03/2023

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Sevdan YILMAZ, alışma sũresince tũm zorlukları benimle gũęũsleyen, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşime teőekkũrlerimi sunarım.

Hũseyin ÇAKAR  
anakkale, Mart 2023



## ÖZET

### BALIK BAĞIRSAK İZOLATI *Sphingomonas* sp. BAKTERİSİNİN PROBİYOTİK POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Hüseyin ÇAKAR

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sevdan YILMAZ

17/03/2023, 16

Bu çalışmanın amacı, balık bağırsağı izolatu olan *Sphingomonas* sp.'nin balıklara karşı antagonistik etkisini araştırmaktır. Sıvı kültür inhibisyon testi analizi ile *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazının *Lactococcus garvieae* SY-LG1 türü üzerine antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, *Yersinia ruckeri* E42, *Vibrio (Listonella) anguillarum* ve *Vibrio crassostreae* SY-VC10 türleri üzerinde tam olarak antagonistik etkisi görülememiştir. Bu çalışmada sıvı kültür inhibisyon testi sonucunda *Sphingomonas* sp. bakterisinin balık patojeni bakteriler üzerine etkisi ilk defa araştırılmış ve *Lactococcus garvieae* SY-LG1 türü üzerine antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak, ileriki çalışmalar da *Sphingomonas* sp. kesin tür tanısının yapılması ve aday probiyotik türün enzim üretim kabiliyeti, pH direçliliği, hidrofobisitesi, safra toleranslılığı gibi testlerinin yapılması gerekmektedir. Tüm bu testler sonucunda *Sphingomonas* sp. bakterisinin balık yemlerine ilave edilerek balıkların *L. garvieae* patojenine karşı dirençliliğinin araştırılmasına da ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Balık hastalığı, Sıvı kültür inhibisyonu, Çevre dostu yem katkıları, Antogonizm

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF THE FISH INTESTINAL ISOLATE *Sphingomonas* sp.

HÜSEYİN ÇAKAR

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Animal Science

Advisor/Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sevdan YILMAZ

17/03/2023, 16

The idea of this study is to investigate the antagonistic effect of *Sphingomonas* sp. against fish pathogens. The liquid culture inhibition test analysis showed that *Sphingomonas* sp. has an antagonistic effect on *Lactococcus garvieae* SY-LG1. However, the effect has not been fully observed on *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, *Yersinia ruckeri* E42, *Vibrio (Listonella) anguillarum* and *Vibrio crassostreae* SY-VC10. In this study, the effect of *Sphingomonas* sp. on fish pathogenic bacteria was investigated for the first time through a liquid culture inhibition test and it was found that it had an antagonistic effect on *Lactococcus garvieae* SY-LG1. However, further studies are still needed for the definitive species diagnosis of *Sphingomonas* sp. and further tests such as enzyme production ability, pH resistance, hydrophobicity, and bile tolerance of the candidate probiotic isolates are encouraged. At the end of all these tests, it is also needed to investigate the resistance of fish against *L. garvieae* pathogen through dietary incorporation of *Sphingomonas* sp. in fish feeds.

**Keywords:** Fish disease, Liquid culture inhibition, Environment friendly feed additives, Antagonism



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

1

## İKİNCİ BÖLÜM

### KURUMSAL ÇERÇEVE VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

4

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

6

3.1. Probiyotik bakteriden antimikrobiyal üst fazın elde edilmesi.....	6
3.2 Sıvı Kültür İnhibisyon Testi.....	7

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

8

4.1. Bulgular.....	8
4.2. Tartışma .....	11

BEŞİNCİ BÖLÜM  
SONUÇ ve ÖNERİLER

13

5.1. Sonuç.....	13
5.2. Öneriler.....	13
KAYNAKÇA .....	14
ÖZGEÇMİŞ .....	I



## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
mL	Mililitre
SKİ.	Sıvı Kültür İnhibisyonu
ÜR.	Üreme Ortamı
%	Yüzde oranı
CFU	Colony forming unit



## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Türkiye Su Ürünleri Üretim Miktarı ve Değerleri	2
<b>Tablo 2</b>	Türkiye Su Ürünleri Yetiştiriciliği Miktarı (ton)	3
<b>Tablo 3</b>	Çalışmada kullanılan patojen bakteri bilgileri ve üretim koşulları	7



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	<i>Lactococcus garvieae</i> SY-LG1 bakterisinin <i>Sphingomonas</i> sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm	8
Şekil 2	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658 bakterisinin <i>Sphingomonas</i> sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm	9
Şekil 3	<i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i> bakterisinin <i>Sphingomonas</i> sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm	9
Şekil 4	<i>Yersinia ruckeri</i> E42 bakterisinin <i>Sphingomonas</i> sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm	10
Şekil 5	<i>Vibrio crassostreae</i> SY-VC10 bakterisinin <i>Sphingomonas</i> sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm	10

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Yerküre de hızla artan nüfus tüketime yönelik doğal bitki ve hayvan stokları üzerinde baskısını giderek arttırmaktadır. Bu durum bir çok alanda alternatif üretim tekniklerinin kullanılmasına ve ürün oluşturulması esnasında insan sağlığı açısından uygun olmayan muadil kaynak kullanım miktarının artmasına neden olmuştur. Günümüzde artan sağlık sorunları ve beslenme bozuklukları nedeniyle insanların sağlıklı gıdaya yönelimi hız kazanmıştır. İçeriğindeki esansiyel aminoasitler, esansiyel yağ asitleri, vitaminler ve mineraller bakımından zengin bir gıda olarak balık tam da bilinçli tüketicinin ihtiyaçlarını karşılar niteliktedir (Kaya vd., 2004; Pal vd., 2018).

Artan talep doğrultusunda yetiştiricilik yoluyla balık üretimi giderek artmıştır. 2016 yılında Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından sunulan raporda su ürünleri yetiştiriciliği gıda tarım ürünleri üretimi arasında en hızlı büyümeyi gösteren kalem olmuştur. Takip eden 2018 yılında benzer bir rapor Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yayımlanmış ve su ürünleri sektörü diğer tarım sektör kalemleri arasında en fazla gelişim gösteren sektör olmuştur.

Türkiye yerkürede yetiştiriciliği yapılan su ürünleri içerisinde uzun yıllar boyunca avcılık yoluyla üretimin yoğun olduğu bir ülke durumundayken son yıllarda yetiştiricilik yoluyla yapılan üretim avcılık yoluyla yapılan üretimi geçmiştir. Ülkemizde, özellikle açık denizlere taşınan kafes balıkçılığı ile yetiştiricilik yoluyla balık üretiminde önemli artışlar görülmüştür (Ergün vd., 2020). Ayrıca, Türkiye son yıllarda açık denizde üretimi yapılan Türk Somonu ile de gündemde olan bir ülke olmuştur.

**Tablo 1.** Türkiye Su Ürünleri Üretim Miktarı ve Değerleri

Yıl	Avcılık		Yetiştiricilik		Toplam	
	Miktar (ton)	Değer (₺)	Miktar (ton)	Değer (₺)	Miktar (ton)	Değer (₺)
2010	485.939	1.078.51	167.141	1.066.778.60	653.080	2.145.293.8
		5.200		0		00
2011	514.755	1.143.27	188.790	1.270.028.14	703.545	2.413.300.3
		2.172		0		12
2012	432.442	1.209.02	212.410	1.605.293.70	644.852	2.814.322.1
		8.426		0		26
2013	374.121	1.188.43	233.394	1.704.471.15	607.515	2.892.903.6
		2.525		1		76
2014	302.212	1.099.74	235.133	2.160.070.89	537.345	3.259.820.3
		9.495		0		85
2015	431.907	1.245.02	240.334	2.569.208.59	672.241	3.814.228.9
		0.381		0		71
2016	335.320	1.340.87	253.395	3.239.320.98	588.715	4.580.199.2
		8.317		0		97
2017	354.318	1.535.70	276.502	4.049.199.27	630.820	5.584.901.8
		2.592		0		62
2018	314.094	1.852.66	314.537	5.606.828.41	628.631	7.459.492.8
		4.426		0		36
2019	463.168	2.380.41	373.356	7.694.124.48	836.524	10.074.539.
		4.908		0		388

**Kaynak:** TÜİK, 2020.

Türkiye’de 2010 yılında avcılık yoluyla yapılan su ürünleri üretimi 485.939 ton iken 2019 yılına gelindiğinde üretimin 463.168 tona düştüğü dikkat çekici bir durumdur. Su ürünleri yetiştiriciliği ise 2019 yılında 167.141 ton iken 2019 yılına gelindiğinde üretim 373.356 tona ulaşarak yaklaşık 2,2 kat artmıştır.

Bu durum istatistiklere de yansımış ve Türkiye’de su ürünleri üretiminin %44,6’sını yetiştiricilik yoluyla yapılan su ürünleri oluşturmuştur. Su ürünleri yetiştiriciliğinin %69’u denizlerde yapılırken geri kalan kısmı iç sularda gerçekleşmiştir. Su ürünleri içerisinde levrek, çipura ve alabalık üretimi en çok yapılan su ürünleri olmakla birlikte son yıllarda açık denizlerde alabalıktan somon üretimi yani Türk Somonu üretimi hızla artış göstermiştir.

**Tablo 2.** Türkiye Su Ürünleri Yetiştiriciliği Miktarı (ton)

<b>Yıllar</b>	<b>Denizlerde Yetiştiricilik</b>	<b>İç Sularda Yetiştiricilik</b>	<b>Toplam</b>
2010	88.573	78.568	167.141
2011	88.344	100.446	188.790
2012	100.853	111.557	212.410
2013	110.375	123.019	233.394
2014	126.894	108.239	235.133
2015	138.879	101.455	240.334
2016	151.794	101.601	253.395
2017	172.492	104.010	276.502
2018	209.370	105.167	314.537
2019	256.930	116.426	373.356

Kaynak: BSGM, 2020.



## İKİNCİ BÖLÜM

### KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yetiştiriciliği yapılan sucul canlılarda stresin önlenmesi ve hastalıklarla mücadelede kemoterapötikler ve antibiyotikler uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Bununla birlikte, aşırı ve yanlış kullanımları konağın bağışıklık sistemini baskılamış ve patojen mikroorganizmaların direnç kazanmalarına neden olmuştur. Çevreye dost bir su ürünleri yetiştiriciliği için alternatif katkıları ve ürünler sağlıklı bir gelecek için gerekliliktir. Akvakültür sektörü, hastalıkların artması ve artan ölümlerin neden olduğu ekonomik kayıpların giderilmesine yönelik olarak farklı stratejilere yönelmiştir. Bunlar arasında, yemlere ilave edilen probiyotiklerin etkilerinin araştırılması popüler hale gelmiştir (Hoseinifar vd., 2013; Yılmaz vd., 2022; Abdel-Latif vd., 2022).

Probiyotikler bağırsak florasına yerleşerek burada besinlerin sindirilmesini sağlayan sindirim enzimlerinin aktivitesini arttırmakta, bağırsak sağlığını geliştirerek bağırsağın histomorfolojik olarak daha fazla besin emilimini sağlamakta, bağışıklığı aktive etmekte, patojenlerin bağırsak yoluyla girişini engellemekte, büyüme performansını ve yaşama oranını arttırmakta, su kalitesini iyileştirmekte önemli roller üstlenmişlerdir (Balcázar vd., 2006; Nimrat vd., 2008; Cerezuela vd., 2011; Utiswannakul vd., 2011; Nimrat vd., 2012). *Bacillus*, *Lactobacillus*, Fotosentez ve *Pseudomonas* bakterileri ve mayalar sucul canlıların yetiştiriciliğinde kullanılan en bilinen probiyotikler arasındadırlar.

Balık hastalıklarına karşı probiyotiklerin uygulanması, alternatif güvenlik çevre dostu yaklaşımlardan biridir ve kullanımı sınırlandırılmış veya yasaklanmış antibiyotikler için uygun alternatiftir. Probiyotikler canlı mikroorganizmalardır ve konakçıya sağlık yararları sağlayan yeterli miktarlarda uygulanırlar. Önceki çalışmalar probiyotik bakterilerin bağırsak mikrobiyomu üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu, büyüme performansını geliştirdiğini ve bağışıklık ile ilişkili parametreleri arttırdığını ortaya koymuştur (Wang vd., 2008; Nayak, 2010; Mohapatra vd., 2013). Özellikleri, patojenleri kontrol etmek için inhibitör metabolitler salgılamaktadırlar. Probiyotik bakterilerin balık patojenleri üzerine antagonistik etkisi bir çok çalışmada kanıtlanmıştır (Van Doan vd., 2021).

Probiyotik suşların seçiminde patojenik olmama, safra tuzlarına dirençli ve düşük pH, bağırsak mukusuna yapışabilen ve/veya içinde iyi üreyebilen, plazmit kodlu antibiyotik

direnç genleri içermeyen, bağırsak epitelini kolonize edebilen gibi özellikler sayılabilir. Bu çalışmada probiyotik potansiyele sahip olduğu düşünülen *Sphingomonas* sp. kullanılmıştır.

*Sphingomonas* cinsi, *Sphingomonadaceae* ailesine mensup 127 farklı onaylanmış türe sahip olup, *Sphingomonas* türlerinin çoğu 5,5–9,0 (optimum 6,0–7,0) pH ve 15–35 °C (optimum 25–28 °C) aralığında ve Triptik Soy Agar (TSA), Nutrient Agar (NA), R2A Agar, Marine Agar (MA), Czapek-Dox Agar, Peptone Maya Özü Sodyum Süksinat (PYES), Luria Broth (LB) ve CasMM'de besi ortamlarında gelişebilmektedirler (Sood vd., 2021).

Bu çalışmada kullanılan *Sphingomonas* sp. türü balıklarda patojenite göstermemiş bir suş olup, literatürde *Sphingomonas* sp. türlerinin balıklarda probiyotik olarak kullanılabilirliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Balıklar üzerinde *in vivo* denemeler kurulmadan önce probiyotik potansiyeli olan bakterinin *in vitro* şartlarda balık patojenleri üzerine antagonistik etkisinin araştırılması probiyotik potansiyele sahip bakterinin hangi patojen üzerinde etkili olduğunun belirlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmadaki amaç; yetiştiriciliği yapılan balıklarda sık olarak hastalığa neden olan bazı patojen bakteri türlerinin probiyotik potansiyele sahip *Sphingomonas* sp. ile antagonistik etkisinin araştırılmasıdır.

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

#### 2.1. Probiyotik bakteriden antimikrobiyal üst fazın elde edilmesi

*Sphingomonas* sp. üreme ortamında üst fazın elde edilmesi işlemi daha önce bildirilen metotlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çelik vd., 2019). Bu çalışmada kullanılan *Sphingomonas* sp. türü daha önce alabalık bağırsaklarından izole edilmiş ve tür tayini moleküler olarak gerçekleştirilmiştir. Kloramfenikol, tetrasiklin, doksisisiklin, amoksisilin - klavulanik asit ve eritromisin antibiyotiklerine karşı duyarlı bir izolatır. Bakteriden üst faz eldesi için bakteri üretim ortamı 500 mL erlen içerisinde hazırlanmıştır. Bu amaçla, erlen 250 mL kadar otoklavlanmış sıvı besi yeri (Tryptic Soy Broth, Merk) içerecek şekilde hazırlanmıştır. *Sphingomonas* sp. bu ortamda 48 saat süre boyunca 30 °C sabit sıcaklıkta üretilmiştir. İnkübasyon sonunda yoğun *Sphingomonas* sp. içeren sıvı besiyeri steril falkon (15 mL) tüplerine paylaştırılmıştır. Falkon tüpleri 2142 x g devirde 20 dakika Nüve NF 400 marka santrifüj ile açılır rotor yardımıyla santrifüj edilerek üreyen kültürün çökeltmesi sağlanmıştır. Devamında *Sphingomonas* sp. tarafından üretilen antimikrobiyal metabolitler içerdiği düşünülen üst fazlar dikkatlice toplanmıştır. Devamında sırasıyla 0.45-µm ve 0.22 µm millipor filtrelerden geçirilerek steril edilmişlerdir. Filtre edilmiş *Sphingomonas* sp. üst fazının patojen bakteriler üzerine sıvı kültür inhibisyon testi için pH nötrlemesi (pH 6.8) yapılmıştır (Kongnum ve Hongpattarakere 2012).

## 2.2. Sıvı kültür inhibisyon testi

Sıvı kültür inhibisyon testi Kongnum ve Hongpattarakere 2012; Nakayama vd., 2009; Khouiti ve Simon 1997; Çelik vd., 2019 gibi araştırmacıların bildirdikleri gibi steril, tek kullanımlık kapaklı 96 çukur plakalarda standart metotlar kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Vibrio crassostreae* SY-VC10, *Lactococcus garvieae* SY-LG1, *Yersinia ruckeri* E42 ve *Vibrio (Listonella) anguillarum*, SY-L24 türleri daha önce laboratuvarlarımızda hasta balıklardan izole edilmiş ve moleküler olarak tanımlanarak gen bankasına kayıtları yapılmış türlerdir. Ayrıca, bu çalışmada ve *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 koleksiyon suşu da kullanılmıştır. Balık patojenleri Tablo 1 de gösterilmiş olan uygun üreme sıcaklıkları ve sıvı besi ortamlarında çoğaltılmışlardır. Bakterilerin yoğunlukları  $1 \times 10^6$  CFU/mL olarak belirlendikten sonra 160 µl olarak kuyucuklara ilave edilmişlerdir. Aynı kuyucuklara *Sphingomonas* sp. bakterisinin üreme ortamından santrifüj yoluyla elde edilen üst faz 40 µl olarak eklenmiştir. Ayrıca, kontrol olarak her bir patojen bakterinin *Sphingomonas* sp. üst fazını içermeyen ortamı kullanılmıştır. Tüm denemeler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Okumalar ELISA cihazında 600 nm dalga boyunda her bir saatte bir kez olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. ELISA cihazının sıcaklık ayarı bakteri gelişimine uygun olarak ayarlanmış ve deneme süresince plakalar cihazdan çıkarılmamıştır. Sonuç olarak elde edilen okuma değerlerinden şekiller oluşturularak patojen bakteriler üzerinde *Sphingomonas* sp. bakterisinin inhibe edici özelliğinin varlığı araştırılmıştır.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan patojen bakteri bilgileri ve üretim koşulları

Bakteri	Açıklama Patojen/Balık Türü	Kayıt Numarası	Ortam (SKİ./ÜR.)	Sıc. (°C)
<i>Vibrio crassostreae</i> SY-VC10	Balık patojeni / <i>D. labrax</i>	MG55781	MHM*/T	24
<i>Lactococcus garvieae</i> SY-LG1	Balık patojeni / <i>O. mykiss</i>	KY118086	SM*	24
<i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i> , SY-L24	Balık patojeni / <i>Dicentrarchus labrax</i>	KX388236	MHM*/T	24
<i>Yersinia ruckeri</i> E42	Balık patojeni / <i>O. mykiss</i>	KX388238	MHM/TS	22
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658	Balık patojeni, koleksiyon suşu	-	M	22

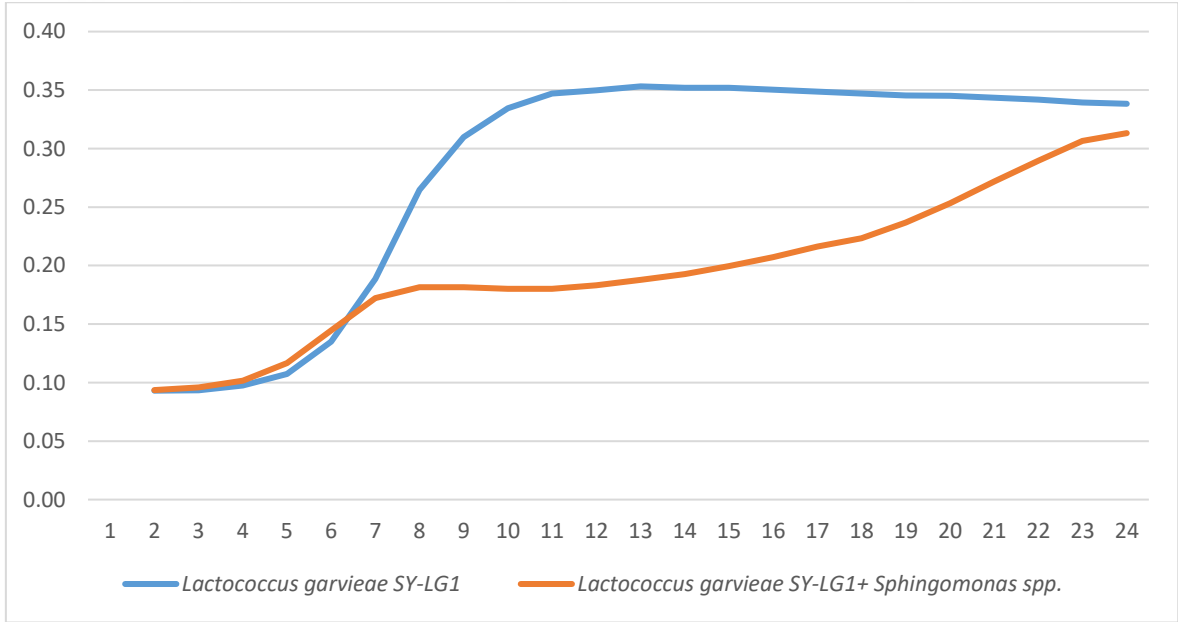
MHM: Mueller-Hinton media; TSM: tryptic soy media. \*1,5% NaCl ilaveli besi ortamı. SKİ: Sıvı Kültür İnhibisyon Test Ortamı, ÜR: Üreme Ortamı.

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

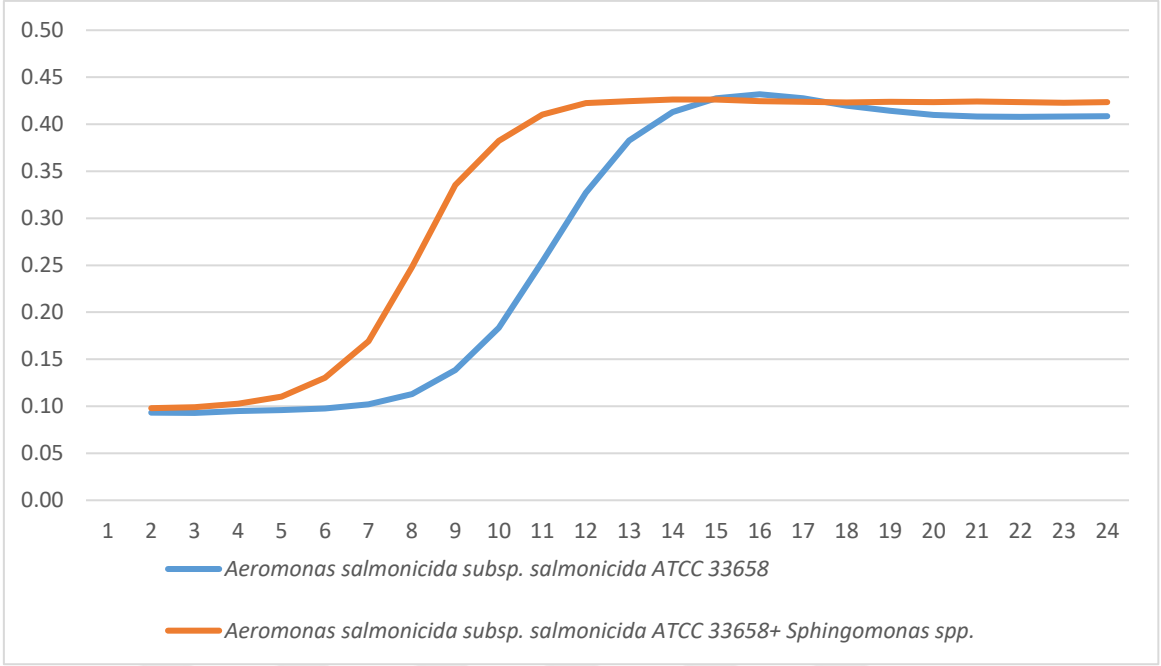
### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Bulgular

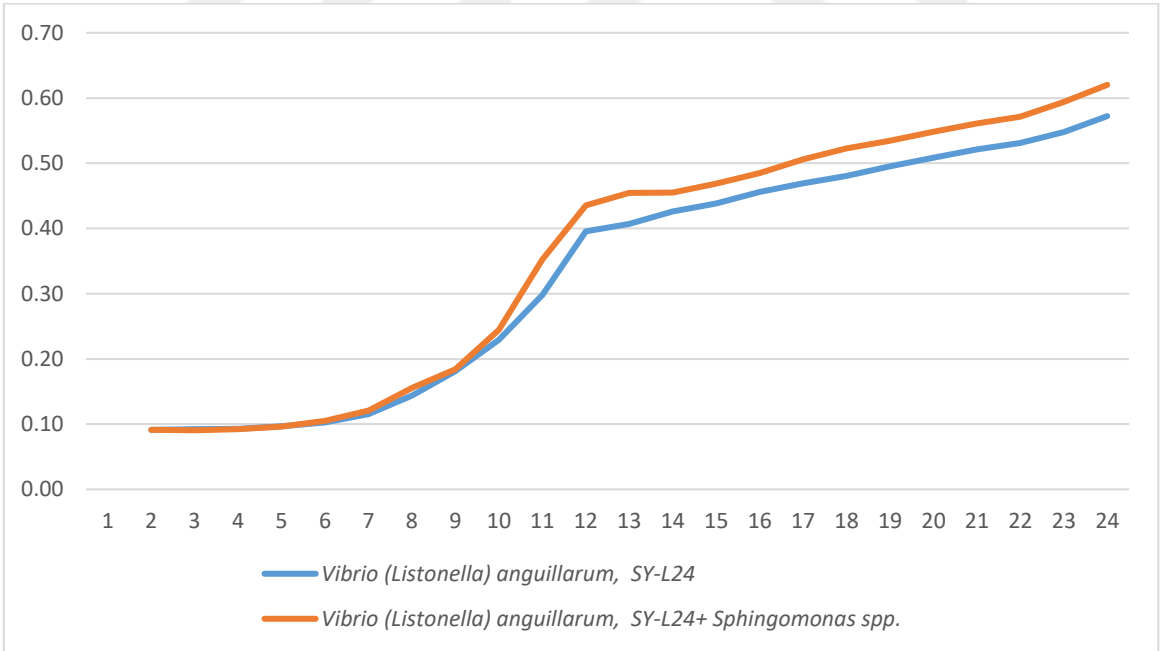
Sıvı kültür inhibisyon testi analizi ile *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazının *Lactococcus garvieae* SY-LG1 türü üzerine antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur (Şekil 1). Ancak, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 (Şekil 2), *Vibrio (Listonella) anguillarum* (Şekil 3) *Yersinia ruckeri* E42 (Şekil 4) ve *Vibrio crassostreae* SY-VC10 (Şekil 5) türleri üzerinde tam olarak antagonistik etki göstermemiştir.



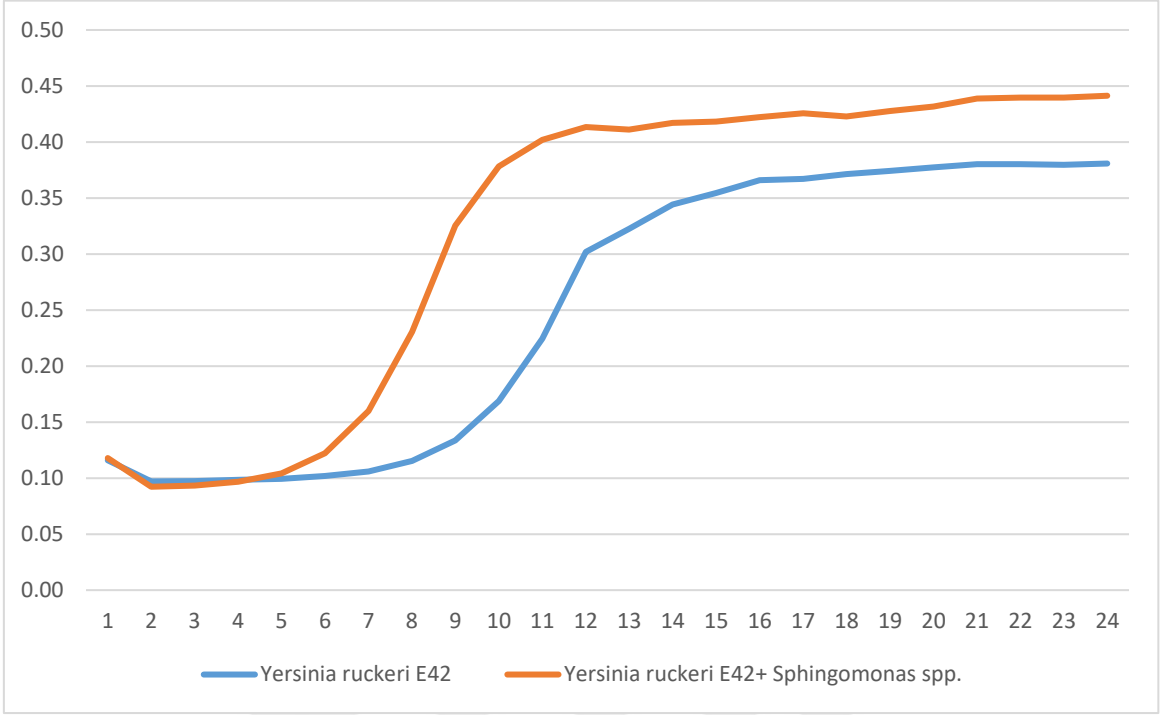
**Şekil 1.** *Lactococcus garvieae* SY-LG1 bakterisinin *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm



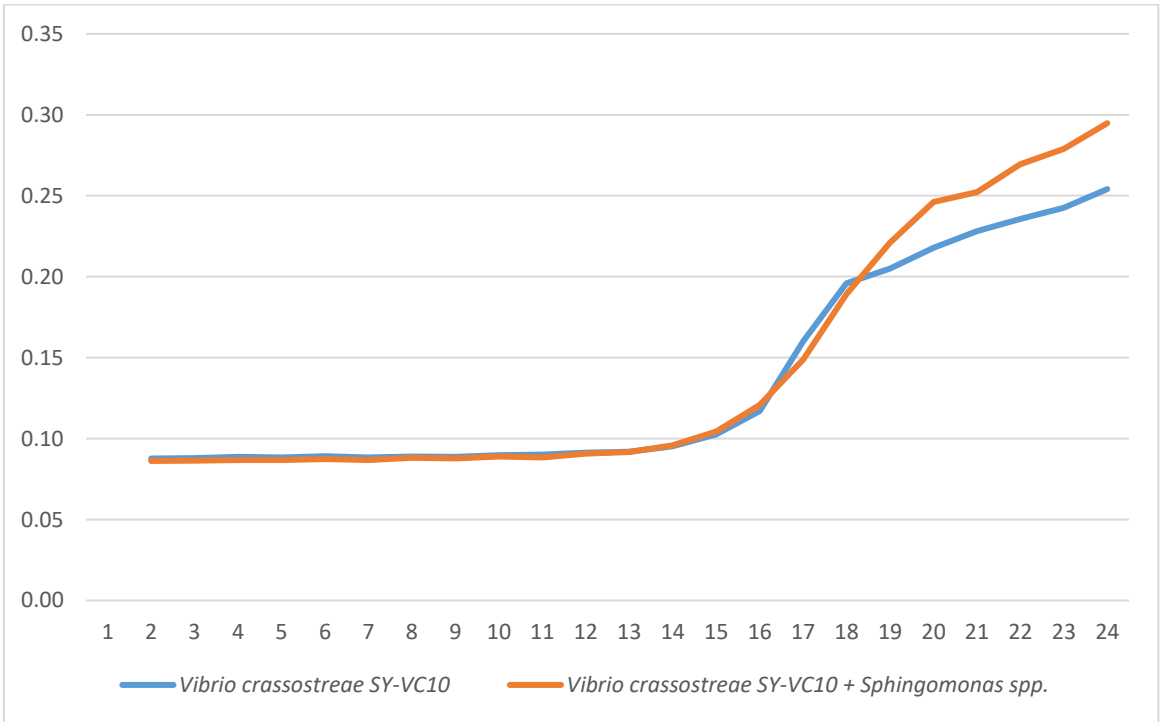
**Şekil 2.** *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 bakterisinin *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm



**Şekil 3.** *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisinin *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm



**Şekil 4.** *Yersinia ruckeri* E42 bakterisinin *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm



**Şekil 5.** *Vibrio crassostreae* SY-VC10 bakterisinin *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazı varlığında gelişimi. X düzlemi: saat, Y düzlemi: OD 600 nm

## 4.2. Tartışma

Bu çalışmada *Sphingomonas* sp. bakterisinin üst fazının *Lactococcus garvieae* SY-LG1 türü üzerine antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak literatürde *Sphingomonas* türlerinin balık patojenleri üzerine antagonistik etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle tartışma bölümünde farklı probiyotik bakterilerin bu çalışmada kullanılan balık patojenleri üzerine antagonistik etkilerine yer verilmiştir.

Çelik vd. (2019) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) probiyotik bakterisinin üst fazının balık patojenleri üzerine etkilerini araştırdıkları bir çalışmada *Aeromonas sobria*, *Edwardsiella tarda* ve *Lactococcus garvieae*'nin üremesini sıvı kültür inhibisyon testi sonucunda engellediğini belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar sıvı kültür inhibisyon testi sonucunda *Lactobacillus plantarum* BC 7321 üst fazının *Aeromonas sobria*, *L. garvieae*, *Listonella anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* patojenleri üzerinde üremelerini baskılayıcı etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Didinen vd. (2014) *Aeromonas* sp. A5, G1, ve *Vibrio* sp. A12 izolatlarının gökkuşağı alabalıkları üzerinde mortalite yapmadıkları ve çeşitli testlerle probiyotik özellik gösterdiklerinin belirlendiği bir çalışmada *L. garvieae* patojenine karşı *in vitro* antagonistik etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Benzer olarak, *Lactobacillus lactis subsp. lactis* ve *Lactobacillus sakei* izolatlarının *L. garvieae* ve *V. salmoninarum* patojenlerinin gelişimini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir (Didinen vd., 2018). Benzer olarak, beş farklı *Lactobacillus acidophilus* suşunun *L. garvieae* patojeni üzerine antagonistik etkisi rapor edilmiştir (Pehlivan ve Onuk, 2020).

Sazan balıklarından izole edilen *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus paracasei* probiyotik bakterilerinin *L. garvieae* üzerinde *in vitro* antagonistik etkisinin olmadığı ancak yeme ilave edilen probiyotik karışımının balıkların *L. garvieae* dirençliliğini önemli düzeyde arttırdığı rapor edilmiştir (Tekebayeva vd., 2021). Farklı *in vivo* çalışmalara bakıldığında *L. garvieae* patojen bakterisine karşı ölüm oranının azaltılmasında alabalık yemlerine ilave edilen probiyotik bakterilerden *Aeromonas sobria* (Brunt ve Austin 2005), *Bacillus* sp. ve *A. sobria* (Brunt vd., 2007), *L. plantarum* ve *L. mesenteroides* (Vendrell vd., 2008), *L. plantarum subsp. plantarum*, *L. lactis subsp.*



*cremoris* ve *L. mesenteroides* (Pérez-Sánchez vd., 2011) türlerinin etkili olduğu bildirilmiştir.



## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sıvı kültür inhibisyon testi sonucunda *Sphingomonas* sp. bakterisinin balık patojeni bakteriler üzerine etkisi ilk defa araştırılmış ve *Lactococcus garvieae* SY-LG1 türü üzerine antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur. Ancak, ileriki çalışmalar da *Sphingomonas* sp. kesin tür tanısı ve aday probiyotik türün enzim üretim kabiliyeti, pH direçliliği, hidrofobisitesi, safra toleranslılığı gibi testlerinin yapılması gerekmektedir. Tüm bu testler sonucunda *Sphingomonas* sp. bakterisinin balık yemlerine ilave edilerek balıkların *L. garvieae* patojenine karşı dirençliliğinin araştırılmasına da ihtiyaç vardır.



## KAYNAKÇA

- Abdel-Latif, H. M., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Yilmaz, S. (2022). Shrimp vibriosis and possible control measures using probiotics, postbiotics, prebiotics, and synbiotics: A review. *Aquaculture*, 737951.
- Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current microbiology*, 55, 409-412.
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 173-186.
- BSGM, 2020. Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü
- Çelik, E.Ş., Ergün, S. & Yılmaz, S. (2019). *Bacillus subtilis* ve *Lactobacillus plantarum* probiyotik bakterilerinin bazı balık patojenleri üzerine in vitro antagonistik etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 278-284.
- Cerezuela, R., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2011). Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. *Journal of Aquaculture Research & Development S, 1*, 1-7.
- Didinen, B. I., Metin, S., Onuk, E. E., Takmaz, H., & Ersoy, A. T. (2014). Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum) rearing units against bacterial pathogens. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 66.2014.1006.
- Didinen, B. I., Onuk, E. E., Metin, S. E. Ç. İ. L., & 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.
- Ergün, S., Yiğit, M., Yılmaz, S. (2020). Marine aquaculture in Turkey: advancements and management. Çoban, D., Demircan, M.D., & D.D. Tosun (Eds.), *Turkish Marine Research Foundation (TUDAV)*. (pp. 231-532). İstanbul.
- Yalçın, K. A. Y. A., Duyar, H. A., & Erdem, M. E. (2004). Balık Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı İçin Önemi. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(3), 365-370.
- Kongnum, K., & Hongpattarakere, T. (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp

- (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & shellfish immunology*, 32(1), 170-177.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., DeBoeck, G., & Mohanta, K. N. (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3), 405-430.
- Nakayama, T., Lu, H., & Nomura, N. (2009). Inhibitory effects of Bacillus probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Letters in Applied Microbiology*, 49(6), 679-684.
- Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1), 2-14.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Boonthai, T., & Vuthiphandchai, V. (2012). Potential Bacillus probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Veterinary Microbiology*, 159, 443–450.
- Nimrat, S., Suksawat, S., Maleeweach, P., & Vuthiphandchai, V. (2008). Effect of different shrimp pond bottom soil treatments on the change of physical characteristics and pathogenic bacteria in pond bottom soil. *Aquaculture*, 285, 123–129.
- Pal, J., Shukla, B. N., Maurya, A. K., Verma, H. O., Pandey, G., & Amitha, A. (2018). A review on role of fish in human nutrition with special emphasis to essential fatty acid. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 427-430.
- Pehlivan, D. & Onuk, E. E. (2020). Gökkuşağı alabalığı bagirsaklarından izole edilen laktik asit bakterilerinin *Lactococcus garvieae*'ye karsi probiyotik potansiyelinin *in vitro* olarak belirlenmesi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 5(4), 647-654.
- Sood, U., Hira, P., Singh, P., Singh, D.N., & Lal, R. (2021) *Sphingomonas*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1– 84. Hoboken, NJ, USA: Wiley.
- Tekebayeva, Z., Zakarya, K., Abzhalelov, A. B., Beisenova, R. R., & Tazitdinova, R. M. (2021). Efficiency of a probiotic in carp lactococcosis in an *in vitro* experiment. *Microbial Pathogenesis*, 161, 105289.
- Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P., & Chrysi, K. (2012). Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia*

- nauplii against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 2425-2433.
- TÜİK, 2020. Su Ürünleri İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=97&locale=tr>
- Utiswannakul, P., Sangchai, S., & Rengpipat, S. (2011). Enhanced growth of black tiger shrimp *Penaeus monodon* by dietary supplementation with *Bacillus* (BP11) as a probiotic. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 51, 006.
- Van Doan, H., Soltani, M., & Ringø, E. (2021). *In vitro* antagonistic effect and *in vivo* protective efficacy of Gram-positive probiotics versus Gram-negative bacterial pathogens in finfish and shellfish. *Aquaculture*, 540, 736581.
- Wang, Y. B., Li, J. R., & Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture*, 281(1-4), 1-4.
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M. A., Ringø, E., Ahmadifar, E., & Abdel-Latif, H. M. (2022). Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. *Aquaculture*, 547, 737514.



