

T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
2019-YL-108

KÜLTÜR BALIKÇILIĞINDA PATOJEN  
*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*  
BAKTERİSİNE KARŞI LİTİK BAKTERİYOFAJIN  
ARAŞTIRILMASI

Öyküsü ATILGAN

Tez Danışmanı:  
Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU

AYDIN



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Öyküsü ATILGAN tarafından hazırlanan “Kültür Balıkçılığında Patojen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Bakterisine Karşı Litik Bakteriyofajın Araştırılması” başlıklı tez, 29.08.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Çisem BULUT ALBAYRAK	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof. Dr. Hatice GÜNEŞ	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla .....tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

29/08/2019

İmza

Öyküsü ATILGAN



## ÖZET

### KÜLTÜR BALIKÇILIĞINDA PATOJEN *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* BAKTERİSİNE KARŞI LİTİK BAKTERİYOFAJIN ARAŞTIRILMASI

Öyküsü ATILGAN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU  
2019, 40 Sayfa

Akva kültürde pasterelloz hastalığına neden olan ajan olarak bilinen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* bakterisi, özellikle kültür balıklarını etkileyerek balık kayıplarına ve üretim kayıplarına neden olmaktadır. Söz konusu bakterinin akva kültür endüstrisinde sıkça kullanılan antimikrobiyal maddelere dirençli olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, akva kültür endüstrisinde toplu balık ölümlerine neden olan ve birçok antibiyotiğe karşı dirençli *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisine karşı spesifik ve litik özelliğe sahip bakteriyofaj izolasyonu amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında Aydın Bafa Gölü yöresindeki balık çiftliklerinden 2016, 2017, 2018 ve 2019 yıllarındaki salgınlar sırasında toplanan tank suları, üretim suları ve deşarj suları olmak üzere toplam 22 litre atık su bakteriyofaj varlığı bakımından agar spot yöntemi ve yumuşak tabaka agar yöntemi ile test edilmiştir. Enfekte yavru balıkların dalak ve kalp örnekleri ve Aydın Büyükşehir Belediyesi Atık Su ve Kanalizasyon İdaresi Evsel Atık Bertaraf Tesisi'nden toplanan kanalizasyon suyu örnekleri bakteriyofaj varlığı bakımından agar spot yöntemi ve yumuşak tabaka agar yöntemi ile incelenmiştir. Deneyle sonucunda, faj plaklarına benzer plak oluşumları petri kabında gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Bakteriyofaj, Antibiyotik Direnci, Akva Kültür.





## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF LYTIC BACTERIOPHAGE AGAINST PATHOGENIC *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* IN AQUACULTURE

Öyküsu ATILGAN

M.Sc. Thesis, Department of Food Engineering  
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Olcay BOYACIOĞLU  
2019, 40 Pages

In aquaculture *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, which is known as the causative agent of pasteurellosis, especially effects the cultured fish and cause fish losses and production losses. The bacterium is known to be resistant to antimicrobial agents that commonly used in aquaculture industry. In this thesis, it was aimed to isolate specific and lytic bacteriophage against *P. damsela* subsp. *piscicida*. Within the scope of the thesis, tank waters, production waters and discharge waters collected from fish farms in Aydın Bafa Lake region during the outbreaks in 2016, 2017, 2018 and 2019 years. Total 22 liters of these samples were tested with agar spot method and soft layer agar method for the presence of bacteriophage. The spleen and heart samples of infected fish larvae and sewage water samples which were collected from Aydın Metropolitan Municipality Waste Water and Sewerage Administration Domestic Waste Disposal Facility were examined for the presence of bacteriophage by agar spot method and soft layer agar method. As a result of the experiments, plaque formations similar to phage plates were observed in the petri dish.

**Key words:** *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Bacteriophage, Antibiotic Resistance, Aquaculture.



## ÖNSÖZ

Tez çalışması süresince her konuda bana destek olan ve bilgilerinden faydalandığım, beni yetiştiren değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Olcay BOYACIOĞLU'na (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince laboratuvar malzemelerini hiçbir zaman benden esirgemeyen Doç. Dr. Özge ÇEVİK'e (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Bölümü), her anlamda desteğini arkamda hissettiğim Öğr. Gör. Dr. Mürüvvet URAL ABBAK'a (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi), katkılarından dolayı Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK'a (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü), manevi desteklerini hep hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ'a ve Öğr. Gör. Mehmet ÇELEBİ'ye (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü) teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışması kapsamında kullanılan atık suların, hastalıklı yavru balıkların ve bakterinin temin edilmesini sağlayan Gülçin Menderes'e (Kılıç Holding A.Ş. Yavru Balık Üretim Tesisi Balık Sağlığı Şefi) ve Kılıç Holding A.Ş.'ye teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan sevgili arkadaşlarım Şeyma Nur AKKAYA'ya, Feyza ELMAS'a, Şevin Ece GÜNDEŞ'e, çalışma arkadaşlarım Hatice ÖZHAN, Nursena ZEYBEKOĞLU ve Betül KARA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, tezimin her aşamasını benimle birlikte yaşayan ailemin her bir üyesine, ablasının en büyük neşesi olan kardeşim Ata Deniz ATILGAN'a, tezim boyunca sabrını, hoşgörüsünü ve desteklerini benden esirgemeyen Çağdaş Can ÇUBUKÇU'ya, ev arkadaşım, canım oğlum Thor'a en içten ve sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim. Bu tez benim olduğu kadar sizindir.

Öyküsü ATILGAN



# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Türkiye’de ve Dünya’da Kültür Balıkçılığı (Akva Kültür).....	3
2.2. Akva Kültürde Görülen Mikrobiyal Hastalıklar ve Zararları.....	4
2.3. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Bakterisi.....	5
2.4. Balık Hastalıklarında Antibiyotik Kullanımı ve Zararları.....	6
2.5. Bakteriyofajların Tanımı, Özellikleri ve Hayat Döngüleri.....	8
2.6. Bakteriyofajların Biyokontrol Ajanı Olarak Kullanılmasının Sunduğu Avantajlar.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Bakteri Kültürü ve Kültür Koşulları.....	12
3.2.2. Kullanılan Besiyerlerinin Bakteri Büyümesine Etkisi.....	13

3.2.3. Bakteri Tanımlamasının Yapılması.....	14
3.2.4. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Bakterisinin Büyüme Grafiğinin Oluşturulması .....	16
3.2.5. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Bakterisinin Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi.....	16
3.2.6. Enfekte Balıklardan <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 'ya Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonunun Yapılması .....	17
3.2.7. Deneylede Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	19
3.2.8. İstatistiksel Analiz .....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1. Bakteri Kültürü ve Kültür Koşulları.....	20
4.2. Kullanılan Besiyerlerinin Bakteri Büyümesine Etkisi.....	20
4.3. Bakteri Tanımlamasının Yapılması.....	21
4.4. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Bakterisinin Büyüme Grafiğinin Oluşturulması .....	23
4.5. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> Bakterisinin Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi.....	25
4.6. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> 'ya Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonunun Yapılması.....	28
5. SONUÇ .....	30
KAYNAKLAR.....	31
ÖZGEÇMİŞ.....	39

## KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
bç	: Baz Çifti
BHI	: Brain Heart Infusion
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDA	: Avrupa Savunma Ajansı
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
FTS	: Fosfat Tamponlu Salin
FPB	: Balık Tozu ile Hazırlanmış Sıvı besi yeri
LB	: Luria Bertani
MHA	: Mueller Hinton Agar
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	: Tris Asetat EDTA
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
TSBPK	: Pepton ve $K_2HPO_4$ Eklenmiş Tryptic Soy Broth
TÜİK	: Türk İstatistik Kurumu
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
USEPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
UV	: Ultra Viyole





## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> enfeksiyonu geçiren bir levrek kanından yayma preparat (Hawke, 2012). .....	5
Şekil 2.2. Bakteriyofajların enfeksiyon döngülerinin şematik olarak gösterimi (litik ve lizogenik döngü) (Maura ve Debarbieux, 2011) .....	8
Şekil 3.1. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	15
Şekil 4.1. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> bakterisinin gram boyama işleminden sonra çekilmiş mikroskop görüntüsü .....	20
Şekil 4.2. BHI (solda) ve TSB (sağda) besi yerlerinde bir gece inkübe edilmiş <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> bakterisi .....	21
Şekil 4.3. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> suşundan elde edilen çoklu PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	22
Şekil 4.4. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> bakterisinin optik yoğunluk değerlerinin zamana göre değişim grafiği.....	23
Şekil 4.5. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> bakterisinin antibiyogram görüntüleri.....	27
Şekil 4.6. Çeşitli örneklerden yumuşak tabaka agar yöntemi ile elde edilen ve faj plaklarına benzeyen petri kabı görüntüleri.....	29



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hazırlanan ve kullanılan besiyerleri içerikleri .....	13
Çizelge 3.2. PZR için kullanılan sıcaklık ve süre protokolü .....	15
Çizelge 3.3. Antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılan çeşitli antimikrobiyal ajanlar .....	17
Çizelge 4.1. besi yerinin bakteri sayısına etkisi .....	21
Çizelge 4.2. Zamana göre değişen optik yoğunluk değerleri .....	24
Çizelge 4.3. <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> bakterisinin antimikrobiyal direnç profili .....	25



## 1. GİRİŞ

Bakteriyofajlar, üremek için bakteri hücrelerinin kaynaklarını kullanan, bakterilerin zorunlu parazitleridir. Genel olarak oldukça spesifikler ve bu spesifiklik genellikle tek bir bakteri türünde belirli suşlarla sınırlıdır.

Bakteriyofajların hayat döngüleri değişiklik göstermektedir. Bazı bakteriyofajlar, bakteri hücre duvarı bileşenlerini tanıdıktan ve hücre duvarına tutunduktan sonra genetik materyallerini sitoplazmaya bırakırlar ve daha sonra materyalin çoğalmasını sağlayarak konak bakteri hücrelerinin yıkımına sebep olurlar (litik döngü). Bir diğer hayat döngüsüne sahip olan bakteriyofajlar ise kendi genetik materyallerini hücre DNA'sına entegre ederek konak hücre ile birlikte çoğaltırlar ve hücre yıkımına neden olmazlar (lizogenik döngü). Bakteriyofajlar, litik etkiye sahip olduklarında virionların oluşumu konak hücre yıkımı ile gerçekleşir. Antibiyotikler, birçok bakteriyel enfeksiyonu tedavi etmede yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı kullanımı, patojen bakterilerin antibiyotik direnci kazanmasına sebep olmaktadır ve bu sorun bakteriyel enfeksiyonların tedavi edilmesini güçleştirmektedir. Bakterilerin doğal düşmanı olan bakteriyofajların, antibiyotiklere karşı alternatif bir tedavi ve biyo-koruyucu olarak kullanımı oldukça popüler bir yöntem olmuştur. Bakteriyofajların gıda güvenliğinde kullanımı, gıda kaynaklı enfeksiyonların engellenmesi bakımından biyo-koruyucu ajanların kullanılması alanına yeni ve farklı bakış açıları kazandırmaktadır. Gıda güvenliğinde bakteriyofajların kullanımı, diğer koruyucu ajanlar ile kıyaslandığında fajların toksik olmaması, alerjik sorunlar yaratmaması ve genel olarak gıdanın kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirmemesi nedenleri ile tercih edilmektedir. Gıdalarda kullanılacak bakteriyofajların, litik döngüye sahip olması istenilmektedir.

Fajların gıda güvenliğinde kullanımı oldukça ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bazı bakteriler, bakteriyofajlara karşı birtakım savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Çoğu bakteriyofaj, geliştirilen bu savunma mekanizmalarına karşı adaptasyon sağlayarak bakteri ile birlikte bir evrim sürecine girmektedir. Fakat bazı durumlarda, bu savunma mekanizmalarının önüne geçmek amacıyla genetik olarak geliştirilmiş fajlar veya faj kokteylleri kullanılmaktadır.

Son yıllarda gıda kaynaklı enfeksiyonların sebep olduğu hastalıklar, iyileşen hijyen koşullarına, gelişen teknolojiye ve insanların bu konuda bilinç kazanmaya

başlamalarına karşın, halen dünya genelinde büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu durum ekonomi ve sağlık açısından çok çeşitli sorunlar doğurmaktadır. Bakteriyofajların gıda güvenliğinde kullanımı, gıda kaynaklı enfeksiyonların engellenmesi bakımından biyo-koruyucu ajanların kullanılması alanına yeni ve farklı bakış açıları kazandırmaktadır. Bakteriyofajların gıda güvenliğinde kullanımının avantajları olduğu kadar dezavantajları da bulunmaktadır. Bakteriyofaj kullanımının en önemli avantajı, bakteriyofajların konağa göre oldukça spesifik olmalarıdır, bu özellik fajların diğer mikrobiyotaya herhangi bir etkiye bulunmamalarını sağlar. Ayrıca fajlar, gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların ve indikatör mikroorganizmaların hızlı ve ucuz şekilde tayin edilmelerini sağlarlar. Fajların diğer önemli özellikleri ise, kolay izole edilebilmeleri, çevresel strese dayanıklı olmaları ve kendi kendilerini çoğaltabilme özelliklerinin olmasıdır, yani elverişli konak olduğu sürece bakteriyofajlar kolaylıkla sayılarını arttırabilmektedirler. Az olmakla birlikte, bakteriyofajların bir dezavantajı ise bazı gıda ürünlerinde genellikle istenen bakterilerin, bakteriyofajlar tarafından inhibe edilmesidir, bunun sonucunda gıda ürünlerinde istenilmeyen kimyasal ve fiziksel özellikler ortaya çıkmaktadır. Bakteriyofajların bir diğer dezavantajı ise, bakteriler ve bakteriyofajlar arasındaki yarışın sonucunda, bakterilerin bakteriyofajlara karşı direnç geliştirebilmeleridir.

Günümüzde birçok faj ürünü Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) ve Avrupa Savunma Ajansı (EDA)'nın onayını alarak, gıda ve yüzey sanitasyonu, tarım, hayvancılık ve tıp alanlarında kullanılmaya başlanmıştır. Antibiyotiğe karşı alternatif bir yöntem olan fajların ve faj kokteyllerinin kullanımı, rağbet gören ve her geçen gün önem kazanmaya başlayan bir konu olmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, kültür balıkçılığı kuluçkahanelerinin yoğun olarak bulunduğu Aydın, Bafa Gölü yöresindeki tesislerden elde edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisi ile enfekte olmuş balıkların dalak ve kalp örneklerinden, balıkların üretiminde kullanılan deşarj ve tank sularından ve kanalizasyon sularından alınan örneklerin kullanımı doğrultusunda, bu bakteriye özgü ve bu bakterinin doğal düşmanı olan, litik etkiye sahip bakteriyofaj izolasyonunun yapılmasıdır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Türkiye’de ve Dünya’da Kültür Balıkçılığı (Akva Kültür)

Akva kültür, yüzgeçli balıklar ve kabuklu deniz canlıları da dahil olmak üzere suda yaşayan organizmaların, dışarıdan ilaçlama, besleme, kontrollü üreme gibi müdahalelerle üretiminin artırılması olarak tanımlanmaktadır (Sapkota vd., 2008). Dünya genelinde 20.yy’da önem kazanmaya başlayan bu endüstrinin, tarihsel zamanda da M.Ö.2500 yıllarında Mısır’da ve M.Ö.1100 yılında Çin’de örneklerine rastlanmıştır (Glover, 1992). 1960’lı yıllardan beri gelişen su kalitesi, hastalık kontrolü, yetiştirilen ürünleri için geliştirilen ve tam anlamı ile yeterli besini sağlayan yemlerin üretilmesi, selektif üretme, hibridizasyon ve moleküler genetik teknolojisinin uygulanmasıyla birlikte stokların iyileştirilmesi ve geliştirilmesi gibi koşullar nedeniyle, su ürünleri yetiştiriciliği ve üretimi artmıştır (Stickney, 1994). İnsan ırkı, artan tüketime paralel olarak efektif bir gıda üretim kaynağı için sürekli arayış içerisinde. Akva kültür endüstrisinin bu kadar yaygın olmasının en büyük nedenlerinden biri ise, hızla artan insan popülasyonunun dengeli bir diyet için gereksinim duyduğu makro ve mikro besin değerlerinin deniz ürünlerinden yeteri kadar sağlanabilmesidir (Allison Edward, 2013). Su ürünlerinden elde edilen gıdaların, gıda güvenliğinin sağlanması açısından da bu endüstri önemini belirtmektedir (Al-saari vd., 2018). Dünya genelinde ise akva kültür tesisleri, deniz ürünleri tedarikinin 3’te 1’ini sağlamaktadır (Pereira vd., 2011). Günümüzde, Dünya genelinde 30’dan fazla deniz balığı türü kuluçkahanelerde ve açık denizlerde kültüre edilmektedir (Boran vd., 2013). Amerikan Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)’nün 2016 yılı verilerine göre, yılda yaklaşık 110,2 milyon ton deniz ürünü insan tüketimi için üretilmektedir (FAO, 2016). Ayrıca spor balıkçılığı ve yabani hayvanların çoğaltılması için kuluçkahanelerde alabalık, çipura ve levrek gibi birçok balık üretilmektedir. Bu nedenle, kültür balıkçılığının sadece insan nüfusunu beslemekle kalmayıp, aynı zamanda belirli türleri yenilemek için de hayati bir hizmet sağladığı kabul edilmelidir (Boran vd., 2013).

Akva kültür endüstrisinin devlet desteği ve teknolojinin gelişmesi ile birlikte süregelen teknolojik desteklerle hızla gelişmesinden dolayı, global gelişmelere ayak uyduran bir çok Akdeniz ülkesi, başta Fransa, İtalya, İspanya, Türkiye ve Yunanistan olmak üzere Güney Avrupa’nın en önemli su ürünleri yetiştiricileri konumundadırlar (Grigorakis ve Rigos, 2011).

Türkiye’de ise akva kültürü, 1970’lerden sonra gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kültürüyle başlamıştır ve nispeten yeni bir endüstri olmasına rağmen hızla gelişmektedir. Gökkuşığı alabalığı, levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) Türkiye’de en yaygın olarak yetiştirilen balık türleridir (Türe ve Alp, 2016). Türkiye’nin Avrupa ülkeleri arasında en büyük balık üreticilerinden biri olduğu ve yılda yaklaşık 276,000 ton balık ürettiği bildirilmiştir (Türk İstatistik Kurumu (TÜİK), 2017). Ülkemizde balık üretim tesis kapasiteleri değerlendirildiğinde, %41’lik oranla ilk sırada Muğla bulunmaktadır, bunu %13 ile İzmir, %3-4 oranlarla Aydın, Bilecik, Çanakkale, Kayseri ve Antalya illeri, %1,5–2 oranla da Rize, Ordu, Trabzon, Samsun, Denizli, Rize, Ordu, Denizli, Samsun, Isparta, Kahramanmaraş ve Burdur illeri izlemektedir (Yavuzcan vd., 2010).

## **2.2. Akva Kültürde Görülen Mikrobiyal Hastalıklar ve Zararları**

Su kaynaklı hastalıklar, su ekosistemlerinin doğal bir parçasıdır ve çoğunun balıkçılık veya su ürünleri yetiştiriciliği için ekonomik sonuçları vardır (Lafferty vd., 2014). Akva kültür endüstrisi, çoğunlukla kontrolsüz mikrobiyal hastalıklara bağlı olarak ağır mali kayıplara maruz kalmaktadır. Olumsuz çevre koşulları, yetersiz beslenme, yüksek su sıcaklığı, seyrek su yenileme ve çiftçilik alanından yaralı ve ölü balıkların uygunsuz şekilde uzaklaştırılması gibi faktörler mikrobiyal hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Silva vd., 2014). 2014 yılında yapılan bir çalışmada, deniz canlılarının birçok etmen tarafından hasta edilebildiği belirtmiştir. Hastalıklar sonucu ortaya çıkan en önemli ekonomik kaygı etmeni ise 67 örneğin değerlendirilmesi sonucunda %34 oranına sahip olan bakteriyel hastalıklar olarak belirlenmiştir (Lafferty vd., 2014).

Vibriyöz ve fotobakteriyöz (önceden pastörellöz olarak adlandırılmıştır), doğal ve ticari olarak yetiştirilen tatlı su ve deniz balıklarında en sık rastlanan mikroorganizma kaynaklı hastalıklardandır. Her iki hastalık, genellikle üretim tesislerinde sık sık salgınlara sebep olmaktadır. Bu hastalıklar ile enfekte olmuş tesislerde %100’e varan balık ölümleri görülmekte ve dolayısı ile ciddi ekonomik kayıplar meydana gelmektedir (Mateus vd., 2014). Bu hastalıklara neden olan patojenlerin doğal konakçıları çok çeşitli deniz balıklarıdır. Fotobakteriyöz hastalığı, Japonya’da özellikle sarıkuyruk kültürlerini etkilemektedir. Akdeniz bölgesinde ise, çipura ve levrek çiftliklerinde neden olduğu kayıplar nedeniyle büyük bir ekonomik etkiye sahiptir (Romalde, 2002). Gökkuşığı alabalığı, çipura

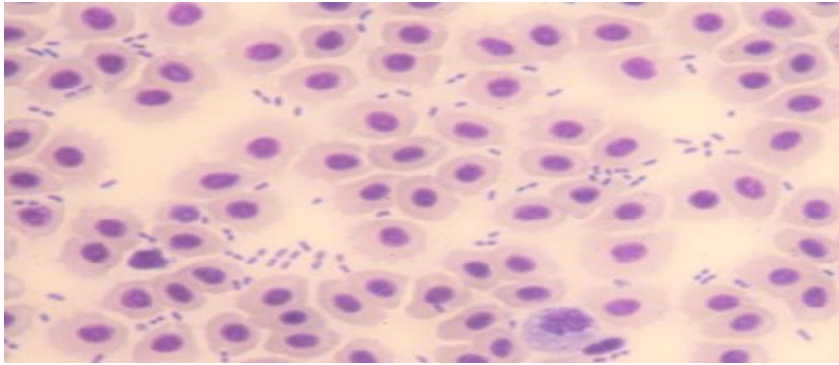


ve levrek Türkiye'de yetiştirilen en baskın balık türleri olduğundan (TÜİK, 2012), hastalık etkenlerinin çoğu bu üç grup balıktan izole edilebilir.

Yiyecek olarak üretilen deniz ürünleri dışındaki deniz türleri de hastalıklardan etkilenecek ekonomik geliri düşürmede bir role sahip olabilir. Örneğin, tropikal akvaryum balıkları evcil hayvan ticareti yoluyla pazarlanır. Mercanlar, deniz kabukları ve denizyıldızları dekoratif parçalar ve hediyelik eşyalar olarak satılmaktadır. Balinalar, yunuslar, mercanlar, denizyıldızları ve deniz su samuruları gibi ikonik deniz türleri turizmi desteklemektedir (Lafferty vd., 2014).

### 2.3. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Bakterisi

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (önceki adı *Pasteurella piscicida*), balık fotobakteriyözünden sorumlu olan, hücre içi fakültatif, halofilik ve Gram negatif bir bakteridir. Bu bakteri, 15-32°C sıcaklıklarda gelişebilir, fakat optimum büyüme sıcaklığı 22,5-30°C arasındadır (Romalde, 2002). Kültür balıkçılığında, kuluçka havuzlarının su sıcaklıkları genellikle 25-26°C'dir (Anonim, 2018). Bu sıcaklıklar, *P. damsela* subsp. *piscicida* için optimum sıcaklık değerleri arasında bulunduğundan ortamda bakteri kolayca çoğalabilmektedir. *P. damsela* subsp. *piscicida* enfeksiyonu geçirmiş levrek kanından yapılan yayma preparatın görüntüsü Şekil 2.1.'de verilmiştir (Hawke, 2012).



Şekil 2.1. *P. damsela* subsp. *piscicida* enfeksiyonu geçiren bir levrek kanından yayma preparat (Hawke, 2012).

Vibrionaceae ailesine ait olan *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin neden olduğu pastörellöz veya fotobakteriyöz, kültür balıkçılığı endüstrisinde yüksek maliyetli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Magariños vd., 2003). *P.*

*damselae* subsp. *piscicida*, balıklar için yüksek oranda patojendir ve konak seçiminde özgüllüğe sahip değildir, dolayısı ile her balık türü bu bakteri tarafından konak olarak seçilebilir (Pereira vd., 2011). Fotobakteriyöz, akut septisemik formda özellikle genç balıklarda, masif mortalite ve kronik formda genellikle yaşlı balıklarda ortaya çıkabilir (Carraro vd., 2018). Balık larvalarında ise, larvaların immün sistemlerinin yeterince gelişmemiş olmasından dolayı, bu hastalık çok daha etkili şekilde görülür (Vadstein, 1997). Fotobakteriyöz hastalığı Dünya’da öncelikle 1963 yılının yaz aylarında, Amerika Birleşik Devletleri’nin Chesapeake Koyu’nda yetişen beyaz ve çizgili levreklerin büyük çoğunluğunun ani şekilde ölümü ile gündeme gelmiştir. Daha sonra hasta balıkların iç organları ve kanları incelendiğinde, bu ölümlere *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin neden olduğu belirlenmiştir (Snieszko vd., 1964). Türkiye’de ise, *P. damsela* subsp. *piscicida* çok sayıda balık türünde görülmüştür fakat ilk olarak Ege Denizi’nden elde edilen hastalıklı çipuralardan izole edilmiştir (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1993). Daha sonra levrekten (Demircan ve Candan, 2006), gökkuşuğu alabalığından (Savaş ve Türe, 2007) ve de kefalden (Tanrıkul ve Çağırğan, 2001) elde edilen izolatlar rapor edilmiştir. Bafa Gölü çevresindeki kuluçkahanelerde *P. damsela* subsp. *piscicida* enfeksiyonlarının 2015 yılında % 100’e varan oranda üretimi baltadığı ve kullanılan tüm antibiyotiklere karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Anonim, 2018). Takip eden yıllardaki salgınlarda ise o kadar dirençli suş ile karşılaşılma ve antibiyotik tedavileri ile oluşabilecek zararın büyük boyutlara ulaşması engellenebilmiştir.

#### **2.4. Balık Hastalıklarında Antibiyotik Kullanımı ve Zararları**

Antibiyotikler 1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfinden sonra yüz yıla yakın süredir insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde bakteriyel enfeksiyonların tedavisi amacı ile kullanılmaktadır. Akva kültürlerde karşılaşılan bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde de antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Higuera vd., 2013; Anonim, 2018). Su ürünleri üretim tesislerinde de sık sık tedavi ve büyüme destekleyici olarak kullanılan antibiyotikler, yem katkı maddeleri şeklinde yeme eklenerek ya da antibiyotikli daldırma banyoları şeklinde yaygın biçimde kullanılmaktadırlar (Li vd., 1999). Su ürünleri yetiştiriciliğinde bilinçsiz veya yanlış kullanılan antibiyotikler, balıklar için patojen olan bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına neden olur (Türe ve Alp, 2016). Bu direnç genleri, yatay gen transferi yolu ile diğer bakterilere iletilebilmektedir (Altınok vd., 2015). Dolayısı ile direnç genlerinin

yayılmasının sonucu olarak, balık çiftliklerinde antibiyotik tedavileri başarısız olabilmekte ve ciddi kapsamlı balık kayıpları önlenememektedir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada balıkların derisinden ve iç organlarından izole edilen ve balıklar için patojen özellik gösteren tüm bakterilerin imipenem, sülfametoksazol ve aztreonam antibiyotiklerine karşı direnç gösterdikleri kanıtlanmıştır (Çapkın vd., 2015). Mısır'da yapılan başka bir çalışmada ise izole edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* suşlarının ampisilin, gentamisin, siprofloksasin, sefotaksim ve rifampisilin antibiyotiklerine dirençli oldukları ve oksitetrasiklin antibiyotiğine ise orta düzey direnç gösterdikleri gösterilmiştir (Essam vd., 2016). Bu sonuçlardan, *P. damsela* subsp. *piscicida* suşunun birçok antibiyotiğe direnç gösterdiği ve her geçen yıl direnç gösterdiği antibiyotiklerin sayısının arttığı söylenebilir. Sahadan alınan bilgilere bakılırsa, 2017-2018 üretim sezonunda Bafa Gölü'nde işletmelerde sorun oluşturan *P. damsela* subsp. *piscicida* suşuna karşı dönem dönem antibiyogram testleri yapılarak bu testlerin sonuçlarına göre tedavi amaçlı sırasıyla enroflaksasin, florfenikol ve oksitetrasiklin antibiyotikleri kullanılmıştır (Anonim, 2018).

Günümüzde, birçok patojen bakterinin antibiyotik direnci geliştirmesi nedeni ile dünyada ve ülkemizde bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımını önlemek amacı ile sağlık sistemlerinde bazı düzenlemelerin yapılmasına gerek duyulmuştur (Aydın ve Gelal, 2012). Dağlardan gelen doğal su kaynakları hariç, diğer yüzey sularında antibiyotik kalıntılarının bulunduğu ve bu kalıntıların canlılar için tehlikeli konsantrasyonlara ulaşabildiği ifade edilmiştir (Yang ve Carlson, 2003). Yer altı sularında ve kuyu sularında yapılan bir çalışmada, yer altı suyunun da çeşitli antibiyotiklerle kontamine olduğu ve bu kontaminasyonun bazı bakterilerde antibiyotik direnci geliştirebilecek seviyede olduğu rapor edilmiştir (Batt vd., 2006). Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak, aşırı seviyede kullanılan ve doğaya salınan antibiyotiklerin doğayı kirlettikleri ve doğal mikroflorada bulunan bakterilerde antibiyotik direncinin gelişmesini tetikledikleri söylenebilir. İlaveten, günümüzde tüketici bilincinin artması ile birlikte, antibiyotik kullanılarak üretildikleri bilinen kültür balıkları ve kümes hayvanları gibi ürünlerin sağlığı tehdit edebilme potansiyelleri tüketicilerde tedirginlik oluşturabilmektedir.

Yukarıda bahsedilen sakıncalardan dolayı, gıda endüstrisinde patojen bakteriler ile mücadelede etkin, doğa dostu ve düşük maliyetli çözümler aranmaktadır. Bu çözümlerden birisi 'yaşayan ilaçlar' olarak da bilinen litik bakteriyofajların kullanılmasıdır (Jassim ve Limoges, 2014).



Ek olarak, fajların üretilmesi kolay ve maliyeti düşüktür. Birçok çevresel ve biyolojik koşullara (sıcaklık, pH, organik çözücüler, proteazlar) dayanıklıdır. Ayrıca canlı ve ölü konak hücreleri ayırt edebilme yeteneğine sahiptirler (Schmelcher vd., 2012).

## **2.6. Bakteriyofajların Biyokontrol Ajanı Olarak Kullanılmasının Sunduğu Avantajlar**

Bakteriyofajların biyokontrol ajanı olarak kullanılmasının sunduğu avantajlar aşağıdaki şekilde rapor edilmiştir:

- Fajlar prokaryot virüsleridir, ökaryot hücreleri tanımazlar ve onlara zarar vermezler. Dolayısıyla fajların insanlara, hayvanlara ve bitkilere karşı zararlı bir etkisinin olduğunu gösteren herhangi bir çalışmaya literatürde yer verilmemiştir.
- Fajların, bakteriyel hücre duvarı bileşenlerini tanıyan reseptörleri bulunmaktadır. Bu yüzden konak seçiminde yüksek özgüllüğe sahiptirler. Bu özellik geri kalan mikrobiyotanın korunmasını ve sadece hedef bakterinin fajlar tarafından enfekte edilmesini sağlar. Ayrıca fajların bu özelliği diğer antimikrobiyal ajanlara göre geri kalan mikrobiyotaya hasar vermemesi açısından önemlidir (Sillankorva vd., 2012).
- Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direncin aksine fajlara karşı da dirençli hale gelmeleri olasılığı düşüktür. Bakteriler faj savunma mekanizmaları geliştirdikçe, fajlar da bu geliştirilmiş bakteriyel savunma sistemlerine sürekli olarak adapte olup kendilerini aynı derecede geliştirebilirler (Schmelcher ve Loessner, 2014).
- Fajlar kendinlerini çoğaltabildikleri için patojen bakterinin en çok bulunduğu yerde özellikle yüksek sayıda bulunurlar. Düşük doz uygulamalarında bile fajın kendine uygun bir konak bulduğu sürece çoğaldığı ve antimikrobiyal etkiyi arttırdığı bilinmektedir (Sillankorva vd., 2012).
- Faj uygulamalarının gıda bozunmalarını engellediği (Hudson vd., 2016) ve gıdaların raf ömürlerini uzattıkları kanıtlanmıştır (Wang vd., 2017)
- Fajlar genellikle doğal nükleik asitler ve proteinlerden oluştuğu için, düşük toksisiteye sahiptirler.

- Fajların izolasyonu nispeten ucuzdur ve yayılması kolaydır (Sillankorva vd., 2012).
- Fajlar doğada her alanda bulunurlar ve çok çeşitli yerlerden izole edilebilirler (Zhang vd., 2015).
- Fajlar çevresel koşullara oldukça dayanıklıdır (Sillankorva vd., 2012).

Tüm bu nedenlerden dolayı bakteriyofajlar; son yıllarda tarım, hayvancılık ve tıpta bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde, gıda patojenleri ile kontamine olmuş gıdaların ve gıda bozucu bakterilerin bertaraf edilmesinde, gıda ürünlerinin üretildiği ekipman yüzeyi ve araç-gereç dezenfeksiyonunda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Boyacıoğlu vd., 2013; 2016). Ayrıca ABD’de faj teknolojilerine önem veren şirketler, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (USEPA), USDA ve FDA onayı ile faj tabanlı ürünleri başarılı bir şekilde geliştirip bu faj ürünlerini gıda endüstrisinde kullanılmak üzere ticari olarak pazarlamaktadırlar (Lu ve Koeris, 2011).

Literatüre bakıldığında çeşitli deniz kaynaklı patojen bakterilere karşı birçok faj izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Deniz kaynaklı patojenlerden olan *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio vulnificus* bakterileri istiridyeler için tehdit oluşturmakla birlikte, bu istiridyelerin tüketimi ile insan sağlığını da tehdit etmektedir. Salgının kontrol edilmesi amacı ile istiridyelerden bu bakterilerin doğal düşmanı bakteriyofajlar izole edilmiştir (Richards vd., 2019). Alabalık üretiminde balıklarda çeşitli hastalıklara dolayısı ile ürün kaybına yol açan *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinde karşı bakteriyofaj izolasyonu çalışması yapılmıştır (Stenholm vd., 2008). Tuzlu su karideslerinde vibriyöz hastalığına neden olan *Vibrio parahaemolyticus* bakterisine karşı izole edilen bakteriyofajların kullanılmasıyla karideslerdeki ölüm oranının düştüğü rapor edilmiştir (Martínez-Díaz ve Hipólito-Morales, 2013). Beyaz bacaklı karides larvalarında yapılan bir çalışmada ise bakteriyofajların kullanımı larvalardaki *Vibrio parahaemolyticus* kaynaklı ölümleri azaltmıştır (Lomelí-Ortega ve Martínez-Díaz, 2014) Atlantik somon balığında vibriyöz hastalığına neden olan *Vibrio anguillarum* bakterisine karşı yapılan bakteriyofaj izolasyonunun, fajların balık tanklarına eklenmesi ile mevcut ve ileride oluşacak olan vibriyöz hastalığına karşı bir çözüm olabileceği düşünülmüştür (Higuera vd., 2013). Yine akva kültür endüstrisinde sıkça rastlanan bir hastalık etmeni olan *Vibrio anguillarum* bakterisine karşı izole edilen fajların Zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarının üretiminde vibriyöz hastalığına karşı koruyucu bir etmen olabileceği belirtilmiştir

(Silva vd., 2014). Dünya’da gökkuşuğı alabalığı üretiminde weissellöz hastalığına neden olan etmen olarak bilinen *Weissella ceti* bakterisine karşı izole edilen bakteriyofajların bu bakterinin sayısının azaltılmasında etkili olduğı bildirilmiştir (Hoai vd., 2018).

Dünya genelinde balık fotobakteriyözünden sorumlu ajan olarak bilinen *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisi, canlılarda yüksek ölüm oranlarına neden olması, konak aralığıının geniş olması ve çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli olması gibi nedenlerden akva kültür endüstrisi için en tehlikeli bakteri olarak nitelendirilmektedir (Andreoni ve Magnani, 2014). Literatürde *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin neden olduğı enfeksiyonların kontrolü amacıyla bu bakteriye karşı bakteriyofaj kullanımı ile ilgili bir çalışma tespit edilememiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında 2016, 2017, 2018 ve 2019 yıllarında Aydın, Bafa Gölü yöresindeki balık çiftliklerinden alınan tank suları, üretim suları ve deşarj suları kullanılmıştır. Toplanan su örnekleri önce kaba filtre kağıdı yardımı ile süzülmüştür. Örnekler, 0,20 µm gözenek açıklığına sahip selülozik membran filtreler (Isolab, Almanya) kullanılarak, filtrasyon düzeneği (Sartorius, Almanya) yardımı ile vakum altında süzdürülüp kullanılmıştır.

Aynı yöredeki balık çiftliklerinden, yukarıda belirtilmiş olan yıllarda fotobakteriyöz hastalığı geçirmiş balıkların dalak ve kalp örnekleri toplanmıştır. Organ örnekleri, steril 1X Fosfat Tamponlu Salin (FTS) ile karıştırılmıştır ve ultra turrax (IKA, Çin Halk Cumhuriyeti) yardımı ile karışım homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım santrifüj yardımı ile katı partiküllerden arındırılmıştır. Süpernatantlar, 0,20 µm gözenek açıklığına sahip selülozik membran filtreler kullanılarak, filtrasyon düzeneği yardımı ile vakum altında süzdürülüp kullanılmıştır.

Aydın Büyükşehir Belediyesi'nden gerekli yasal izinler alınarak, Su ve Kanalizasyon İdaresi Eysel Atık Bertaraf Tesisi'nden alınan örnekler, santrifüj yardımı ile temizlenmiş ve 0,20 µm gözenek açıklığına sahip selülozik membran filtreler kullanılarak, filtrasyon düzeneği yardımı ile vakum varlığında süzdürülüp kullanılmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Bakteri Kültürü ve Kültür Koşulları

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* bakterisi, Kılıç Holding'in Bafa Gölü kuluçkahanesindeki salgınlar sırasında hasta balıklardan izole edilmiş olup, %2 oranında sodyum klorür (NaCl, Tekkim, Türkiye) eklenmiş Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, Almanya) üzerinde 25°C'de kültüre edilmiştir. Elde edilen bakteri kültürleri vakit kaybetmeksizin -80°C'de %2 NaCl ve %15 gliserol (Sigma Aldrich, ABD) içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Almanya)'da soğuga dayanıklı tüpler içerisinde birden fazla olmak üzere stoklanmıştır.



Soğuğa dayanıklı tüpler içerisine, %10 oranında hazırlanan yağsız süt tozu (Oxoid, Birleşik Krallık) çözeltisi eklenmiştir ve çözelti 121°C’de 20 dakika sterilize edilmiştir. Sterilize edilmiş çözelti içerisine aynı kültürden alınan tek koloniler eklenmiştir ve tüpler -80°C’de birden fazla olmak üzere depolanmıştır.

### 3.2.2. Kullanılan Besiyerlerinin Bakteri Büyümesine Etkisi

Çalışmada *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisi %2 NaCl içeren TSB ve TSA (%1,5 agar-agar, Becton Dickenson, ABD) besiyerleri kullanılarak 25°C’de inkübe edilmiştir. Bakterinin sıvı besi yerinde 1 gün sonra ulaştığı konsantrasyonu artırmak amacı ile %2 NaCl içeren Luria Bertani (LB) broth veya LB agar (Merck, Almanya) ve Brain Heart Infusion (BHI) broth veya BHI agar (Merck, Almanya) besiyerleri de kullanılmıştır. Ayrıca, *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin asıl konağı olan balık ve balık iç organlarını en iyi şekilde taklit etmek amacı ile laboratuvar koşullarında farklı besi yeri de hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besi yerinde (FPB) somon balığı (*Salmo salar*) tozu (Turkimpeks, Türkiye), D(+)-Glikoz monohidrat (Tekkim, Türkiye), NaCl ve di-potasyum fosfat ( $K_2HPO_4$ , Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Hazırlanan ve kullanılan besiyerlerinin içerikleri Çizelge 3.1.’de verilmiştir. Laboratuvar koşullarında hazırlanan besi yeri ile, hazır olarak temin edilen besi yerlerinin bakteri büyümesine etkisi seri dilüsyon tekniği kullanılarak kıyaslanmıştır.

Çizelge 3.1. Hazırlanan ve kullanılan besiyerleri içerikleri

Tipik TSB (Merck, Almanya) Kompozisyonu	Laboratuvar Koşullarında Hazırlanan besi yeri Kompozisyonu
Pepton (kazein): 17,0 g	Somon balığı tozu (Turkimpeks, Türkiye): 20 g
Pepton (soya): 3,0 g	D(+)-Glikoz monohidrat (Tekkim, Türkiye): 2,5 g
D(+)-Glikoz monohidrat: 2,5 g	Sodyum Klorür (Tekkim, Türkiye): 5,0 g
Sodyum Klorür: 5,0 g	Di-potasyum hidrojen fosfat (Tekkim, Türkiye): 2,5 g
Di-potasyum hidrojen fosfat: 2,5 g	

Faj üretiminde konak olarak kullanılan *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin sayısını arttırmak amacı ile %2 NaCl ile zenginleştirilmiş TSB besi yerine fazladan ilave olarak 20 g pepton (Oxoid, Birleşik Krallık) ve 2,5 g  $K_2HPO_4$  (Sigma Aldrich, Almanya) eklenmiştir (TSBPK). Elde edilen sonuç, seri dilüsyon tekniği kullanılarak pepton ve  $K_2HPO_4$  eklenmemiş besi yeri ile kıyaslanmıştır.

### 3.2.3. Bakteri Tanımlamasının Yapılması

TSA üzerinde büyütülen genç koloniden bir miktar alınarak, lam üzerine deiyonize su ile yayılıp gram boyama yapılmıştır. Hazırlanan preparatın mikroskop görüntüsü kaydedilmiştir.

Kılıç Holding'den temin edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisine çoklu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi uygulanarak, çalışılacak olan bakterinin DNA tanımlaması yapılmıştır (Amagliani vd., 2009; Osorio vd., 2000). Bakteriden toplam genomik DNA ekstraksiyonu için, bir gece inkübe edilmiş kültürden 1 ml alınıp steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp önce 2,800 x g, 4dk, 4°C'de santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan besi yeri uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 1 ml steril deiyonize su eklenip ve pellet vortex yardımı ile homojen hale getirilmiştir. Daha sonra tüpe, ısı bloğu (Eppendorf, Almanya) kullanılarak 95°C'de 5 dakika ısıtma işlemi uygulanmıştır. Isıtma işlemi sonrasında tüp bakteriyel kalıntıların uzaklaştırılması için santrifüj edilmiştir (5,000 x g, 15 dk, 4°C). Elde edilen süpernatant başka bir steril tüpe aktarılmıştır. PZR reaksiyonu için; 1 tüp negatif kontrol, 2 tüp ise bakteri DNA'sı içeren pozitif kontrol olmak üzere toplam 3 tüp hazırlanmıştır.

Her bir tüp içerisine sırasıyla 12,5 µl Taq 2x Master Mix (Ampliqon, Danimarka), 1'er µl 76a (5'-CCG ACT CAA CTA CAG ATC ACC CAG TC-3') ve 76b (5'-GTG CGG CCT AAA TTT CGA CGA-3') primerleri (Amagliani vd., 2009), 1'er µl Ure3' (5'-CTT GAA TAT CCA TCT CAT CTG C-3') ve Ure5' (5'-TCC GGA ATA GGT AAA GCG GG-3') primerleri (Osorio vd., 2000) ve 4,5 µl RNAz ve DNAz içermeyen saf su (Primer Design, Birleşik Krallık) eklenmiştir. Bunun yanı sıra her bir tüp içerisine, pozitif kontroller için 4'er µl elde edilen bakteri DNA'sı, negatif kontrol için ise 4 µl RNAz ve DNAz içermeyen saf su eklenmiştir. PZR, 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyon, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 65°C'de 30 saniye yapışma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C 10 dakika son uzama koşulları olmak üzere toplam 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. PZR için kullanılan sıcaklık ve süre protokolleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

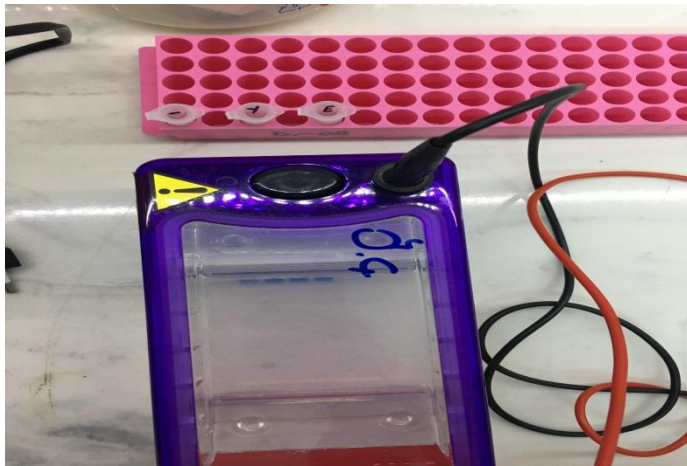
Çizelge 3.2. PZR için kullanılan sıcaklık ve süre protokolü

Sıcaklık (°C)	Süre	Basamak
95	10 dakika	İlk Denatürasyon
95	30 saniye	Denatürasyon
65	30 saniye	Yapışma
72	1 dakika	Uzama
72	10 dakika	Son Uzama

} 30 döngü

PZR sonunda elde edilen üründen 10µl alınarak 2 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılmıştır. 1X TAE tampon çözeltisi ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde (Invitrogen, ABD) 100 Volt (V) kuvvetinde 45 dakika yürütülmüştür. PZR ürün bantlarının gözlenmesi Etidyum Bromür (EtBr) ile G:Box F3 (Syngene, Birleşik Krallık) UV ışık altında gerçekleştirilmiştir.

Jel düz bir zemin üzerinde kalıba dökülüp, soğumaya bırakılmıştır. Jelin katılaşmasının ardından, ilk kuyuya DNA markeri (SiZer™ 100bp Kat. Nu. 24073, ABD), diğer kuyulara ise 6X yükleme boyası ile karıştırılmış 10 µl PZR ürünü yüklemesi yapılmıştır. Jel, 100 V kuvvetindeki elektriksel alana 45 dakika boyunca tabi tutulmuştur.



Şekil 3.1. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

PZR işlemi, yukarıdaki tabloda belirtilen sıcaklık ve süre protokolüne göre 30 döngü olarak yapılmıştır. Jel görüntüsü G:Box F3 (Syngene, Birleşik Krallık) UV ışık altında alınmıştır.

### **3.2.4. *P. damsela* subsp. *piscicida* Bakterisinin Büyüme Grafiğinin Oluşturulması**

*P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin büyüme grafiği Multiscan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak bulanıklık ölçüm yöntemi ile belirlenmiştir (Dalgaard vd., 1994; Hermann vd., 2002).

Steril olarak temin edilen 96 kuyulu mikropalkanın kuyularının her birine 200 µl %2 NaCl içeren TSB eklenmiştir. İçerisinde besi yeri bulunan her bir kuyuya 10 µl hacminde 18 saat %2 NaCl içeren TSB'de inkübe edilmiş taze bakteri kültürü eklenmiştir. Kör okuma için 3 kuyuya bakteri eklemesi yapılmamıştır. Bakteri kültürünün kuyu dibine çökmemesi için cihazın çalkalama hızı orta hıza (60 rpm) ayarlanmıştır ve her 15 dakikada bir 600 nm'de optik yoğunluk ölçümü cihaz yardımı ile yapılmıştır. Referans okuma için ayrılan kuyuların optik yoğunluk değerlerinin ortalaması, bakteri ekimi yapılmış kuyuların optik yoğunluk değerlerinden çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçların zamana göre değişim grafiği çizilmiştir.

### **3.2.5. *P. damsela* subsp. *piscicida* Bakterisinin Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi**

*P. damsela* subsp. *piscicida* kültürlerinin antibiyotik direnci %2 NaCl ile zenginleştirilmiş Mueller Hinton Agar (MHA, Oxoid, Birleşik Krallık) üzerinde disk difüzyon testi ile belirlenmiştir. Antibiyotik direncinin belirlenmesinde gentamisin (10 µg), vankomisin (30 µg), amoksisilin (25 µg), enrofloksasin (5 µg), florfenikol (30 µg), oksitetrasiklin (30 µg), trimetopirim/sülfametoksazol (25 µg) ve trimetopirim/sülfadiazin (30 µg) antibiyotikleri kullanılmıştır (Türe ve Alp, 2016). Kullanılan antibiyotikler Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılan çeşitli antimikrobiyal ajanlar

Sembol	Antimikrobiyal Ajan	Marka, Barkot Numarası
TS	Trimetoprim/sülfadiazin	Bioanalyse, Türkiye, 8698874202563
ENR	Enrofloksasin	Bioanalyse, Türkiye, 8698874200583
FFC	Florfenikol	Bioanalyse, Türkiye, 8698874201795
AML	Amoksisilin	Liofilchem, İtalya, 9133
OT	Oksitetrasiklin	Liofilchem, İtalya, 9065
SXT	Trimetoprim/sülfametoksazol	Bioanalyse, Türkiye, 8698874201504
129-150	O/129 (150 µg) (Vibriyostatik Bileşik)	
VA	Vankomisin	Oxoid, Birleşik Krallık, CT0058B
CN	Gentamisin	Oxoid, Birleşik Krallık, CT0024B

Hazırlanan MHA agar üzerine %2 NaCl ile zenginleştirilmiş TSB içerisinde 1 gün kültüre edilen bakteriden 100 µl yayma plaka yöntemi ile inokule edilmiştir. Her bir petri üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiş ve petri bir gece boyunca 25°C’de inkübe edilmiştir. Oluşan büyüme inhibisyon zonlarının çapları milimetre olarak ölçülüp kaydedilmiştir.

### 3.2.6. Enfekte Balıklardan *P. damsela* subsp. *piscicida*’ya Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonunun Yapılması

Litik bakteriyofaj izolasyonu için kültür balıkçılığı kuluçkahanelerinin yoğun olarak bulunduğu Aydın, Bafa Gölü civarından ve *P. damsela* subsp. *piscicida* enfeksiyonu ile mücadele eden kuluçkahanelerden toplanan yavru balıkların dalak ve kalp örnekleri kullanılmıştır. Depolanan örnekler (-20°C), 1X kuvvetinde hazırlanmış steril 1X Fosfat Tamponlu Salin (FTS) çözeltisi ile karıştırılıp, ultra turrax (IKA, Çin Halk Cumhuriyeti) yardımı ile 3000 rpm’de homojenize edilmiştir.

Elde edilen karışım, büyük katı partiküllerin uzaklaştırılması için 2800 g x 15dk x 4°C’de santrifüj edilmiştir (Centurion Scientific K241, Birleşik Krallık). Süpernatant, 0,22 µm gözenekli membran filtrelerden geçirilerek organ parçaları

ve bakteriler gibi safsızlıklardan tekrar arındırılmıştır. Oluşan bakterisiz süpernatantlara, %10 oranında %2 NaCl ile zenginleştirilmiş TSB ile %1 oranında 18 saat inkübe edilmiş bakteri kültürü eklenmiş ve 48 saat boyunca 25°C'de faj zenginleştirilmesi yapılmıştır. Zenginleştirilmiş örnekler santrifüjlenerek (Eppendorf 5415R, Almanya) (10.000×g, 15 dk, 4°C) bakteri pelleti ve süpernatant ayrılmıştır. Pellet ve süpernatanta %1 oranında kloroform (Isolab, Almanya) eklenerek santrifüjle uzaklaştırılmayan bakteriler uzaklaştırılmış, faj varlığı agar spot yöntemi (Vieira vd., 2012) ve %2 NaCl ile zenginleştirilmiş yumuşak tabaka agar (%0,5 agar) yöntemi kullanılarak (Adams, 1959) test edilmiştir.

Yine Aydın Bafa Gölü bölgesinde bulunan ve fotobakteriyöz ile mücadele eden kuluçkahanelerden yaz ve kış döneminde kullanılan havuz ve deşarj suları toplanmış ve litik faj varlığı açısından test edilmiştir. Alınan havuz ve deşarj suları, membran filtrasyon düzeneği kullanılarak vakum varlığında 0,20 µm gözenek açıklığına sahip selülozik filtrelerden geçirilmiştir. Bakterilerden tamamen arındırılmış olan su örneklerine %10 oranında %2 NaCl ile zenginleştirilmiş TSB ve %0,1 oranında taze bakteri kültürü eklenmiştir ve 48 saat boyunca 25°C'de faj zenginleştirilmesi yapılmıştır.

Havuz ve deşarj sularının bir kısmı ise membran filtrasyon düzeneği kullanılarak vakum varlığında 0,20 µm gözenek açıklığına sahip selülozik filtrelerden geçirildikten sonra, filtrelenen su ile aynı hacimde ve 2X kuvvetinde hazırlanmış %2 NaCl ile zenginleştirilmiş TSB, 20 g Pepton (Oxoid, Birleşik Krallık) ve 2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> içeren zengin besi yerine (TSBPK) aktarılmıştır. Zengin besi yeri ve su karışımına %0,1 oranında bakteri aşılması yapılmış ve 48 saat boyunca 25°C'de faj zenginleştirilmesi yapılmıştır. Zenginleştirilen örnekler faj varlığı bakımından yumuşak tabaka agar yöntemi ile test edilmiştir.

Her iki zenginleştirme yöntemi için, santrifüjle ayıramayan bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla örnekler %1 oranında kloroform eklemesi yapılmıştır (Shende vd., 2017). Ayrıca, kloroformun olası faj inhibisyonunu test etmek için örneklerin kloroform eklenmemiş halleri de faj varlığı bakımından test edilmiştir. Kloroform eklenmemiş örneklerden bakterilerin uzaklaştırılması işlemi ise 0,22 µm gözenek açıklığına sahip şırınga filtreler kullanılarak yapılmıştır.

### 3.2.7. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

#### **1 L 50X TAE (TAE= 40 mM Tris asetat, 2 mM Na<sub>2</sub>.EDTA. 2 H<sub>2</sub>O) Tamponu Hazırlama (PZR İçin):**

**Bileşenler:** 242 g Tris base (Santa Cruz Biotechnology, ABD), 57,1 ml glasiyel asetik asit (Merck, Almanya), 37,2 g Na<sub>2</sub>.EDTA. 2 H<sub>2</sub>O (Riedel-de Haën, Almanya) tartılmıştır. Tartılan kimyasallar 800 ml deiyonize suda çözüldükten sonra çözelti pH'sı 1M sodyum hidroksit (NaOH, Tekkim, Türkiye) ve 0,1 M hidroklorik asit (HCl, Tekkim, Türkiye) kullanılarak 8,5'e ayarlanmıştır. Elde edilen çözelti, deiyonize H<sub>2</sub>O eklenerek 1 L'ye tamamlanmıştır.

**1 L 1X TAE Tamponu Hazırlama:** Hazırlanan 50X stok solüsyonundan 20 ml alınarak üzerine 980 ml deiyonize H<sub>2</sub>O eklenmiştir.

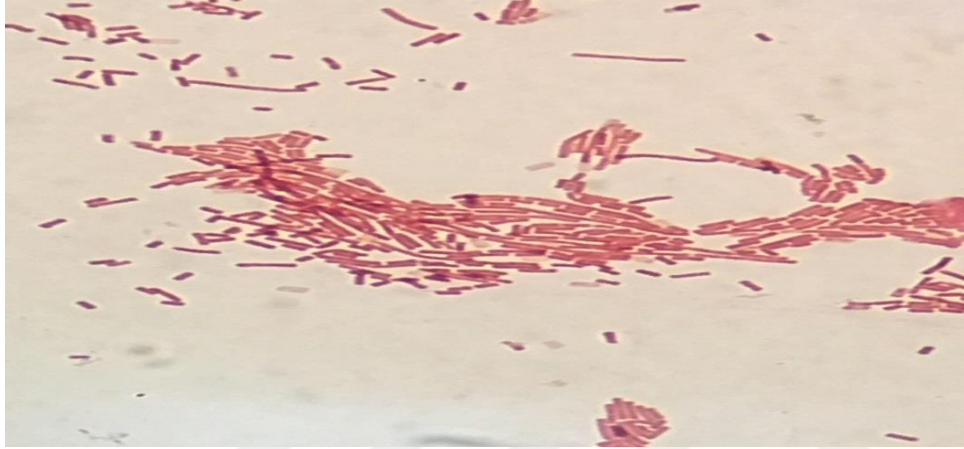
**1X Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi Hazırlama (Organ Homojenizasyonu İçin):** 800 ml deiyonize suya 8 g sodyum klorür (NaCl), 0,2 g potasyum klorür (KCl), 1,44 g di-sodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 0,24 g di-potasyum fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) eklenmiştir. Çözelti pH'sı 1 M sodyum hidroksit (NaOH) ve 0,1 M hidroklorik asit (HCl) kullanılarak 7,5'e ayarlanmıştır. Çözelti hacmi, pH'sı ayarlandıktan sonra deiyonize H<sub>2</sub>O eklenerek 1 L'ye tamamlanmıştır. Çözelti, 121°C'de 20 dakika sterilize edilerek kullanılmıştır.

### 3.2.8. İstatistiksel Analiz

Tüm deneyler 2 paralel (deneysel tekrar) halinde yapılmış olup, 2 kere (biyolojik tekrar) tekrarlanmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Bakteri Kültürü ve Kültür Koşulları



Şekil 4.1. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin gram boyama işleminden sonra çekilmiş mikroskop görüntüsü

Yapılan gram boyama işleminin ardından elde edilen mikroskop görüntüsü ile tez çalışmasında kullanılan bakterinin gram negatif bir bakteri olduğu şeklinin ise kısa ve küçük çubuklar halinde (kokobasil) görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 4.1). Snieszko vd. 'nin (1964) bu bakterinin ilk kez keşfinden sonra yaptığı çalışmada ise bakterinin hareketsiz, gram negatif ve çubuk şeklinde olduğu belirtilmiştir. Bildirilen sonuçlar, mevcut tez çalışması ile örtüşmektedir.

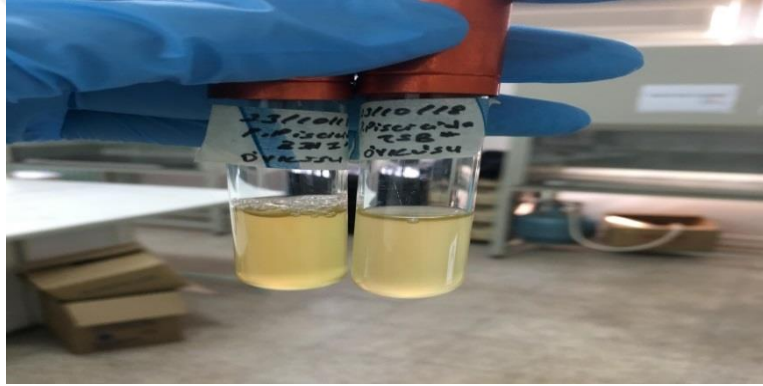
### 4.2. Kullanılan Besiyerlerinin Bakteri Büyümesine Etkisi

*P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin büyümesine besi yerinin etkisini incelemek amacı ile laboratuvar koşullarında balık tozu kullanılarak yapılan besi yerinin, bakteri büyümesine herhangi bir etki sağlamadığı seri dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ek olarak, gerektiğinde kullanılması planlanan ve her ikisi de %2 NaCl ile zenginleştirilen LB ve BHI besiyerlerinin, TSB besi yerine kıyasla bakteri sayısının artırılmasında büyük rol oynamadığı yine seri dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.



Çizelge 4.1. Besi yerinin bakteri sayısına etkisi

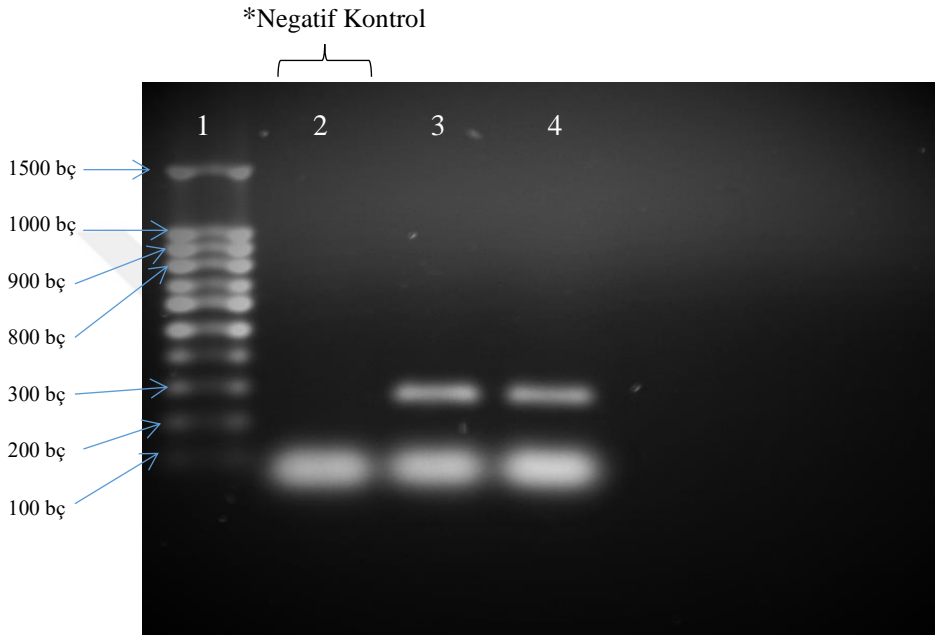
Besi yeri Türü	Bakteri Sayısı (KOB/ml)
TSB (%2 NaCl eklenmiş)	$5,3 \times 10^7$
BHI (%2 NaCl eklenmiş)	$5,2 \times 10^7$
FPB	$4,9 \times 10^6$
TSBPK	$2,5 \times 10^8$

Şekil 4.2. BHI (solda) ve TSB (sağda) besi yerlerinde bir gece inkübe edilmiş *P. damsela* subsp. *piscicola* bakterisi

Besi yerlerinin bakteri büyümesine olan etkisi değerlendirildiğinde, besi yerleri arasında bakteri büyümesi açısından fark bulunamadığından (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.2.) tez çalışması süresince deneylerde %2 NaCl eklenmiş TSB kullanılmıştır.

### 4.3. Bakteri Tanımlamasının Yapılması

Tez kapsamında çalışılmış olan bakteri kültürünün DNA'sının doğrulanması amacı ile yapılan PZR reaksiyonunda Ure3' ve Ure5' primerleri aynı aileden olan ve su orijinli bir patojen olarak bilinen *P. damsela* subsp. *damsela* bakterisini tanımlayabilmek amacı ile kullanılmıştır. Kullanılan diğer 76a ve 76b primerleri ise *P. damsela* subsp. *piscicola* bakterisinin tanımlanabilmesi amacıyla özel olarak dizayn edilmiş olan ileri ve geri primerlerdir. PZR işlemi sonucunda, tez kapsamında çalışılmış olan bakterinin *P. damsela* subsp. *damsela* bakterisi olmadığı kanıtlanmıştır. Jel görüntüsü Şekil 4.3.'de verilmiştir.



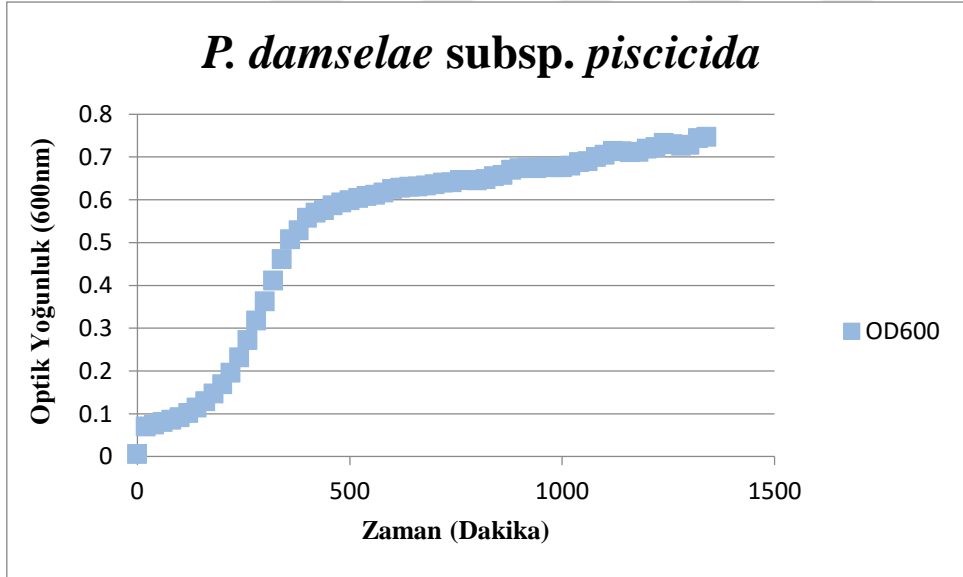
Şekil 4.3. *P. damsela* subsp. *piscicida* suşundan elde edilen çoklu PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

\*1. kolon DNA markerını ifade etmektedir. Negatif kontrole (2. kolon) DNA eklenmemiştir. 3. ve 4. kolonlarda sırasıyla *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin 2015 ve 2018 yılındaki izolatlarından elde edilen DNAlar kullanılmıştır.

Osorio vd.'nin (2000) yaptığı çalışmada, *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinden elde edilen PZR ürünü boyutlarının 297 bç olduğu ve bu bakterinin jel üzerinde tek bant verdiği belirtilmiştir. Amagliani vd.'nin (2009) yaptığı çalışmada ise, *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin 297 bç amplifikasyon ürünü verdiği belirlenmiştir. Ure3' ve Ure5' primerleri ise *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin *P. damsela* subsp. *damsela* bakterisinden ayırt edilebilmesi için özel olarak dizayn edilmiştir (Amagliani vd., 2009). Yapılan deney sonucunda jel görüntüsünden elde edilen verilere göre 297 bç civarında tek bir bant görülmüştür ve bakterinin *P. damsela* subsp. *piscicida* olduğu belirlenmiştir.

#### 4.4. *P. damsela* subsp. *piscicida* Bakterisinin Büyüme Grafiğinin Oluşturulması

Bakterinin büyüme grafiği, 96 kuyulu plaka kullanılarak %2 NaCl eklenmiş TSB içinde 600nm’de optik yoğunluk değerlerinin 20 dakikada bir ölçümü ile oluşturulmuştur. Kör okuma için 3 adet kuyuya bakteri eklenmemiş ve %2 NaCl ile zenginleştirilmiş TSB eklenmiştir. Her 20 dakikada bir alınan ölçümlerden kör okuma değerlerinin ortalaması çıkarılmış ve değerlerin zamana göre değişim grafiği (Şekil 4.4.) belirlenmiştir. Grafiğin eldesinde kullanılan veriler Tablo 4.1.’de verilmiştir.



Şekil 4.4. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin optik yoğunluk değerlerinin zamana göre değişim grafiği

Çizelge 4.2. Zamana göre değişen optik yoğunluk değerleri

Zaman (Dk)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	C	Zaman (Dk)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	C	Zaman (Dk)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	C	Zaman (Dk)	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	C
0	0,183	0,173	0,168	0,01	380	0,628	0,633	0,65	0,53	760	0,743	0,762	0,756	0,65	1040	0,833	0,811	0,819	0,69
20	0,188	0,177	0,171	0,07	400	0,656	0,675	0,665	0,56	780	0,746	0,767	0,748	0,65	1060	0,838	0,813	0,804	0,69
40	0,191	0,18	0,176	0,08	420	0,673	0,689	0,672	0,57	800	0,754	0,767	0,738	0,65	1080	0,836	0,817	0,805	0,70
60	0,198	0,186	0,182	0,08	440	0,678	0,691	0,683	0,58	820	0,758	0,772	0,737	0,65	1100	0,846	0,819	0,815	0,71
80	0,203	0,191	0,186	0,09	460	0,692	0,702	0,691	0,59	840	0,762	0,774	0,752	0,66	1120	0,843	0,815	0,833	0,71
100	0,209	0,197	0,193	0,09	480	0,692	0,707	0,706	0,59	860	0,767	0,77	0,759	0,66	1140	0,845	0,822	0,856	0,71
120	0,219	0,205	0,204	0,10	500	0,694	0,714	0,711	0,60	880	0,774	0,772	0,788	0,67	1160	0,846	0,825	0,842	0,71
140	0,232	0,218	0,215	0,11	520	0,693	0,718	0,725	0,60	900	0,785	0,773	0,786	0,67	1180	0,853	0,833	0,816	0,71
160	0,245	0,236	0,228	0,13	540	0,692	0,725	0,733	0,61	920	0,787	0,774	0,786	0,68	1200	0,856	0,834	0,818	0,72
180	0,263	0,254	0,247	0,15	560	0,689	0,73	0,739	0,61	940	0,795	0,77	0,779	0,67	1220	0,858	0,855	0,842	0,72
200	0,286	0,272	0,271	0,17	580	0,693	0,735	0,746	0,62	960	0,797	0,778	0,779	0,68	1240	0,857	0,858	0,849	0,73
220	0,315	0,297	0,299	0,20	600	0,699	0,741	0,758	0,63	980	0,809	0,772	0,771	0,68	1260	0,86	0,872	0,858	0,73
240	0,352	0,33	0,336	0,23	620	0,705	0,746	0,757	0,63	1000	0,813	0,777	0,76	0,68	1280	0,867	0,861	0,865	0,73
260	0,381	0,373	0,385	0,27	640	0,712	0,748	0,753	0,63	1020	0,818	0,78	0,765	0,68	1300	0,869	0,863	0,868	0,73
280	0,42	0,416	0,441	0,32	660	0,72	0,75	0,746	0,63	1040	0,828	0,787	0,772	0,65	1320	0,879	0,866	0,857	0,74
300	0,46	0,463	0,489	0,36	680	0,726	0,752	0,744	0,63	1060	0,832	0,785	0,777	0,65	1340	0,885	0,867	0,86	0,75
320	0,497	0,512	0,548	0,41	700	0,733	0,75	0,749	0,64	1080	0,835	0,793	0,796	0,65					
340	0,541	0,557	0,609	0,46	720	0,737	0,754	0,751	0,64	1100	0,835	0,796	0,808	0,65	<b>Ref.</b>	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>2</sub></b>	<b>B<sub>3</sub></b>	<b>Ort.</b>
360	0,541	0,557	0,609	0,51	740	0,737	0,755	0,754	0,53	1120	0,841	0,804	0,821	0,66		0,109	0,108	0,105	0,107

\*C= A<sub>(Ortalama)</sub>- B<sub>(Ortalama)</sub>, Ort: Ortalama, Ref: Referans.

Bakterinin 600 nm’de her bir zaman dilimdeki optik yoğunluk değeri  $\frac{A1+A2+A3}{3} - \frac{B1+B2+B3}{3}$  şeklinde hesaplanmıştır. Noktaların zamana göre değişim grafiği belirlenmiştir.

Elde edilen grafikte, bakteri büyüme grafiği aşamalarından olan lag (hazırlık) fazı, logaritmik büyüme fazı ve durağan faz görülmektedir. Grafikte ölüm fazının bulunmamasının nedeni ise; bakteri hücrelerinin canlılığını yitirmesine rağmen ışık geçirgenliğini etkilemediği dolayısı ile optik yoğunluk değerlerinin de değişmeyeceği olarak açıklanmaktadır.

#### 4.5. *P. damsela* subsp. *piscicida* Bakterisinin Antibiyotik Dirençliliğinin Belirlenmesi

Faj izolasyonu için konak olarak kullanılan *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin antibiyogramı için kullanılan antimikrobiyal maddeler Çizelge 4.3.’de verilmiştir. Bakterinin test edilen 9 antimikrobiyal ajanın 5’ine (gentamisin (CN), trimetoprim/sülfametoksazol (SXT), vankomisin (VA), tetrasiklin (TS), O/129) karşı dirençli olduğu gözlenerek bakterinin balık kuluçkahanelerinde ne denli tehlikeler oluşturabileceği gösterilmiştir. Ek olarak bakterinin florfenikol (FFC), oksitetrasiklin (OT) ve amoksisilin (AML) antibiyotiklerine yüksek derecede hassasiyet gösterdiği; enrofloksasin (ENR) antibiyotiğine ise orta derecede hassasiyet gösterdiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin antimikrobiyal direnç profili

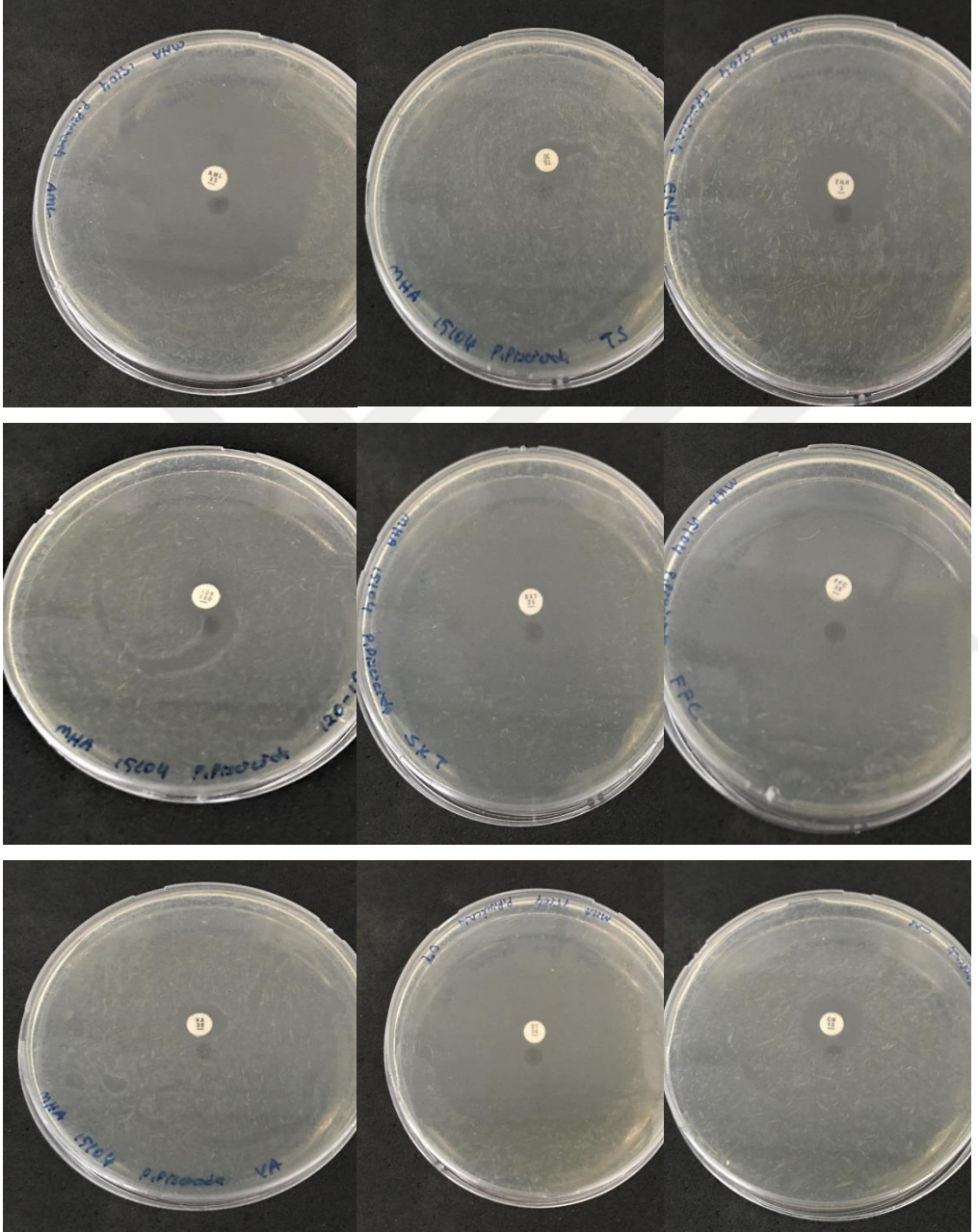
#### Antimikrobiyal Ajan

	FFC	ENR	VA	TS	AML	O/129	CN	OT	SXT
Zon Çapı (mm)	70	25	15	10	55	12	15	60	11
	(H)	(O)	(D)	(D)	(H)	(D)	(D)	(H)	(D)

\* H: hassas, O: Orta derecede hassas, D: Dirençli.

Antimikrobiyal maddelere karşı hassasiyet ölçüleri zon büyüklükleri ve çaplarına göre belirlenmiştir. Zon çapları küçük olanlar dirençli, orta büyüklükte olanlara orta derecede hassas, daha büyük olanlara ise hassas olarak belirlenmiştir (Thyssen ve Ollevier, 2001).

Türe ve Alp'in (2016) yaptığı çalışmada Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'ndeki çeşitli kültür balıklarından izole edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin amoksisilin, tetrasiklin, florfenikol, enrofloksasin, oksitetrasiklin ve trimetoprim/sülfametoksazol antibiyotiklerine hassasiyet gösterdiği belirtilmiştir. Bakterinin, amoksisilin antibiyotiğine ise orta derecede hassasiyet gösterdiği belirtilmiştir. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin literatürde yer alan çalışmada kullanılan izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdiği antibiyotik hassasiyetleri ile bu tez çalışması kapsamında kullanılan izolatın çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdiği hassasiyetler değişiklik göstermektedir. Bu farkın ise, izolatların Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Çeşitli antibiyotiklere maruz kalma sonucunda bakterinin antibiyotik direnci kazanma olasılığı arttığından, Türkiye'nin farklı bölgelerinde konumlanan akva kültür tesislerinin mikrobiyal hastalıklarla savaşmada farklı antibiyotikler kullanması ile birlikte, tesislerde kullanılan su kaynaklarında bu antibiyotiklerin neden olduğu bulaşmaların bakterinin antibiyotik direnci geliştirme olasılığını arttırdığı düşünülmektedir. Thyssen ve Ollevier (2001), yaptıkları çalışmada farklı bölgelerden izole edilen *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterilerinin farklı antibiyotiklere direnç ve hassasiyet gösterebildiğini kanıtlamıştır (Thyssen ve Ollevier, 2001). Romalde'nin (2002) yaptığı çalışmada ise, *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin vibriyostatik bir ajan olan O/129'a karşı hassasiyet gösterdiği ifade edilmiştir (Romalde, 2002). Tez çalışması kapsamında ise bu bakterinin O/129 (150 µg) ajanına karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.5.'de antibiyogram testlerinden örnek petripler görülmektedir.



Şekil 4.5. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin antibiyogram görüntüleri

#### 4.6. *P. damsela* subsp. *piscicida*'ya Karşı Litik Bakteriyofaj İzolasyonunun Yapılması

Tez çalışması kapsamında 2016, 2017, 2018 ve 2019 yıllarında salgın sırasında Bafa Gölü yöresindeki kuluçkahanelerden toplanan 22 adet su örneği kullanılmıştır. Kaba filtre ve membran filtre aşamalarından geçirilen zenginleştirilmiş örnekler faj zenginleştirilmesi yapılarak dökme plaka yöntemi ve agar spot testi ile faj varlığı bakımından test edilmiştir.

Kuluçkahanelerden toplanan ve faj taraması yapılan su örneklerinin toplam hacmi 22 litredir. Aynı yıllarda, Bafa Gölü yöresindeki salgınlar sırasında toplanan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balık yavrularının dalak ve kalp örnekleri steril FTS ile homojenize edildikten sonra filtre edilip faj zenginleştirilmesi yapılmıştır. Zenginleştirilen örnekler dökme plaka yöntemi ve agar spot testi ile faj varlığı bakımından test edilmiştir. Test edilen organ örneklerinin toplam ağırlığı 59,6 g'dır.

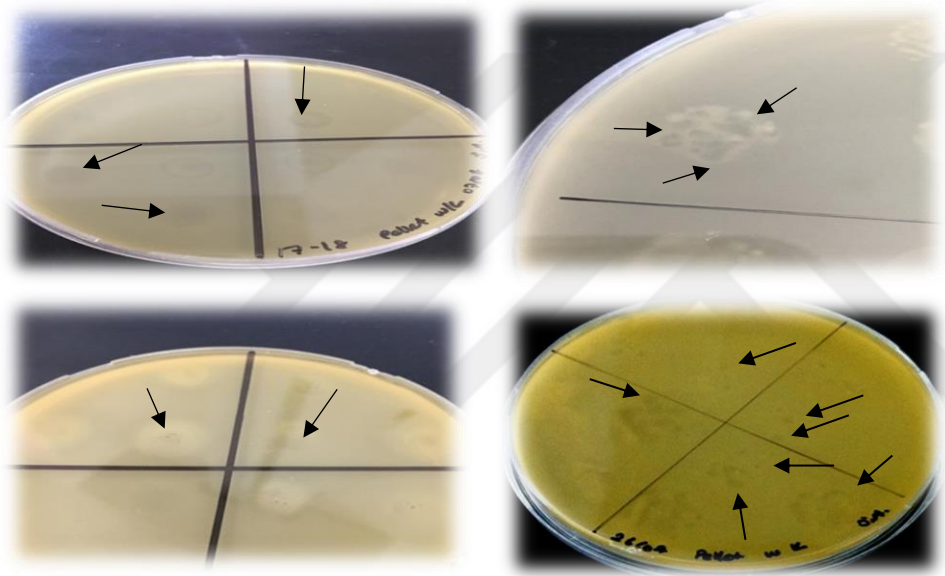
Aydın Büyükşehir Belediyesi Atık Su ve Kanalizasyon İdaresi Evsel Atık Arıtma Tesisi'nden toplam 4 litre olmak üzere toplanan kanalizasyon suyu örnekleri de aynı işlemlerden geçirilerek faj zenginleştirilmesi yapılmış ve zenginleştirilmiş su örnekleri dökme plaka yöntemi ve agar spot testi ile faj varlığı bakımından test edilmiştir.

Toplanan örneklerin tümüne filtrasyon işlemi uygulandıktan sonra, örneklerin her biri hem 2X kuvvetinde besi yeri ile 1:1 karıştırılarak (son besi yeri konsantrasyonu 1X) hem de son besi yeri konsantrasyonu 0,1X (%10) olacak şekilde besi yeri zenginleştirilmiştir. 2X kuvvetinde besi yeri ile zenginleştirmenin asıl amacı bakteri büyümesini arttırmak iken, %10'luk besi yeri kullanımında ki amaç bakteri büyümesini kontrol altında tutmaktır. Her iki zenginleştirme yöntemi kıyaslandığında; iki yöntemin kullanımından elde edilen ürünlerin deneyleri sonucunda faja benzer plaklar görülmüştür (Şekil 4.6.).

Salgınlar sırasında kuluçkahanelerden toplanan su ve organ örneklerinin değerlendirilmesi sonucunda, farklı büyüklüklerde ve faj plaklarına benzer plak oluşumları gözlemlenmiştir. Toplanan kanalizasyon suyu örneklerinden ise herhangi bir plak veya plak benzeri görüntü elde edilememiştir. Koskella ve Meaden (2013) yaptıkları çalışmada, bazı bakterilerin seçici olmayan fajlar



tarafından da enfekte edilebileceğini fakat bunun düşük bir olasılık olduğunu belirtmişlerdir. Kanalizasyon örneklerinin faj varlığı bakımından değerlendirilmesinin sonucunda plak oluşumu gözlenememesinin nedeni, fajların konağa oldukça spesifik olmalarından dolayı konağın bulunmadığı yerlerde fajların da bulunmayacağı olarak açıklanmaktadır.



Şekil 4.6. Çeşitli örneklerden yumuşak tabaka agar yöntemi ile elde edilen ve faj plaklarına benzeyen petri kabı görüntüleri

\*Oklar çeşitli plak oluşumlarını göstermektedir. Deneylerde *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisi konak bakteri olarak kullanılmıştır.

Wiggins ve Alexander (1985), yaptıkları çalışmada bakteriyofaj replikasyonu için gereken minimum bakteri sayısını bulmak amacıyla çeşitli fajları bazı bakterilerin değişen konsantrasyonları üzerinde denemişlerdir. Yapılan çalışmada faj aktivitesi için kullanılan bakteri konsantrasyonlarının minimum 4 log ile 6 log olması gerektiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda, faj replikasyonu için gereken minimum bakteri sayısı her bakteri için farklı çıkmıştır. Tez çalışması kapsamında efektif bir şekilde faj üretilmemesinin nedeni ise, bakteri sayısının faj aktivitesi için gereken minimum konsantrasyona ulaşamamış olması olarak açıklanmaktadır.

## 5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisinin karakteristik özellikleri incelenmiştir. Bakterinin çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdiği dirençlilik de ayrıca değerlendirilmiştir.

İstenmeyen bakteri enfeksiyonlarında faj kullanımının önemi bakterilerin çeşitli antibiyotiklere direnç kazanması ile birlikte gün geçtikçe artmaktadır. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisi, Türkiye’de kültür balıkçılığı endüstrisi için ciddi bir tehdit olmakla birlikte büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca bu bakteri çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olduğundan, akva kültür endüstrisi bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonla savaşmada çeşitli zorluklar yaşamaktadır. *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisine karşı litik bakteriyofajların kullanımı kültür balıkçılığı endüstrisinde bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlarla mücadelede noktasında ve daha doğal ve çevreci çözümler geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Tüm bu nedenlerden dolayı bu tez çalışması, Kılıç Holding A.Ş. Yavru Balık Üretim Tesisi ile ortak bir çalışma içerisinde yürütülmüştür. Literatür incelendiğinde, bu bakteriye karşı herhangi bir bakteriyofaj izolasyonu çalışması tespit edilmemiştir. Bu tez çalışması bu bakımdan özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, faj plaklarının doğrulanması, saflaştırılması, fajların karakterizasyonu, toksisite çalışmaları ve hayvan sağlığı alanında kullanımı için çeşitli hayvan deneylerinin yapılmasının ardından *P. damsela* subsp. *piscicida* bakterisine özgün bakteriyofajların kullanımı, akva kültür endüstrisi için olumlu bir gelişme olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Adams, M.H., 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, New York.
- Anonim, 2018. Kişisel görüşme. Kılıç Holding Deniz Ürünleri A.Ş., Bafa Gölü Su Ürünleri Yavru Balık Üretim Merkezi. E-posta: <http://www.kilicholding.com.tr>
- Al-saari, N., Mohd-Aris, A., Ina-Salwany, M.Y., Amal, M.N.A., Zamri-Saad, M., Kasai, H., Mino, S. 2018. Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. **Journal of Aquatic Animal Health**, 31(1): 3-22.
- Allison, Edward, H. 2013. Aquaculture, Fisheries, Poverty and Food Security. **World Fish Center Working Paper** [Electronic Journal], 2011: 1-65. Erişim [[http://pubs.iclarm.net/resource\\_centre/WF\\_2971.pdf](http://pubs.iclarm.net/resource_centre/WF_2971.pdf)]
- Altinok, I., Capkin, E., Karsi, A. 2015. Succinate dehydrogenase mutant of *Listonella anguillarum* protects rainbow trout against vibriosis. **Vaccine**, 33(42): 5572–5577.
- Amagliani, G., Omiccioli, E., Andreoni, F., Boiani, R., Bianconi, I., Zaccone, R. 2009. Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* identification in fish samples. **Journal Of Fish Diseases**, 32: 645–653.
- Andreoni, F., Magnani, M. 2014. Photobacteriosis: Prevention and diagnosis. **Journal of Immunology Research**, 2014. DOI: [10.1155/2014/793817](https://doi.org/10.1155/2014/793817)
- Aydın, B., Gelal, A. 2012. Akılcı ilaç kullanımı: yaygınlaştırılması ve tıp eğitiminin rolü. **Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 26(1): 57–63.
- Batt, A.L., Snow, D.D., Aga, D.S. 2006. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. **Chemosphere**, 64(11): 1963–1971.

- Boran, H., Terzi, E., Altinok, I., Capkin, E., Bascinar, N. 2013. Bacterial diseases of cultured Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages. **Aquaculture**, 396–399: 8–13.
- Boyacioglu, O., Sharma, M., Sulakvelidze, A., Goktepe, I. 2013. Biocontrol of *Escherichia coli* O157. **Bacteriophage** [Electronic Journal], 3(1): e24620. Erişim [<https://doi.org/10.4161/bact.24620>]
- Boyacioglu, O., Sulakvelidze, A., Sharma, M., Goktepe, I. 2016. Effect of a bacteriophage cocktail in combination with modified atmosphere packaging in controlling *Listeria monocytogenes* on fresh-cut spinach, **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, 55 (1), 74–79.
- Capkin, E., Terzi, E., Altinok, I. 2015. Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment. **Diseases of Aquatic Organisms**, 114(2): 127–137.
- Carraro, R., Dalla Rovere, G., Ferraresso, S., Carraro, L., Franch, R., Toffan, A., Bargelloni, L. 2018. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish tissues. **Journal of Fish Diseases**, 41(2): 247–254.
- Çağırđan, H., Yüreklitürk, O. 1993. Kùltürü yapılan çipura (*Sparus aurata*, L) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görùlen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, İzmir.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., McMeekin, T.A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. **International Journal of Food Microbiology**, 23(3–4): 391–404.
- Demircan, D., Candan, A. 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 30(3): 305–310.
- Essam, H.M., Abdellrazeq, G.S., Tayel, S.I., Torky, H.A., Fadel, A.H. 2016. Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. **Microbial Pathogenesis**, 99: 41–50.

- FAO, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture [Electronic Journal]. Erişim[<http://www.fao.org/3/CA0190EN/CA0190EN.pdf>] ErişimTarihi: 22.08.2018
- Glover, S. 1992. Book Reviews. *The Journal of Rural Health*, 8(3): 237–237.
- Grigorakis, K., Rigos, G. 2011. Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture. **Chemosphere**, 85(6): 899–919.
- Hatfull, G.F., Hendrix, R.W. 2011. Bacteriophages and their genomes. **Current Opinion in Virology**, 1(4): 298–303.
- Hawke, J.P. 2012. 1.2.14 Photobacteriosis, Department of Pathobiological Sciences School of Veterinary Medicine Louisiana State University Baton Rouge, pp. 1–15, Los Angeles.
- Hermann, R., Duetz, W.A., Witholt, B., O'Connor, K., Ruedi, L., Buchs, J. 2002. Methods for Intense Aeration, Growth, Storage, and Replication of Bacterial Strains in Microtiter Plates. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(6): 2641–2646.
- Higuera, G., Bastías, R., Tsertsvadze, G., Romero, J., Espejo, R. T. 2013. Recently discovered *Vibrio anguillarum* phages can protect against experimentally induced vibriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, 392–395, 128–133.
- Hoai, T.D., Mitomi, K., Nishiki, I., Yoshida, T. 2018. A lytic bacteriophage of the newly emerging rainbow trout pathogen *Weissella ceti*. **Virus Research**, 247: 34–39.
- Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G., Greening, G. 2016. Bacteriophages as Biocontrol Agents in Food. **Journal of Food Protection**, 68(2): 426–437.

- Jassim, S.A.A., Limoges, R.G. 2014. Natural solution to antibiotic resistance: Bacteriophages “The Living Drugs.” **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30(8): 2153–2170.
- Kazi, M., Annapure, U.S. 2016. Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. **Journal of Food Science and Technology**, 53(3): 1355–1362.
- Koskella, B., Meaden, S. 2013. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. **Viruses**, 5(3): 806–823.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A. M., Saksida, S. M. 2014. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. **Annual Review of Marine Science**, 7(1): 471–496.
- Li, J., Yie, J., Foo, R.W.T., Ling, J.M.L., Xu, H., Woo, N.Y.S. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of vibrio isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. **Marine Pollution Bulletin**, 39(1–12): 245–249.
- Lomelí-Ortega, C.O., Martínez-Díaz, S.F. 2014. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture**, 434: 208–211.
- Lu, T.K., Koeris, M.S. 2011. The next generation of bacteriophage therapy. **Current Opinion in Microbiology**, 14(5): 524–531.
- Magariños, B., Romalde, J.L., López, S., Moriñigo, M.A., Toranzo, A.E. 2003. Pathobiological characterisation of isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, 23(4): 183–190.
- Martínez-Díaz, S.F., Hipólito-Morales, A. 2013. Efficacy of phage therapy to prevent mortality during the vibriosis of brine shrimp. **Aquaculture**, 400–401: 120–124.

- Mateus, L., Costa, L., Silva, Y.J., Pereira, C., Cunha, A., Almeida, A. 2014. Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. **Aquaculture**, 424–425: 167–173.
- Maura, D., Debarbieux, L. 2011. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 90: 851-859.
- Wiggins, B.A., Alexander, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, 49(1): 19–23.
- Monk, A.B., Rees, C.D., Barrow, P., Hagens, S., Harper, D.R. 2010. Bacteriophage applications: Where are we now? **Letters in Applied Microbiology**, 51: 363-369.
- Osorio, C.R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Barja, J.L. 2000. Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. **Diseases of Aquatic Organisms**, 40(3): 177–183.
- Pereira, C., Salvador, S., Arrojado, C., Silva, Y., Santos, A. L., Cunha, Â., Almeida, A. 2011. Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: A preliminary study before applying phage therapy. **Journal of Environmental Monitoring**, 13(4): 1053–1058.
- Pereira, C., Silva, Y.J., Santos, A.L., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Almeida, A. 2011. Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: Survival, host specificity and effect on bacterial community structure. **Marine Drugs**, 9(11): 2236–2255.
- Richards, G.P., Chintapenta, L.K., Watson, M.A., Abbott, A.G., Ozbay, G., Uknalis, J., Parveen, S. 2019. Bacteriophages Against Pathogenic *Vibrios* in Delaware Bay Oysters (*Crassostrea virginica*) During a Period of High Levels of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. **Food and Environmental Virology**, 11(2): 101-112.

- Romalde, J.L. 2002. Photobacterium damsela subsp. piscicida: An integrated view of a bacterial fish pathogen. **International Microbiology**, 5(1): 3–9.
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R. 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. **Environment International**, 34(8): 1215–1226.
- Savaş, H., Türe, M. 2007. Yunus Araştırma Bülteni, 2. Erişim [<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TR2016010843>]
- Schmelcher, M., Donovan, D.M., Loessner, M.J. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. **Future Microbiology**, 7(10): 1147–1171.
- Schmelcher, M., Loessner, M.J. 2014. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. **Bacteriophage**, 4(2): e28137. DOI: 10.4161/bact.28137
- Shende, R.K., Hirpurkar, S.D., Sannat, C., Rawat, N., Pandey, V. 2017. Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. **Veterinary World**, 10(8): 973–978.
- Sillankorva, S.M., Oliveira, H., Azeredo, J. 2012. Bacteriophages and their role in food safety. **International Journal of Microbiology**, 2012. DOI:10.1155/2012/863945
- Silva, Y.J., Costa, L., Pereira, C., Mateus, C., Cunha, Â., Calado, R., Almeida, A. 2014. Phage therapy as an approach to prevent Vibrio anguillarum infections in fish larvae production. **PLoS ONE**, 9(12): 1–24.
- Sniezsko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G. 1964. Pasteurella Sp. From an Epizootic of White Perch (Roccus Americanus). **Journal of Bacteriology**, 88, 1814–1815.
- Stenholm, A.R., Dalsgaard, I., Middelboe, M. 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen Flavobacterium psychrophilum. **Applied and Environmental Microbiology**, 74(13): 4070–4078.



- Stickney, R.R. 1994. Principles of Aquaculture, New York.
- Tanrikul, T.T., Çağırğan, H., 2001. Doğadaki kefal balıklarında görülen pasteurellosis salgını. **Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi**, 18(3-4): 509–512.
- Thyssen, A., Ollevier, F. 2001. In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. **Aquaculture**, 200(3–4): 259–269.
- Türk İstatistik Kurumu (TÜİK), 2012. Su ürünleri istatistikleri.[Electronic Journal] Erişim[[http://www.tuik.gov.tr/Kitap.do?metod=KitapDetay&KT\\_ID=13&KITAP\\_ID=52](http://www.tuik.gov.tr/Kitap.do?metod=KitapDetay&KT_ID=13&KITAP_ID=52)] Erişim tarihi: 25.08.2018.
- Türk İstatistik Kurumu (TÜİK), 2017. Kültür Balıkları Üretim Miktarı [Electronic Journal]. Erişim [[http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1005](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005)] Erişim tarihi: 28.08.2018.
- Türe, M., Alp, H. 2016. Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, 60(2): 141–146.
- Vadstein, O. 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: Possibilities and challenges. **Aquaculture**, 155(1997): 401-417.
- Vieira, A., Silva, Y.J., Cunha, Â., Gomes, N.C.M., Ackermann, H.W., Almeida, A. 2012. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: in vitro and ex vivo experiments. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 31(11): 3241–3249.
- Wang, C., Yang, J., Zhu, X., Lu, Y., Xue, Y., Lu, Z. 2017. Effects of *Salmonella* bacteriophage, nisin and potassium sorbate and their combination on safety and shelf life of fresh chilled pork. **Food Control**, 73: 869–877.
- Yang, S., Carlson, K. 2003. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water Research**, 37(19): 4645–4656.

Yavuzcan, H., Pulatsü, S., Demir, N., Kırkağaç, M., Bekcan, S., Topçu, A., Başçınar, N. 2010. Türkiye’de sürdürülebilir su ürünleri yetiştiriciliği. **TMMOB Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi**, Bildiriler Kitabı-2, pp.767-789.

Zhang, J., Li, Z., Cao, Z., Wang, L., Li, X., Li, S., Xu, Y. 2015. Bacteriophages as antimicrobial agents against major pathogens in swine: A review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 6(1): 1-7.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Öyküsu ATILGAN

Doğum Yeri Ve Tarihi : Ankara-28.12.1993

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2017)

Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### A) Bildiriler

- Elmas, F., Mutlu, Ç., G., Atılgan, Ö., 2017. Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile kırmızı pancardan renk maddesi eldesi. **8. Gıda Mühendisliği Öğrenci Kongresi**. Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi, Karaman, Türkiye.
- Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Elmas, F., Mutlu, Ç., G., Atılgan, Ö., 2018. Ultrasound assisted extraction of natural colorant from red beet (*Beta vulgaris* L.). In Proceedings of the **First International GAP Agriculture and Livestock Congress**, pp. 547. Harran University, Şanlıurfa, Turkey.
- Örenay, Boyacıoğlu, S., Atılgan, Ö., 2018. Fig latices have cytotoxic effects on three different human cancer cell lines. **7<sup>th</sup> International Congress of Molecular Biology and Biotechnology**. Necmettin Erbakan University, Konya, Turkey.

- Boyacıoğlu, O., Atılđan, Ö., 2018. Anti-proliferative effects of *Lavandula stoechas* spp. *stoechas* essential oil on colon cancer. **7<sup>th</sup> International Congress of Molecular Biology and Biotechnology**. Necmettin Erbakan University, Konya, Turkey.

#### B) Projeler

- Elmas, F., Mutlu, Ç., G., Atılđan, Ö., 2017. Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Kırmızı Pancardan Renk Maddesi Eldesi. 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurtiçi Araştırma Projeleri Destek Programı, TÜBİTAK, Ankara.

## İLETİŞİM

E-Posta Adresi : oykusuatılđan@gmail.com

Tarih : 29/08/2019