



Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyufbed>



Araştırma Makalesi

Gökkuşluğu Alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) İzole Edilen Patojen Bakteri İzolatlarının Hidrolitik Enzim Aktiviteleri ve Siderofor Üretim Yetenekleri

Bilgin TAŞKIN^{*1}, Şükrü ÖNALAN²

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 65080, Van, Türkiye

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Bölümü, 65080, Van, Türkiye

Bilgin TAŞKIN, ORCID No: 0000-0002-9772-7438, Şükrü ÖNALAN, ORCID No: 0000-0003-0058-5232

*Sorumlu yazar e-posta: bilgintaskin@yyu.edu.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 04.03.2022

Kabul: 24.06.2022

Online Aralık 2022

DOI: 10.53433/yyufbed.1082784

Anahtar Kelimeler

Ekstraselüler enzim,

Patojen bakteri,

Siderofor

Öz: Kısa sürede büyük miktarlarda kültürlenilmeleri, genetik manipülasyonlara açık olmaları ve ürettikleri enzimlerin hayvansal ve bitkisel enzimlerden daha aktif ve istikrarlı oluşu bakterilerin çok önemli enzim ve ikincil metabolit kaynakları olarak değerlendirilmelerine sebep olmaktadır. Ayrıca ekstraselüler hidrolitik enzimler ve sideroforlar patojen bakteriler için çok önemli virülans faktörleri olarak bilinmektedir. Bu çalışmada, Van ilinde faaliyet gösteren çiftliklerde, gökkuşluğu alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilerek kültüre alınmış dokuz adet bakteri izolatının çeşitli ekstraselüler hidrolitik enzimleri ve siderofor üretme yetenekleri ilk defa araştırılmıştır. Sonuçlar, test edilen izolatlardan dokuzunun proteaz, sekizinin lipaz, beşinin selülaz, ikisinin pektinaz aktivitesine sahip olduğu, ayrıca yedisinin siderofor üretme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Amilaz ve ksilinaz aktiviteleri hiçbir izolatta gözlemlenmemiştir. Ayrıca bu izolatlar morfolojik olarak olası üç ana gruba ayrılmış ve her bir izolat, türe özel geliştirilmiş primerler ile moleküler tanımlamaya tabi tutulmuştur. Türe özgü primerler kullanılarak yapılan moleküler tanımlama, bu izolatların balık patojeni *Listonella anguillarum*, *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* olduklarını ortaya koymuştur.

Hydrolytic Enzyme Activities and Siderophore Production Capabilities of Pathogenic Bacterial Isolates from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Article Info

Received: 04.03.2022

Accepted: 24.06.2022

Online December 2022

DOI: 10.53433/yyufbed.1082784

Keywords

Extracellular enzymes,

Pathogenic bacteria,

Siderophore

Abstract: The fact that they can be cultured in large quantities in a short time, that they are open to genetic manipulations, and that the enzymes they produce are more active and stable than animal and plant enzymes, cause bacteria to be considered as very important enzyme and secondary metabolite sources. Also, extracellular hydrolytic enzymes and siderophores are known as very important virulence factors for pathogenic bacteria. In this study, the ability to produce various extracellular hydrolytic enzymes and siderophores of nine bacterial isolates isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from farms operating in Van province was investigated for the first time. The results showed that of the tested bacteria, nine had protease, eight had lipase, five had cellulase, two had pectinase activity, and seven had the ability to produce siderophores. Amylase and xylanase activities were not observed in any isolate. In addition, these isolates were morphologically divided into three possible main groups and three isolates from each group were molecularly identified with primers developed specifically for the species. Molecular identification using species-specific primers revealed that these isolates could be the strains of fish pathogens *Listonella anguillarum*, *Yersinia ruckeri* and *Lactococcus garvieae*.

1. Giriş

Katalitik aktiviteleri yüksek olan mikrobiyal enzimler, daha istikrarlı, daha ucuz ve fermantasyon yöntemleri ile büyük miktarlarda elde edilebildikleri için endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır (Fasim ve ark., 2021). Bu enzimleri kullanan endüstriyel alanlara deterjan ajanları, deri işleme, ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması, gıda işleme (fırıncılık, et, süt, meyve ve sebze ürünleri), farmasötikler (farmasötik ara ürünlerin sentezi), biyoyakıtlar (düşük- enerji etanol üretim süreci) ve diğer ilgili teknolojiler örnek olarak verilebilir (Singh ve ark., 2016). Selülaz, proteaz, amilaz, pektinaz, lipaz, asparaginaz gibi biyoteknolojik öneme sahip hidrolitik enzimleri önemli ölçekte sentezleyen, çeşitli kaynaklardan izole edilmiş birçok bakteri izolatu bildirilmiştir (Carrim ve ark., 2006; Jalgaonwala & Mahajan, 2011; Khan ve ark., 2017).

Mikroorganizmalar, demir elementinin sınırlı olduğu ortamlarda hayatta kalabilmek için, çözünmeyen ferrik demiri yakalama işlevi gören, metal şelatlayıcı ajanlar olarak bilinen ve siderofor adı verilen düşük moleküler kütleli bazı sekonder metanolitler üretirler (Soares, 2022). Sideroforlar son zamanlarda farklı alanlardaki potansiyel rolleri nedeniyle çok dikkat çekmiştir. Sideroforların, mikrobiyal ekolojide, kültürlenemeyen mikroorganizmaların gelişimini arttırmak için uygulama potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Lewis ve ark., 2010). Tarım alanında, farklı tipteki sideroforlar, çeşitli bitki türlerinin büyümesini teşvik eder ve bitkilere demir alımını artırarak verimlerini arttırmalar (Sarwar ve ark., 2022). Ayrıca, sideroforlar demire sıkıca bağlanır ve bitki patojenleri için biyolojik olarak kullanılabilir demiri azaltır, böylece fitopatojenlerin öldürülmesini kolaylaştırır (Soares, 2022). Ağır metalle kontamine olmuş ortamlar, biyoremediasyondaki rolü çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan sideroforlar uygulanarak detoksifiye edilebilir (O'Brien ve ark., 2014).

Diğer hayvan patojeni bakterilerinde olduğu gibi, balık patojenlerinde görülen anahtar virülans faktörleri arasında siderofor üretimi en önemli sistemlerin başında gelmektedir ve konak kolonizasyonu için çok önemlidir (Lemos & Balado, 2020). Ayrıca, pek çok patojenik bakteri tarafından üretilen, bir diğer önemli virülans faktörü olarak bilinen ekstraselüler hidrolitik enzimler, patojenin besinleri almasına ve dokulara yayılmasına olanak sağlar (Malathi ve ark., 2014; Ina-Salwany ve ark., 2019).

Çiftlik alabalıklarından hastalık etmeni olarak izole edilen bakteri izolatları ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına rağmen, bu tip izolatların biyoteknolojik potansiyellerine yönelik çalışmalar çok daha sınırlıdır. Ayrıca bu tip enzim aktivitelerinin ve siderofor üretim kabiliyetlerinin varlığının araştırılması, bu patojenlerin sahip olduğu potansiyel virülans faktörleri ortaya koyması açısından da ayrıca önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı, Van ilinde faaliyet gösteren çiftliklerden temin edilmiş gökkuşluğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) böbrek dokularından izole edilmiş, patojen bakteri izolatlarının endüstriyel olarak önem taşıyan proteaz, lipaz, amilaz, selülaz, ksilanaz, pektinaz enzim ve siderofor üretme potansiyelleri açısından incelenmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bakteri izolatları

Çalışmada kullanılan izolatlar, önceki çalışmalarda Van ilinde faaliyet gösteren alabalık üretim işletmelerinden temin edilmiş gökkuşluğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) böbrek dokularından izole edilen ve kültüre alınan bakterilerdir. İzolatlar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı stoklarından temin edilmiştir. Tüm izolatlar, Nutrient Broth (NB) besi ortamı (Difco, Detroit, MI, ABD) içinde veya Nutrient Broth agar plakaları üzerinde 25°C'de büyütülmüştür.

2.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

İzolatların saf kültürleri ayırt edici tanı ortamlarına birbirine eşit uzaklıkta dört izole damlacık olarak inoküle edilmiştir. Her enzim ve siderofor için enzim indeksi (EI), belirli inkübasyon süresinin sonunda hesaplanmıştır. EI değerleri, aktivite zon çapının koloni çapına oranı olarak hesaplanmıştır.

2.2.1. Amilaz aktivitesi

İzolatlar, %1 (w/v) nişasta ile takviye edilmiş Nutrient Agar besi ortamı üzerine inoküle edilmiştir. 25°C'de iki gün inkübasyondan sonra, agar plaka yüzeyleri iyot solüsyonu ile yıkanmıştır. Kolonilerin çevresinde iyot ile boyanmamış, opak zon gösteren varyantlar amilaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Hankin & Anagnostakis, 1975).

2.2.2. Selüloz aktivitesi

Selüloz aktivitesi, Amore ve ark. (2015) tarafından bildirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. İzolatlar litresinde 1 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 1 g KCl, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g maya özütü, 1 g glukoz, 5 g karboksimetilselüloz (CMC) ve 15 g agar içeren katı besi ortamı üzerine inoküle edilmiştir. Petriler 25°C'de 5-8 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, petrilerin yüzeyini kaplayacak şekilde %0,2 (w/v) Kongo kırmızısı solüsyonu eklenmiş ve 20 dakika ortam sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra petri kapları, fazla boyayı uzaklaştırmak için 5 M NaCl çözeltisi eklenerek yıkanmış ve 30 dakika daha oda sıcaklığında bekletilmiştir. Koloni çevresinde kırmızı zemin üzerine açık sarı bölge bulunan koloniler selüloz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.3. Proteaz aktivitesi

Proteaz aktivitesi, Carrim ve ark. (2006) tarafından bildirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Proteaz aktivitesini ölçebilecek ayırt edici besiyeri hazırlamak için %1 (g/L) yağsız süt tozu içeren Nutrient Agar kullanılmıştır. Süt tozu (10 g/100 mL) 110°C'de 5 dakika sterilize edilmiş, sıcaklığı 45°C'ye düşürülmüş ve aseptik koşullarda Nutrient Agar besi ortamına ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerine inoküle edilen izolatlar, 25°C'de iki veya üç gün inkübe edilmişlerdir. Kolonilerin etrafındaki şeffaf bölge oluşumu, proteaz aktivitesi olarak yorumlanmıştır.

2.2.4. Lipaz aktivitesi

Lipaz aktivitesi, küçük modifikasyonlarla Hankin & Anagnostakis (1975) tarafından açıklanan yöntemde göre belirlenmiştir. İzolatlar litresinde 8 g Nutrient Broth, 0.1 g CaCl₂ H₂O, 15 g agar, pH 6.0 ve 20 mL Tween 20 içeren katı besiyeri ortamı üzerine inoküle edilmişlerdir. Tween 20, ayrı olarak steril edilmiş ve ortama ayrıca ilave edilmiştir. Kültürler 25°C'de iki veya üç gün inkübe edildikten sonra inceleme öncesi +4°C'de 30 dakika kadar bekletilmişlerdir. Kolonilerin çevresinde opak zon gösteren varyantlar lipaz pozitif olarak değerlendirilmişlerdir.

2.2.5. Pektinaz aktivitesi

Pektinaz aktivitesi, Kobayashi ve ark. (1999)'nın belirttiği yöntemde göre ölçülmüştür. İzolatlar litresinde 2 g maya özütü, 2 g amonyum sülfat, 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 5 g pektin ve 15 g agar içeren katı besiyeri ortamı üzerine inoküle edilmişlerdir. Petriler üç gün boyunca 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, petrilerin yüzeyini kaplayacak şekilde %1'lik (w/v) Setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) solüsyonu eklenmiş ve petriler oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Koloni çevresinde şeffaf bölge oluşumu pektinaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir.

2.2.6. Ksilinaz aktivitesi

Ksilinaz aktivitesi, Amore ve ark. (2015) tarafından bildirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. İzolatlar litresinde 1 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 1 g KCl, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g maya özütü, 1 g glukoz, 15 g agar ve 5 g ksilan içeren katı besiyeri ortamı üzerine inoküle edilmişlerdir. İzolatlar besiyerine inoküle edildikten sonra 25°C'de iki ile dört gün arası inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda, petrilerin yüzeyini kaplayacak şekilde %0.1 (w/v) Kongo kırmızısı solüsyonu eklenmiş ve 20 dakika ortam sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra petri kapları, fazla boyayı uzaklaştırmak için 5 M NaCl çözeltisi eklenerek yıkanmış ve 30 dakika daha oda sıcaklığında

bekletilmiştir. Kırmızı arka plan üzerinde koloni etrafında gözlemlenen açık renkli bölge ksilanaz aktivitesi olarak değerlendirilmiştir.

2.3. Siderofor üretim testi

İzolatların siderofor üretimlerinin belirlenmesinde Blue-CAS Agar besiyeri kullanılmıştır (Louden ve ark., 2011). Nutrient Agar besi ortamına ekimi yapılarak inkübatörde geliştirilen 48 saatlik bakteri kültürlerinden Blue-CAS agar ortamına nokta ekim yapılmıştır. Petriler 25°C’de 2-3 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda nokta ekim yapılan koloni çevresindeki sarı-turuncu renkli alanın meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiş ve bu alanın çapı ve koloni çapı ölçülerek siderofor üretim indeksleri belirlenmiştir.

2.4. İzolatların moleküler doğrulaması

PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmak için; *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri* ve *Listonella anguillarum* izolatlarından ve her bir ana guruptan seçilmiş olan 3 izolattan toplam DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bunun için 10⁷ CFU/mL yoğunluğundaki bakteri süspansiyonundan 2 mL alınarak 10 dakika kaynatılmış ve santrifüjlenerek hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Toplam DNA içeren süpernatant temiz bir tüpe transfer edilerek, PCR reaksiyonlarında kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmıştır (Önalın & Çevik, 2020). Her bakteri türü için spesifik primer setleri kullanılmıştır. Biyokimyasal testleri ve moleküler identifikasyonları daha önceki çalışmalarda gerçekleştirilmiş olan *L. garvieae*, *Y. ruckeri* ve *L. anguillarum* bakterileri ise çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

qPCR reaksiyon karışımı oluşturulurken 12.5 µL SYBRGreen qPCR mastermix, 1µL ileri primer, 1 µL geri primer, 4 µL DNA ve 6,5 µL DNase-RNase free su kullanılmıştır (Önalın, 2019). *L. garvieae* için kullanılan primer seti ve qPCR şartları; İleri primer 5’- CATTTCACGATGGCGCAG-3’, Geri primer 5’-CGTCGTGTTGCTGCAACA-3’, 30 s, 95°C denaturasyon, 30 s, 58°C bağlanma ve 1 dak, 72°C uzama adımlarından oluşan toplam 30 döngü (Aoki ve ark., 2000). *Y. ruckeri* için kullanılan primer seti ve qPCR şartları; İleri primer 5’-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3’, Geri primer 5’-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3’, 1 dak, 92°C denaturasyon, 1 dak, 58°C bağlanma ve 1 dak, 72°C uzama adımlarından oluşan toplam 30 döngü (Gibello ve ark., 1999). *L. anguillarum* için kullanılan primer seti ve qPCR şartları; İleri primer 5’- GTTCATAGCATCAATGAGGAG -3’, Geri primer 5’- GAGCAGACAATATGTTGGATG -3’, 1 dak, 95°C denaturasyon, 1 dak, 55°C bağlanma ve 1 dak, 72°C uzama adımlarından oluşan toplam 30 döngü (Gonzalez ve ark., 2003).

2.5. İstatiksel analiz

Tüm enzim ve siderofor ölçüm deneyleri dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Verileri analiz etmek için İstatistiksel Analiz Sistemi (SAS sürüm 9.4 SAS, Cary, NC) kullanılmıştır. Grupların ortalamaları arasındaki farklılıkları belirlemek için genel doğrusal model (GLM) analizi, gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Duncan’ın çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Sadece iki grup içeren pektinaz testindeki gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Student’s t testi tercih edilmiştir.

3. Bulgular

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda gökkuşluğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) böbrek dokularından, hastalık etmeni olarak izole edilerek kültüre alınmış olan ve morfolojik benzerliklerine göre 3 ana guruba ayrılmış 9 adet bakteri kullanılmıştır. Tüm izolatlar için, her bir enzim ve siderofor aktivitesinin enzim indeksi (EI) Çizelge 1’de verilmiştir. Enzim İndeksi (EI), farklı izolatların enzimatik üretimlerinin karşılaştırılmasında kullanılan pratik bir araçtır (Carrim ve ark., 2006; Dogan & Taskin, 2021). Bu amaçla Türkiye’de Van ili içerisinde yer alan alabalık çiftliklerinden temin edilen alabalıklardan izole edilen bakteriler, selülaz, ksilanaz, pektinaz, amilaz, proteaz, lipaz hidrolitik enzimlerinin ve sideroforların varlığı açısından değerlendirilmiştir (Şekil 1). Test edilen izolatlardan 9’unun proteaz, 8’inin lipaz, 5’inin selülaz, 2’sinin pektinaz aktivitesine sahip olduğu ve ayrıca 7’sinin

siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu ortaya konmuştur. Amilaz ve ksiliniz aktiviteleri hiçbir izolat için gözlemlenmemiştir (Çizelge 1).

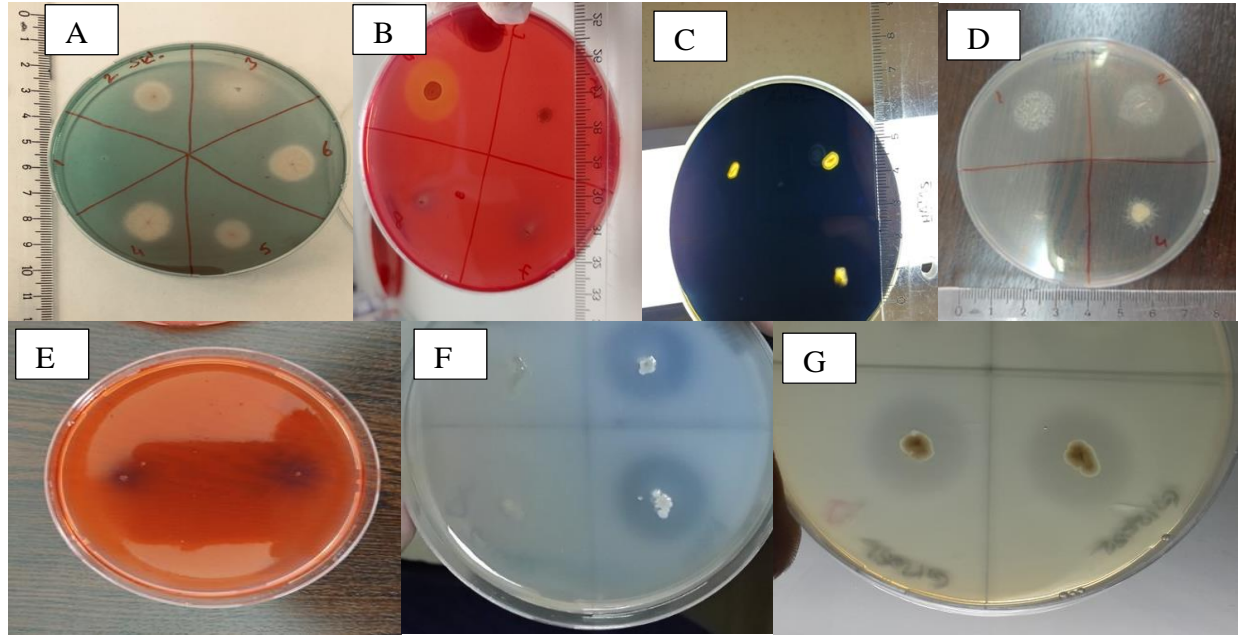
Çizelge 1. Kullanılan bakteri izolatları ile her bir enzim ve siderofor için ölçülen enzim indeks (EI) değerleri. EI değerleri, aktivite zon çapının koloni çapına oranı olarak hesaplanmıştır.

İzolat No	Proteaz	Lipaz	Amilaz	Selüloz	Pektinaz	Ksiliniz	Siderofor
SO1	2.10±0.05 ^{de*}	5.70±0.40 ^{cd*}	-	-	-	-	2.75±0.25 ^{b*}
SO2	2.77±0.25 ^{c*}	6.93±1.10 ^{d*}	-	-	-	-	1.61±0.04 ^{c*}
SO3	3.42±0.28 ^{b*}	3.20±0.12 ^{a*}	-	-	-	-	2.70±0.27 ^{b*}
SO4	2.70±0.26 ^{cd*}	3.12±0.11 ^{a*}	-	3.25±0.18 ^{ab*}	3.20±0.05 ^{**}	-	1.57±0.05 ^{c*}
SO5	4.67±0.20 ^{a*}	5.08±0.05 ^{bc*}	-	-	-	-	1.72±0.04 ^{c*}
SO6	4.35±0.20 ^{a*}	4.34±0.23 ^{abc*}	-	2.85±0.06 ^{ab*}	3.12±0.05 ^{**}	-	1.45±0.02 ^{c*}
SO7	1.97±0.16 ^{e*}	3.83±0.31 ^{ab*}	-	3.60±0.36 ^{b*}	-	-	-
SO8	2.10±0.12 ^{de*}	3.91±0.53 ^{ab*}	-	2.57±0.26 ^{a*}	-	-	-
SO9	2.02±0.25 ^{e*}	-	-	3.10±0.26 ^{ab*}	-	-	4.00±0.00 ^{a*}

* Dört tekrarın ortalaması (Ortalama ± Std. hatalar). Farklı küçük harflerle takip edilen bir sütun içindeki değerler önemli ölçüde farklıdır (p<0.05).

** Bu grup için uygulanan Student t-testine göre pektinaz grupları arasında farklılık önemlidir (p<0.01).

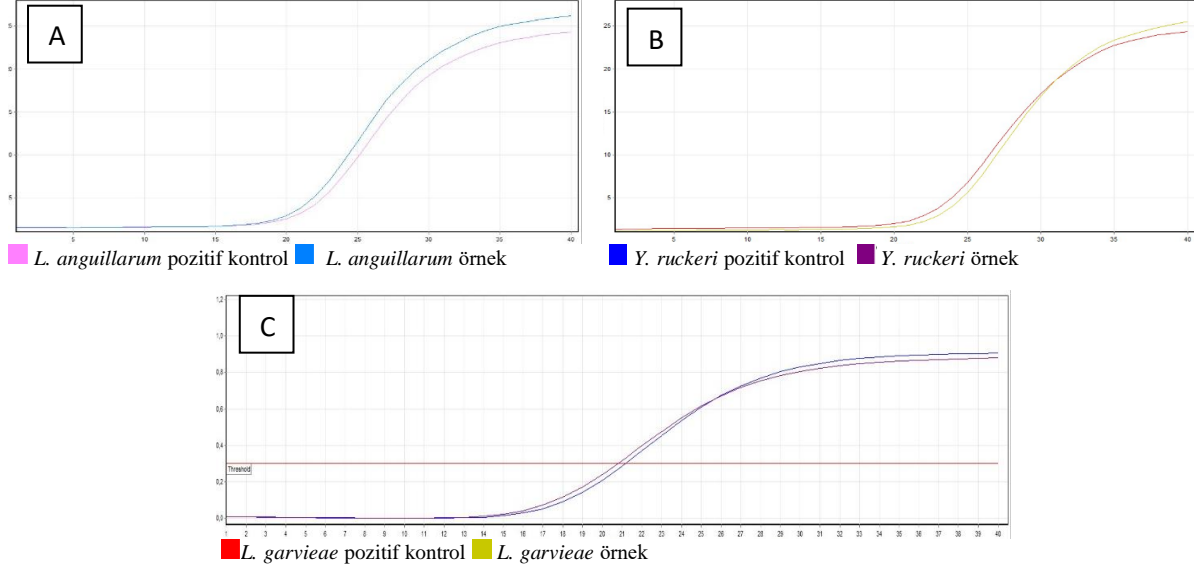
- Aktivite gözlemlenmemiştir.



Şekil 1. Hidrolitik enzim ve siderofor aktivite bölgeleriyle çevrili kolonileri gösteren petri kapları; A) Siderofor (pozitif) B) Selüloz (pozitif) C) Amilaz (negatif) D) Lipaz (pozitif) E) Ksiliniz (negatif) F) Pektinaz (pozitif) G) Proteaz (pozitif).

Test edilen 9 izolat, koloni morfolojileri ve hücrelerin mikroskopik görüntüleri temel alınarak *Listonella* spp. (SO1, SO2, SO3 numaralı izolatlar), *Yersinia* spp. (SO4, SO5, SO6 numaralı izolatlar) and *Lactococcus* spp. (SO7, SO8, SO9 numaralı izolatlar) olarak 3 ana guruba ayrılmıştır. Enzim ve siderofor aktivite ölçümleri tamamlandıktan sonra izolatların moleküler olarak sınıflandırılması, etkinlikleri daha önce yapılmış çalışmalarda kanıtlanmış, türe özgü geliştirilmiş primer çiftleri kullanılarak qPCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda Aoki ve ark. (2000)' nın *L. garvieae* suşlarının tanımlanması için geliştirdiği dihidropteroat sentetaz genini hedefleyen ve başarı ile kullandığı primer çifti seçilmiştir. Önceden kesin tanısı yapılmış olan *L. garvieae* suşlarından izole

edilen kromozomal DNA'nın pozitif kontrol olarak kullanıldığı qPCR denemeleri, SO7, SO8 ve SO9 izolatlarının *L. garvieae* türüne ait alt suşlar olduklarını ortaya koymuştur (Şekil 2.C). Aynı şekilde *Y. ruckeri* patojenini farklı bakteri cinslerinden ve bu cinsin diğer türlerinden ayırt edebilen, *Y. ruckeri* 16s rRNA değişken bölgesini hedef alan primer çifti kullanılmıştır (Gibello ve ark., 1999). Moleküler tanımlaması yapılmış *Y. ruckeri* suşunun pozitif kontrol olarak kullanıldığı qPCR profilleri, SO4, SO5 ve SO6 numaralı izolatların *Y. ruckeri* türüne ait suşlar olduklarını doğrulamıştır (Şekil 2.B). Aynı doğrulama metodu SO1, SO2 ve SO3 numaralı izolatlar için de yapılmış ve PCR profilleri bu izolatların *L. anguillarum* türüne ait olduğunu göstermiştir (Şekil 2.A) (Gonzalez ve ark., 2003).



Şekil 2. Türe özgü primer çiftleri kullanılarak yapılan qPCR amplifikasyon eğrileri (A: *Listonella anguillarum*. B: *Yersinia ruckeri*. C: *Lactococcus garvieae*. X eksen: Döngü sayısını. Y eksen: Florasan ışımaya değerlerini temsil etmektedir).

4. Tartışma ve Sonuç

Farklı orijinlerden izole edilen bakteriler nispeten yeni bir gen, enzim ve ikincil metabolit kaynağı sunduklarından, bu çalışmada, tatlı su kökenli, balık patojeni olarak izole edilmiş bu izolatların biyoteknolojik olarak önemli olan ekstraselüler enzim ve siderofor aktivitesi yönünden araştırılması amaçlanmıştır. Çok sayıda çalışma etçil, otçul ve omnivor balık türlerinin sindirim kanalında çeşitli mikrobiyal topluluklar bildirmiş, bununla birlikte farklı balık türlerinin gastrointestinal sistemi hücre dışı enzim üreten bakteriler açısından da çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir (Ray ve ark., 2012). Farklı balık türlerinin kullanıldığı bu çalışmaların ortak noktası, incelenen bakteri izolatlarının balıkların sindirim sisteminden izole edilmiş olmasıdır (Kar & Ghosh, 2008; Das ve ark., 2014; Koca ve ark., 2015). Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında, enzim aktivite sonuçlarımızın paralellik gösterdiği çalışmalar olmasının yanında farklılık gösteren çalışmalarda mevcuttur. Örneğin, bu çalışmada amilaz aktivitesinin gözlemlenmemesi, proteaz aktivitesinin ise tüm izolatlarda görülmesi Kar & Ghosh (2008)'in sonuçları ile uyumludur (Çizelge 1). Ayrıca gözlemlenen yüksek proteaz ve lipaz aktivitesi literatürdeki çoğu çalışma ile paraleldir (Bairagi ve ark., 2002; Kar & Ghosh, 2008; Esakkiraj ve ark., 2009; Das ve ark., 2014). Ancak bu çalışmada kullanılan bakterilerin sindirim sisteminden değil, balığın böbrek dokusundan izole edilen patojenler oldukları unutulmamalıdır. Dolayısıyla enzim aktivitelerinde gözlemlenen farklılık ve çeşitlilik, izolatların farklı ekoloji ve ihtiyaçları göz önünde bulundurularak değerlendirilmelidir. Yaptığımız araştırmalarda, alabalık kaynaklı hastalık etmeni izolatları yönelik, hidrolitik enzim aktivitelerini inceleyen spesifik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Nişasta moleküllerinin parçalanmasında görev alan amilaz enzim aktivitesinin yanı sıra ksilinaz aktivitesi de incelediğimiz izolatlarda gözlemlenmemiştir (Çizelge 1). Ksilanazlar bitki dokularında bulunan ksilan moleküllerini birincil karbon kaynağı olarak, mikrobiyal popülasyonlar tarafından kullanılan ksiloz birimlerine depolimerize eden enzim gruplarıdır (Nath & Rao, 2001). Bununla birlikte, balık kaynaklı bakterilerin ksilinaz üretimine ilişkin raporlar son derece yetersizdir (Ray ve ark., 2012). German & Bittong (2009)

ağaç yiyen üç yayın balığının (*Panaque nocturnus*, *Hypostomus pyrineusi* ve *Panaque cf. nigrolineatus*) ve bir zararlı yayın balığının (*Pterygoplichthy disjunctivus*) mikrobiyal ekstraktlarında β -ksilozidaz aktivitesi bildirmiştir. Balık kaynaklı bakteriler söz konusu olduğunda ender olarak incelenen bir diğer hidrolitik enzim pektinazdır. İlginç bir şekilde bitki bazlı bir biyopolimer olan pektini parçalayan pektinolitik aktivite izolatların 2'sinde tespit edilmiştir (Çizelge 1). Daha önce çeşitli balık türlerinin bağırsaklarından izole edilen bakterilerde düşük oranda da olsa pektinolitik aktivitenin varlığı 3 çalışmada tanımlanmıştır (Mountfort ve ark., 1993; Sasmal & Ray, 2015; Hossain ve ark., 2020).

Balıklarda mikrobiyom yapısını doğrudan etkilediği tespit edilen faktörlerden en önemlileri konakçı diyetinin türü ve bakteri hücrelerinin içinde bulunduğu fizyolojik koşullardır (Butt & Volkoff, 2019; Hossain ve ark., 2020). Hücre dışı proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahip olmaları bu izolatların virulans aktiviteleri de dahil tüm metabolik aktivitelerinde protein ve yağın önemini göstermektedir. Diğer yandan, incelenen izolatların selüloolitik, amilolitik, pektinolitik veya ksilanolitik aktiviteye sahip olmamaları ya da çok azının sahip olması bitki kaynaklı selüloz, nişasta, pektin, ksilan vb. polisakaritlerinin bu izolatların metabolizmalarında yer almadığını ya da çok az yer aldığı destekler niteliktedir.

Demir tüm canlı hücreler için çok önemli bir mikro besindir. Ancak fizyolojik koşullar altında biyolojik kullanılabilirliği çok sınırlıdır ve hücrelerin büyümesini sağlamak için yeterli değildir. Çoğu hayvan patojeni gibi balık patojenleri de konağın kolonizasyonu için anahtar virülans faktörleri arasında olduğu bilinen karmaşık demir alım mekanizmaları geliştirmiştir. Bu sistemler arasında siderofor üretimi balık patojenik bakterilerinde en iyi çalışan sistemlerin başında gelmektedir (Lemos & Balado, 2020). Balık patojenleri arasında siderofor üretimi ve virülans ilişkisine dair en iyi çalışılmış vakalardan biri *Listonella anguillarum* (*Vibrio anguillarum*) patojenik bakterisidir (Lemos & Balado, 2020). *L. anguillarum* suşları olarak değerlendirilen SO1, SO2 ve SO3 numaralı izolatların göstermiş olduğu siderofor üretim potansiyeli literatür verilerini desteklemektedir. Sideroforların demir sınırlayıcı koşullar altında *in vitro* sentezi *Y. ruckeri* balık patojenlerinde de gösterilmiştir (Romalde ve ark., 1991; Fernández ve ark., 2007). Bu çalışmada *Y. ruckeri* grubuna dâhil edilen SO4, SO5 ve SO6 numaralı izolatlarda gözlemlenen siderofor üretme kabiliyetleri bu çalışmaların sonuçları ile uyumludur. *L. garvieae*'nin kültür süpernatantlarında sideroforun tespiti siderofor aracılı demir alımının bu organizmanın virülansında rol oynayabileceğini ayrıca düşündürmektedir (Schmidtke & Carson, 2003). *L. garvieae* olarak değerlendirilen izolatlardan sadece SO9 numaralı izolatta güçlü bir siderofor üretme potansiyeli görülmüştür (Çizelge 1). Diğer iki izolatta aktif zon gözlemlenmemesi bu izolatların farklı demir alım mekanizmalarını kullandıklarını akla getirmektedir (Sheldon ve ark., 2016).

Bakteriler yüksek tür çeşitliliği ve farklı ortamlara adaptasyonları nedeniyle birçok endüstri için zengin enzim ve yeni ikincil metabolit kaynaklarıdır. Bu nedenle bu izolatların sadece hücre dışı enzimler açısından değil, spesifik ve endüstriyel açıdan önemli sekonder metabolitler açısından da araştırılması önemlidir. Ayrıca tespit edilen enzimlerin niteliksel özelliklerinin ortaya çıkarılması ve üretilen siderofor türlerinin moleküler olarak tayin edilmesi gelecek çalışmaların konuları olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *Y. ruckeri* kültür izolatları Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen FBA-2018-6895 numaralı projeden, *L. garvieae* ve *L. anguillarum* kültür izolatları ise Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen FYL-2019-7463 numaralı projeden kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kaynakça

- Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., Ionata, E., La Cara, F., Pandey, A., & Faraco, V. (2015). Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90, 573-581. doi: 10.1002/jctb.4589
- Aoki, T., Park, C. I., Yamashita, H., & Hirono, I. (2000). Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, 23, 1-6. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00207.x

- Bairagi, A., Ghosh, K. S., Sen, S. K., & Ray, A. K. (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10, 109-121. doi: 10.1023/A:1021355406412
- Butt, R. L., & Volkoff, H. (2019). Gut Microbiota and Energy Homeostasis in Fish. *Frontiers in Endocrinology* (Lausanne), 10, 9. doi: 10.3389/fendo.2019.00009
- Carrim, A. J. I., Barbosa, E., & Vieira, J. D. G. (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 353-359. doi: 10.1590/S1516-89132006000400001
- Das, P., Mandal, S., Khan, A., Manna, S. K., & Ghosh, K. (2014). Distribution of extracellular enzyme-producing bacteria in the digestive tracts of 4 brackish water fish species. *Turkish Journal of Zoology*, 38, 79-88. doi: 10.3906/zoo-1205-3
- Dogan, G., & Taskin, B. (2021). Hydrolytic Enzymes Producing Bacterial Endophytes of Some Poaceae Plants. *Polish Journal of Microbiology*, 70, 297-304. doi:10.33073/pjm-2021-026
- Esakkiraj, P., Immanuel, G., Sowmya, S. M., Iyapparaj, P., & Palavesam, A. (2009). Evaluation of protease-producing ability of fish gut isolate *Bacillus cereus*. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 383-390. doi: 10.1007/s11947-007-0046-6
- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68-76. doi: 10.1016/j.copbio.2020.12.002
- Fernández, L., Méndez, J., & Guijarro, J. A. (2007). Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Veterinary microbiology*, 125, 1-10. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.06.013
- German, D. P., & Bittong, R. A. (2009). Digestive enzyme activities and gastrointestinal fermentation in wood-eating catfishes. *Journal of Comparative Physiology B*, 179, 1025-42. doi: 10.1007/s00360-009-0383-z
- Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Cutuli, M. T., Domenech, A., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (1999). Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 346-50. doi: 10.1128/AEM.65.1.346-350.1999
- Gonzalez, S. F., Osorio, C. R., & Santos, Y. (2003). Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55, 109-15. doi:10.3354/dao055109
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67, 597-607. doi: 10.2307/3758395
- Hossain, T. J., Chowdhury, S. I., Mozumder, H. A., Chowdhury, M. N., Ali, F., Rahman, N., & Dey, S. (2020). Hydrolytic Exoenzymes Produced by Bacteria Isolated and Identified from the Gastrointestinal Tract of Bombay Duck. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2097. doi: 10.3389/fmicb.2020.0209
- Ina-Salwany, M. Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: A review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31, 3-22. doi: 10.1002/aah.10045
- Jalgaonwala, R. E., & Mahajan, R. T. (2011). Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from some indigenous medicinal plants. *Journal of Agricultural Technology*, 7, 1733-1741.
- Kar, N., & Ghosh, K. (2008). Enzyme producing bacteria in the gastrointestinal tracts of *Labeo rohita* (Hamilton) and *Channa punctatus* (Bloch). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 115-120.
- Khan, L. A., Shahzad, R., Al-Harrasi, A., & Lee, J. I. (2017). Endophytic microbes: A resource for producing extracellular enzymes. In D. K. Maheshwari, & K. Annapurna (Eds.), *Endophytes: Crop Productivity and Protection* (pp. 95-110). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-66544-3_5
- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., Hatada, Y., & Ito, S. (1999). Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63, 65-72. doi: 10.1271/bbb.63.65

- Koca, S. B., Yigit, N. Ö., Didinen, B. I., Metin, S., Bayrak, H., Onuk, E. E., & Diler, İ. (2015). Effects of enzyme-producing probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of trout on the growth performance, survival and digestive enzyme activity of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 67, 2015. doi: 10.46989/001c.20695
- Lemos, M. L., & Balado, M. (2020). Iron uptake mechanisms as key virulence factors in bacterial fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 129, 104-115. doi: 10.1111/jam.14595
- Lewis, K., Epstein, S., D'Onofrio, A., & Ling, L. L. (2010). Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 63, 468-76. doi: 10.1038/ja.2010.87
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12, 51-3. doi: 10.1128/jmbe.v12i1.249
- Malathi, S., Priya, D. M., & Palani, P. (2014). Optimization of Protease Enzyme Production by the Halo-Tolerant *Vibrio alginolyticus* Isolated from Marine Sources. In: R. Kharwar, R. Upadhyay, N. Dubey, & R. Raghuwanshi (Eds.), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, New Delhi. doi: 10.1007/978-81-322-1801-2_40
- Mountfort, D. O., Grant, W. D., Morgan, H., Rainey, F. A., & Stackebrandt, E. (1993). Isolation and characterization of an obligately anaerobic, pectinolytic member of the genus *Eubacterium* from mullet gut. *Archives of Microbiology*, 159, 289-295. doi: 10.1007/BF00248486
- Nath, D., & Rao, M. (2001). pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp (NCIM 59). *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 397-403. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00359-8
- O'Brien, S., Hodgson, D. J., & Buckling, A. (2014). Social evolution of toxic metal bioremediation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20140858. doi: 10.1098/rspb.2014.0858
- Önalın, Ş. (2019). Expression differences of stress and immunity genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) with different bacterial fish diseases. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 71, 1-15. doi:10.46989/001c.20978
- Önalın, Ş., & Çevik, M. (2020). Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Biology*, 80, 934-942. doi: 10.1590/1519-6984.234969
- Ray, A. K., Ghosh, K., & Ringø, E. J. A. N. (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: A review. *Aquaculture Nutrition*, 18, 465-492. doi: 10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x
- Romalde, J. L., Conchas, R. F., & Toranzo, A. E. (1991). Evidence that *Yersinia ruckeri* possesses a high affinity iron uptake system. *FEMS Microbiol Letters*, 64, 121-125. doi: 10.1016/0378-1097(91)90581-t
- Sarwar, S., Khaliq, A., Yousra, M., & Sultan, T. (2022). Iron biofortification potential of siderophore producing rhizobacterial strains for improving growth, yield and iron contents of groundnut. *Journal of Plant Nutrition*, 45, 2332-2347. doi: 10.1080/01904167.2022.2063733
- Sasmal, M., & Ray, R. R. (2015). Production of extracellular enzymes by the gut and gill microflora of Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, 3, 44-49. doi: 10.5376/ija.2017.07.0023
- Schmidtke, L. M., & Carson, J. (2003). Antigen recognition by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of whole cell proteins expressed by *Lactococcus garvieae* when obtained directly from fish and under iron limited culture conditions. *Veterinary Microbiology*, 93, 63-71. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00440-6
- Sheldon, J. R., Laakso, H. A., & Heinrichs, D. E. (2016). Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Microbiology Spectrum*, 4, 4-2. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0010-2015
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6, 174. doi: 10.1007/s13205-016-0485-8
- Soares, E. V. (2022). Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106, 3985-4004. doi: 10.1007/s00253-022-11995-y