

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**BAZI FİTOKİMYASALLARIN *Yersinia ruckeri* ÜZERİNE ETKİLERİ VE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ DURUMLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Mustafa ÇEVİK  
DANIŞMAN : Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN

VAN-2019



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**BAZI FİTOKİMYASALLARIN *Yersinia ruckeri* ÜZERİNE ETKİLERİ VE  
ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ DURUMLARININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Mustafa ÇEVİK

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından **FYL-2018-7454** nolu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN** danışmanlığında, **Mustafa ÇEVİK** tarafından sunulan “**Bazı Fitokimyasalların *Yersinia ruckeri* Üzerine Etkileri ve Antimikrobiyal Direnç Durumlarının Araştırılması**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince **23/08/2019** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile başarılı bulunmuş ve **yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

**Başkan:** Doç. Dr. Ertuğrul KANKAYA

İmza:

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN

İmza:

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Tayfun KARATAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../..... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....  
**Enstitü Müdürü**



## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza  
Mustafa ÇEVİK





## ÖZET

### **BAZI FİTOKİMYASALLARIN *Yersinia ruckeri* ÜZERİNE ETKİLERİ VE ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ DURUMLARININ ARAŞTIRILMASI**

ÇEVİK, Mustafa

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN

Ağustos 2019, 43 sayfa

Bu tez çalışmasında, Su ürünlerinde bakteriyel hastalık etkenlerinden *Yersinia ruckeri* üzerinde *Moringa oleifera* ve *Sorbus domestica* bitki ekstratlarının etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2 farklı *Y. ruckeri* izolatının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Ardından, izolatların Real-Time PCR analizleri ve gen dizilimleri belirlenerek identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Fitokimyasallar (*M. oleifera* ve *S. domestica*) ile antibiyotikler (oksitetrasiklin ve enrofloksasin) birlikte kullanılarak gerçekleştirilen antibiyogram testinde fitokimyasalların antibiyotiklere göre etki durumları karşılaştırılmıştır. Ayrıca, Fitokimyasalların *Y. ruckeri* gelişimi üzerine etkileri TSB besiyerinde oluşturulan 10 farklı grup ile bakteri gelişimi yoğunluklarına göre spektrofotometrik olarak 600 nm dalga boyunda her 2 saatte bir ölçüm yapılarak kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

Çalışma sonucunda, izolatların Gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketli ve tipik *Y. ruckeri* kolonileri oluşturdukları gözlenmiştir. GnA+B paneli (Microgen) ile gerçekleştirilen biyokimyasal testler sonrasında %99,85 oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir. İzolatların sekans analizi sonrasında 16S rRNA gen bölgesi ile örtüştüğü ve filogenetik analizde izolatların %99 benzer oldukları görülmüştür. Antibiyogram testi sonrasında oksitetrasiklin ve enrofloksasin antibiyotiklerinin *Y. ruckeri* üzerine dirençli oldukları ancak katı besiyerinde (MHA) fitokimyasalların etkilerinin daha az olduğu gözlenmiştir. Sıvı besiyerinde (TSB) gerçekleştirilen ölçümler neticesinde ise fitokimyasalların %40-50 oranında bakterinin gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir.

Antibiyotik direncinin öneminin her geçen gün artmakta olduğu günümüzde antibiyotik kullanımına alternatif ve ekonomik yönden daha uygun olan bitkilerin tedavide olumlu sonuçlar vereceği kanaatindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** Antibiyogram, Balık hastalıkları, *Moringa oleifera*, Real-Time PCR, Sekans, *Sorbus domestica*, *Yersinia ruckeri*.



## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANT AND EFFECTS OF SOME PHYTOCHEMICALS ON *Yersinia ruckeri*

ÇEVİK, Mustafa

M.Sc. Thesis, Fisheries Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Şükrü ÖNALAN

August 2019, 43 pages

In this thesis, it is aimed to investigate the effects of *Moringa oleifera* and *Sorbus domestica* plant extracts on bacterial disease agents *Yersinia ruckeri* in aquaculture. For this purpose, morphological and biochemical properties of 2 different *Y. ruckeri* isolates were determined. Then, real-time PCR analysis and gene sequencing of the isolates were identified and identified. Phytochemicals (*M. oleifera* and *S. domestica*) and antibiotics (oxytetracycline and enrofloxacin) were used together in the antibiogram test of antibiotics compared to the effect status of antibiotics. In addition, the effects of phytochemicals on *Y. ruckeri* growth were examined comparatively by spectrophotometrically measuring at 600 nm wavelength every 2 hours according to bacterial growth densities with 10 different groups formed on TSB medium.

As a result of the study, it was observed that the isolates formed Gram negative, catalase positive, oxidase negative, mobile and typical *Y. ruckeri* colonies. After the biochemical tests performed with Microgen ID panel, 99.85% similarity was determined. The isolates overlap with the 16S rRNA gene region after sequence analysis, and 99% of the isolates were similar in phylogenetic analysis. After antibiogram test, oxytetracycline and enrofloxacin antibiotics were resistant to *Y. ruckeri* but the effects of phytochemicals were less on solid medium (MHA). As a result of the measurements carried out in liquid medium (TSB), it was observed that phytochemicals inhibit the growth of bacteria by 40-50%.

As the importance of antibiotic resistance is increasing day by day, we believe that plants that are more alternative and more suitable for antibiotic use today will give positive results in treatment.

**Keywords:** Antibigram, Fish diseases, *Moringa oleifera*, Real-Time PCR, Sequencing, *Sorbus domestica*, *Yersinia ruckeri*.



## ÖN SÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başından itibaren, her zaman güleryüzü ile beni motive eden, her konuda maddi ve manevi desteğini hiç esirgeyemen, saygıdeğer danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN'a ilgi ve alakalarından dolayı çok teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince gerekli imkân ve kolaylığı tanıyan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Dekanlığı'na ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne tez çalışmama vermiş olduğu maddi destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan eşim Seda İLMEN ÇEVİK'e teşekkür ederim. Bu tez çalışmamı oğlum Mustafa Aras ÇEVİK'e adıyorum.

Ağustos 2019  
Mustafa ÇEVİK



# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
EKLER DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	5
2.1. Etiyoloji .....	10
2.2. Klinik Semptomlar ve Otopsi Bulguları.....	11
2.3. Bulaşma .....	12
2.4. Teşhis.....	13
2.5. Kontrol ve Tedavi.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Bakteri İzolasyonu.....	17
3.2. Bakterilerin İdentifikasyonları.....	17
3.2.1. Mikrobiyolojik identifikasyon .....	17
3.2.1.1. Gram boyama.....	17
3.2.1.2. Katalaz testi.....	17
3.2.1.3. Oksidaz testi.....	18
3.2.1.4. Hareket testi .....	18
3.2.2. Bakterilerin fenotipik (biyokimyasal) identifikasyonları .....	18
3.2.3. Bakterilerin moleküler identifikasyonları.....	19
3.2.3.1. Total DNA izolasyonu .....	19
3.2.3.2. Real-Time PCR analizi .....	19
3.3. Fitokimyasalların Temini.....	19
3.4. Sıvı Besiyerinde Fitokimyasalların Etkilerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	20
3.5. Antibiyogram Testi.....	20

	<b>Sayfa</b>
4. BULGULAR .....	21
4.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	21
4.2. Bakterilerin Biyokimyasal Test Sonuçları.....	21
4.3. Bakterilerin Moleküler İdentifikasyonları .....	24
4.4. Bakterilerin Sekans Analizi ve Filogenetik Benzerlikleri .....	24
4.5. Antibiyogram Test Sonuçları .....	26
4.6. Spektrofotometrik Gelişim Sonuçları .....	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
KAYNAKLAR.....	35
EKLER .....	41
ÖZ GEÇMİŞ.....	43



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Spektrofotometrik ölçümler amacıyla oluşturulan gruplar .....	20
Çizelge 4.1. <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının bazı mikrobiyolojik test sonuçları.....	21
Çizelge 4.2. <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları.....	22





## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Kanlı agar besiyerinde gelişen <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının görüntüsü.....	21
Şekil 4.2. <i>Y. ruckeri</i> izolatları ile gerçekleştirilen Microgen GnA+B testleri sonrası meydana gelen reaksiyon sonuçları.....	22
Şekil 4.3. <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının biyokimyasal identifikasyon sonuç raporu (Microgen ID sisteminden üretilmiştir). ....	23
Şekil 4.4. <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının Real-Time PCR sonucu. ....	24
Şekil 4.5. Çalışmada kullanılan <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının 16S rRNA gen sekansları (354: <i>Y. ruckeri</i> referans suş, 356: <i>Y. ruckeri</i> izolatı).....	25
Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının filogenetik benzerlik sonuçları (354: <i>Y. ruckeri</i> referans suş, 356: <i>Y. ruckeri</i> izolatı).....	26
Şekil 4.7. Çalışmada kullanılan antibiyotik ve fitoplanktonları antibiyogram test sonuçları. ....	26
Şekil 4.8. <i>Y. ruckeri</i> izolatlarının antibiyotik ve fitokimyasal ekli sıvı besiyeri ortamındaki spektrofotometrik gelişim oranları. ....	27



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklama

%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

### Kısaltmalar

### Açıklama

BA	Kanlı Agar
BHIA	Beyin Kalp İnfüzyon Agar
ENR	Enrofloksasin
ERM	Enterik Kızılağız Hastalığı
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
OX	Oksitetrasiklin
MHA	Müller-Hinton Agar

**Kısaltmalar****Açıklama**

<b>NA</b>	Nutrient Agar
<b>NTC</b>	Non-Template Kontrol
<b>PBS</b>	Fizyolojik Tuzlu Su
<b>PCR</b>	Polimerize Zincir Reaksiyonu
<b>RSA</b>	Rimler-Shotts Agar
<b>WS</b>	Walltman-Shotts
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth
<b>TUIK</b>	Türkiye İstatistik Kurumu

## EKLER DİZİNİ

**Sayfa**

<b>Ek 1.</b> Etik Kurul Onay Belgesi.....	41
---	----







## 1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya besin gereksiniminin önemli bir kısmını karşılayan temel bir endüstri olmakla birlikte Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak bildirilmiştir (Davenport ve ark., 2003). Su ürünleri, sağlıklı ve dengeli beslenmede gerekli ve yüksek protein değeri ile önemli bir gıda kaynağıdır. Dünya genelinde tüketilen hayvansal proteinin %17'sini, tüm protein kaynaklarının ise %6.5'ini oluşturmaktadır (Naylor ve ark., 2000). Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık %30'unu karşılamaktadır (Davenport ve ark., 2003). Yetiştirme şartlarında yetiştirme yoğunluğunun artması, su sıcaklığının değişmesi, düşük çözünmüş oksijen, besin değeri düşük olan yemler ve elle tutma gibi sebeplerden balıklar strese girmekte ve stres arttığında da hastalık problemleri ortaya çıkmaktadır (Demirtaş, 2006).

Balık hastalıkları su ürünleri yetiştiriciliğinde su kalitesi, uygun çevre şartları, yem temini, pazarlama ve iş gücü sorunlarının yanında, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tatlı su ve denizlerde yapılan kültür balıkçılığında ekonomik kayıplara neden olan en önemli sorun, çeşitli hastalıkların varlığıdır (Timur ve Timur, 2003).

Balık hastalıkları ve enfeksiyonları nedeniyle meydana gelen ekonomik kayıplar gibi problemler su ürünleri sektörünün gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır (Ergönül, 2012). Su ürünleri yetiştiriciliğinde ekonomik kayıpların %36'sı hastalıklardan kaynaklanmaktadır (Çağırğan, 2007). Balık yetiştiriciliğinde karşılaşılan ve ürün kalitesini düşüren, maliyeti arttıran ve hatta çoğu kez toplu balık ölümlerine neden olan balık hastalıklarının incelenmesi ve tedavisi her geçen gün biraz daha önem kazanmaktadır. Balık hastalıklarına hem doğal ortamlarda, hem de yetiştiricilik sırasında rastlanabilir. Birçok hastalık etmeni doğal ortamlarda sürekli olarak bulunur, ancak yoğunlukları nadiren tehlikeli boyutlara ulaşır ve dolayısıyla problem oluşturmazlar. Yetiştiricilikte amaç ticari bir başarı elde etmek olduğu için balıklar doğal ortamlardakinden daha yüksek yoğunlukta stoklanır ve bu da hastalıkların gelişmesine ve çok hızlı bir şekilde yayılmasına yol açan başlıca faktörlerden biridir (Scholz, 1999).

Doğada hastalanan balıklar diğer canlılar tarafından av-avcı ilişkisi sonucu hızla popülasyondan alındığı için doğada balık hastalıkları dikkat çekmemektedir. Ayrıca

balık yoğunluğu da daha düşük olduğu için parazit ve bakteriler doğal şartlarda pek önemli olmayabilirler. Hastalıkların ortaya çıkması ile ölen balıklar için yapılan yatırım, tedavi giderleri ve iyileşme döneminde görülen yavaş büyüme üretim maliyetlerini arttırmaktadır. Son yıllarda dünyada ve ülkemizde yoğun olarak görülen *Yersinia ruckeri*'nin oluşturduğu Enterik Kızılğız Hastalığı (ERM) ciddi ekonomik kayıplara yol açmakta ve alabalık işletmelerinin en önemli sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Tedavinin masraflı olması, iş gücü gerektirmesi, antibiyotik kullanımının patojenik ve nonpatojenik mikroorganizmalara karşı direnç oluşumuna neden olması ve bu durumda insan ve hayvan sağlığını tehdit etmesi gibi nedenlerden dolayı çalışmalar daha çok hastalıktan korunma üzerine yoğunlaşmıştır (Timur ve Timur, 1985).

Su ürünleri alanında hastalıkların meydana gelmesini önlemek balık hastalıkları ile mücadelede en etkili husustur. Fakat bunun ötesinde hastalık durumunda hastalığın doğru teşhis edilmesi ve ekonomik yönden en uygun tedavi yöntemlerinin uygulanması kayıpları azaltıcı en önemli etkidir. Doğru teşhis ve tedavi balık hastalıklarının yayılmasını önleyecek ve sektörün verimliliğine katkı sağlayacaktır (Ateşoğlu, 1996).

Balıklar çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı oldukça duyarlıdır (Hatha ve ark., 2005). Bakteriyel patojenlerin balıklarda meydana getirdiği iç ve dış klinik semptomlar balığın yaşı, türü ve hastalığın seyri ile (akut, kronik) değişmektedir. Yersiniozis (*Y. ruckeri*), Laktokokkozis (*Lactococcus garvieae*), Furunkulosis (*Aeromonas salmonicida*), Edwardsiellozis (*Edwardsiella spp.*), Vibriosis (*Vibrio spp.*), Kolumnaris (*Flavobacterium columnare*) ve Bakteriyel Böbrek Hastalığı (*Renibacterium salmoninarum*) gibi bakteriyel kökenli hastalıklar tüm dünyada su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelerde ciddi ölümlere sebep olan başlıca hastalıklardandır (Lasee, 1995; Austin ve Austin, 2007). Türkiye'de bakteriyel balık patojenleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Y. ruckeri*, *Vibrio spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* ve son yıllarda ise Streptokok enfeksiyonları yaygın patojenik hastalıklar olarak rapor edilmiştir (Kayis ve ark., 2009).

Kültür şartlarında balıklarda hastalık meydana getiren bakteriler, doğal ortamda bulunan balıklardan izole edilebilmektedir. Ancak doğal ortamda bulunan balıkların stres koşullarından uzak olmaları nedeniyle bu vakaların nadiren ölümle sonuçlandığı bilinmektedir (Toranzo ve ark., 2005). Bakteriyel hastalıkların tedavilerinde antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanılmaları ile balık dokularında rezidü

oluşabilmekte ve bunun sonucunda antibiyotiğe direçli patojenlerin gelişimi artmaktadır. Ayrıca antibiyotikler balıkta akümüle olmakta ve hem çevre sağlığı hem de tüketici için potansiyel bir risk oluşturmaktadır (Harikrishnan ve ark., 2010). Balık hastalıklarından korunma ve tedavisinde antibiyotik gibi kemoterapötikler kullanılmakta, ancak bu kemoterapötiklerin kaslarda birikmesi, karaciğer başta olmak üzere deri ve bağırsak gibi organları tahrip etmesi, uzun süreli kullanımlarda bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması, immün sistemini baskılaması, kısa bir süre için etkili olması, bütün enfeksiyonlara karşı kullanılamaması ve maliyetinin yüksek olması bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır (Kahraman, 2013). Bununla birlikte bazı balık patojenlerinin direnç genlerini insanlarda hastalıklara yol açan bakterilere aktarabildikleri için kullanımlarına sınırlamalar getirilmiştir (Uluköy ve ark., 2013). Su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin bilinçsiz bir şekilde kullanımı, dirençli bakterilerin gelişimine yol açabileceği gibi, çevre, insan ve diğer canlılar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (Hatha ve ark., 2005). Ülkemiz gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği konusunda Avrupa ülkeleri arasında birinci sırayı almaktadır. Bu kadar yoğun üretimle birlikte sıklıkla epizootilere rastlanmakta ve bu epizootilerden izole edilen bakteriyel etkenlerin başında *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri* patojenleri gelmektedir.

Antibiyotiklerin hastalıklara karşı korunmada kullanımının azaltılması ve hastalıklardan korunmak için aşı kullanılması gerekmektedir. *Y. ruckeri* etkeninin farklı serotipleri bulunmakta olup (Çağırğan, 2007), hastalık için aşı geliştirilmiş ve kullanımına da devam edilmektedir. Ancak hastalık meydana geldikten sonra aşı kullanılamaması ve antibiyotiklere etkenlerin direnç kazanması gibi sebeplerden dolayı alternatif yöntemlerin kullanımı da önem arz etmektedir (Erdoğan, 2013). Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde balık hastalıklardan korunmada alternatif arayışlar içerisine girilmiştir.



## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Dünyada yapılan araştırmalar sayesinde tıbbi bitki ekstraktları ve uçucu yağların bazı bakteri ve mantar türleri üzerine antimikrobiyal özellikleri olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir (Kıvanç ve Akgül, 1986). Son yıllarda tıbbi bitkilerin genel hayvansal ve su ürünleri üretiminde yem katkı maddesi, büyümede artış, yem değerlendirmede olumlu sonuçların eldesi, hastalıklardan koruyucu ürünler olarak kullanılması konusunda bazı araştırmalar yapılmıştır (Cihangir ve Diler, 2016). Tıbbi bitkiler ve onlardan elde edilen uçucu yağların antibakteriyel, antiviral, antifungal, antienflamatuvar, antiseptik, antioksidan, antiparazitik, antitoksijenik ve insektisidal özelliklere sahip olduğu, yapılan çalışmalarda antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmalar üzerinde de etkili oldukları bildirilmiştir (Yiğitarıslan ve ark., 2011). Tıbbi bitkiler geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olup bakteri, virüs, maya ve diğer mantarlara karşı etki göstermektedirler (Görmez ve Diler, 2017).

Balık hastalıklarının kontrolünde özellikle bitkilerden elde edilen doğal maddelerin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır. Araştırmacılar bitkilerin kimyasal bileşimlerini ortaya çıkarıp, antimikrobiyal mekanizmasını çözmeye çalışmaktadırlar (Erdoğan, 2013). Dünyada su ürünleri sektöründe de tıbbi bitkilerin alkaloidleri, flavonoidleri, pigmentleri, fenolik içerikleri, terpenoidleri, steroidleri ve uçucu yağlarının yeme ilave edilerek kullanılması söz konusudur. Bu ürünler sentetik kimyasallara alternatif olarak görülmektedir (Yiğitarıslan ve ark., 2011). Ayrıca söz konusu bitkiler aktif redoks molekülleri içerdikleri için antioksidan karakterde olup, balığın genel fizyolojik durumunu iyileştirici ve enzimleri aktive edici özelliktedirler. Balıklar üzerinde yapılan in vivo araştırmalarda stres önleyici etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (Cihangir ve Diler, 2016).

Dünyada, binlerce yıldır sınırsız sayıda bitki ve ekstraktları hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Erdoğan, 2013). Günümüzde bitkiler ve bitkisel ilaç hammaddeleri, tedavilerde kullanılan ilaçların büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçlar ve terapotik maddelerin yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması, infeksiyöz etkenlerin tedavisi için kullanılacak doğal, güvenilir ve ucuz ürünlerin kullanılma zorunluluğunu arttırmıştır

(Toroğlu ve enet, 2006). Bitkisel rnlerin kullanımı; daha kolay temin edilebilmeleri, ucuz olmaları, minimal yan etkilerinin olması, genelde düşük dozlarda etkili olabilmeleri ve patojenlere karşı geniş spektrumlu (bakteriyal, viral, fungal, parazitik) etki göstermeleri, evre için zararsız ve biyolojik olarak geri dönüşümlerinin olması da tercih edilme sebepleri arasındadır (Cihangir ve Diler, 2016).

Bitkilerin hastalıkları iyileştirme gücü ile ilgili bilgiler, kültürler arasında tarihler boyunca aktarılmıştır. Bitkiler; türüne, konsantrasyonuna ve bileşenlerine bağlı olarak, bakteriler funguslar ve virüsler üzerine antimikrobiyal etkilere sahiptirler. Bitki kaynaklı ilaçlar mikroorganizma orjinli hastalıkların tedavisinde büyük umut kaynağı olmuştur (Erdoğan, 2013). Bitkilerin ve içerdikleri aktif maddelerin yetiştiricilikte kullanılma olanaklarının belirlenmesi amacıyla yapılan sınırlı sayıdaki araştırmada, yeme ve suya ilave edilen bitki ekstraktlarının yem tüketimi, yemden yararlanma, büyüme ve karkas kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Şimşek ve ark., 2005; Aly ve ark., 2008).

Doğal bağışıklık sisteminin önemli komplementleri makrofajlar, monositler, granülositler ve lizozim, komplement gibi humoral elementler balıklarda patojenlerin istilasına karşı ilk savunma mekanizmasını oluştururlar. Tıbbi bitkiler bir immunostimulant olarak spesifik ve spesifik olmayan savunma mekanizmasıyla hastalıklara karşı direnci artırabilmektedirler. Bitkilerin aktif bileşenleri lizozim, komplement, B ve T lenfositleri, doğal öldürücü hücreler ve fagositoz gibi bağışıklık sisteminin çeşitli komplementlerini etkinleştirebilirler. Bu bağlamda, bitkiler ve onların yan ürünleri bağışıklık sistemini güçlendirmek için tercih edilebilmektedir. Bitkiler, fenolik, polifenolik, alkaloid, kinon, terpenoid, lektin ve polipeptit bileşikleri içermektedir. Bu bitkilerin çoğu antibiyotiklere, kimyasallara, aşılara ve diğer sentetik bileşiklere oldukça etkili alternatifler olarak gösterilmektedirler. Su rnleri yetiştiriciliğinde bitkisel ilaçların aynı zamanda antimikrobiyal aktivite gösteren, gelişmeyi kolaylaştıran ve kültür edilen trlerin olgunlaşmasında etkisi olduğu bunun yanı sıra yoğun yetiştiricilik yapılan çiftliklerde anti-stres özelliklerinin olduğu herhangi bir çevresel tehlike oluşturmadan kullanıldıkları bilinmektedir. Bitki ekstraktları ya da onların ürünlerinin çeşitli konsantrasyonlarda oral ya da enjeksiyon yolu ile uygulanması farklı tatlı su ve deniz balıklarında bakteriyel, viral ve parazitik hastalıklara karşı doğuştan ve adaptif immün cevabı artırmaktadır (Baba, 2017).

Bakteriyel balık hastalıklarında aşı koruyucu önlemlerin başında gelmektedir. *Y. ruckeri* için de aşı üretimi gerçekleştirilmektedir. Aşı ile koruma tedaviden hem daha ucuz hem de daha az mortalite sağlaması yönünden tercih edilmelidir. Balık aşuları ticari olarak ilk kez Kuzey Amerika'da *Y. ruckeri* tarafından oluşturulan yersiniozis hastalığına karşı kullanılmıştır (Gudding ve ark., 1999).

Yersiniozis hastalığının bütün salmonidlerde ve kedi balığı, japon balığı, mersin balığı gibi salmonid olamayan balıklarda da hastalık meydana getirdiği ve büyük ekonomik kayıplara sebep olduğu bilinmektedir (Kahraman, 2013).

*Y. ruckeri*, 9-37 °C'ler arasında üreyebilmesine rağmen optimum üreme sıcaklığının 20-25 °C olduğu belirlenmiştir (Austin ve Austin, 1987; Stevenson ve ark., 1993). Deneysel oluşturulan ERM enfeksiyonlarında inkübasyon periyodunun 13-15 °C su sıcaklığında 5-10 gün olduğu bildirilmektedir. Doğal salgınlarda inkübasyon periyodunun ısı, pH ve çözülmüş oksijen gibi çevresel faktörlerle etkilendiği belirtilmektedir (Bullock ve Cipriano, 1990). Enfekte olmayan balıklar 14.5 °C'de *Y. ruckeri* ile karşılaştıklarında 6. günde, 18.3 °C'de 9. günde epizootiler oluşmaktadır (Post, 1987). Hastalık, % 30-70 arasında değişen mortaliteye sahiptir (Austin ve Austin, 1987). Deneysel uygulamalardan 5-19 gün sonra başlayan ölümlerin inokulum miktarına bağlı olarak 30-60 gün sürdüğü bildirilmektedir (Austin ve Austin, 1987). ERM'de oluşan dış değişiklikler ilk defa Rucker tarafından infekte gökkuşuğu alabalıklarında hareketsizlik, renkte kararma, ağız ve operkulumlar etrafında ve yüzgeçlerin tabanında kızıllaşma şeklinde rapor edilmiştir (Rintamaki ve ark., 1986). Hastalık akut, subakut ve kronik formlarda seyretmektedir (Post, 1987). Akut form daha çok su ısısının aniden yükseldiği ilkbahar döneminde ve genç balıklarda görülmektedir. Hastalık hiçbir dış belirti olmadan aniden çıkmaktadır. Ağızda, yüzgeçlerin tabanında, operkulumlarda ve anüs etrafında eritem görüldüğü bildirilmektedir (Horne ve Barnes, 1999). *Y. ruckeri* suşlarının sulfamerazin, tetrasiklinler ve sulfonamidler ve oksitetrasikline (OX) karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Post, 1987). *Y. ruckeri*'nin farklı serotip ve biyotipleriyle yapılan çalışmalarda sulfatriad ve sephalothin'e dirençli, tetrasiklin ve kotrimoksazol'e duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Balta ve ark., 2010). 2015 yılında tetrasiklin ve sulfanomid direncini incelemek amacıyla yapılan farklı bir

çalışmada ise *Y. ruckeri* izolatlarının yalnızca tetD ve sulI genleri taşıdığı tespit edilmiştir (Duman, 2017).

Hastalık ilk defa 1950'li yıllarda Amerika'nın Idaho eyaletinin Hagerman vadisindeki gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde yüksek mortalite ile seyreden septisemik bir hastalık olarak rapor edilmiş ve 1966 yılında Ross ve ark., tarafından tam olarak tanımlanmıştır. Hastalık etkeni Ewing ve ark. (1978), tarafından ilk izolasyonu yapan Rucker'e ithafen *Y. ruckeri* olarak isimlendirmişlerdir.

Hastalık başlıca salmonid balıklarda görülmesine rağmen diğer balık türlerini de etkilemektedir (Horne ve Barnes, 1999). *Y. ruckeri*'nin konakçı aralığı sadece balıklar ile sınırlı değildir. Etkenin aynı zamanda misk faresi (*Ondatra zibethicus*), kerkenez (*Falco spp.*), deniz martıları (*Laridae*), kaplumbağalar (*Cheloniidae*) ve insanlardan izole edildiğine dair bildirimler bulunmaktadır (Toback ve ark., 2007). Bu gibi çok sayıda rapor, *Y. ruckeri*'nin geniş bir konakçı aralığına ve coğrafi dağılıma sahip olduğunu ve hem epizootilere hem de zoonoz hastalıklara neden olabileceğini göstermektedir (Kum ve ark., 2004). Günümüzde oldukça yaygın bir dağılıma sahip olan hastalık Kuzey Amerika, Avustralya, Güney Afrika ve Avrupa'da görülmüştür (Toback ve ark., 2007). Türkiye'de ise *Y. ruckeri* ilk defa İzmir'de gökkuşağı alabalık yetiştiriciliği yapılan bir işletmeden 1990 yılında Çağırman ve Yüreklitürk tarafından izole edilmiştir (Çağırman ve Yüreklitürk, 1991). Ardından Timur ve Timur, Denizli yöresindeki balıklardan aynı etkeni izole ettiklerini bildirmişlerdir (Timur ve Timur, 1991). Hastalık ülkemizde ilk bildirildiği tarihten itibaren özellikle ilkbahar ve sonbahar aylarında epizootiler halinde ortaya çıkmaktadır (Çağırman ve Yıldırım 1990; Tanrıkul ve ark., 1996; Candan ve Karataş, 1997).

Sorbus bitkisi 5-10 metre yüksekliğinde, Mayıs-Haziran ayında beyaz renkli çiçekler açan ve kışın yaprağını döken bir ağaçtır. Yaprakları 7-11 çift yaprakçığa parçalanmıştır. Meyveleri küre veya armut şeklinde, yeşilimsi sarı veya kırmızımsı-esmer renkli olup, buruk lezzettedir. Türkiye'de 11 kadar üvez türü bulunur. *Sorbus aucuparia* türü kuş üvezi olarak bilinir ve Kuzey Anadolu'da yaygındır. *Sorbus domestica* türü (üvez) Karadeniz bölgesinde tabii olarak yayılış gösterdiği gibi meyveleri için birçok bölgede yetiştirildiği bildirilmektedir (Anonim-a, 2018).



Moringa bitkisi ise dünyanın en faydalı bitkisi olarak bilinmektedir. *Moringa oleifera*; Asya, Afrika ve orta Amerika'da mucize sebze olarak kullanılan bir bitkidir. Ağacı, yaprağı, tohumu, kabuğu ve kerestesi ile her bölümü kullanılan moringa, Malezya'da fıstık olarak da tüketilmektedir. Moringa ağacının 100 gram tohumu 1 litre suya döküldüğünde suyun içerisindeki pisliklerin dibe çökmesini sağladığı, suyun içindeki bakterileri %99 oranında öldürdüğü, Görme kalitesini artırarak var olan göz rahatsızlıklarını tedavi etme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. Ülser ve yara tedavisinde etkilidir. Protein bakımından oldukça zengindir. Doğal mineral eksikliğini giderir. Etkili bir antioksidandır. İçerisinde bulunan A, C ve D vitaminleri sayesinde yaşlılık belirtilerine karşı etkilidir. Kalp ve böbrek hastalıklarının oluşmasını önler. Kanserle karşı önleyici olduğu birçok araştırmaya göre kanıtlanmıştır. Düşük miktarda yağ ve karbonhidrat içerdiği için zayıflamaya yardımcı bir bitkidir. Tümör oluşmasını engeller. Sadece bir gıda değil aynı zamanda bir ilaç olan moringa fonksiyonel gıda olarak da tüketilmesi önerilmektedir. İçerisinde metionin ve sistin içermesi sebebiyle güçlü bir amino asit kaynağıdır (Anonim-b, 2018).

Bu çalışmada kullanılan fitokimyasallar bakteriyel balık hastalık etkenleri üzerinde daha önce çalışmanın bulunmaması ve antibakteriyel olarak seçilen ajanların ise en sık kullanılan antibiyotikler olması çalışmanın önemini artırdığı kanaatindeyiz. Su ürünleri alanında en sık kullanılan antibiyotiklere alternatif bir tedavi olarak hedeflenen bitki özütlerinin etkilerinin olumlu, olumsuz veya etkisiz olduğu hakkında bilgi edinilmiştir. Bu çalışmada *Y. ruckeri* ATCC 29473 referans suşu ve farklı zamanlarda muhtelif bölgelerden izole edilmiş olan *Y. ruckeri* izolatu kullanılmıştır. Fitokimyasal olarak antibakteriyel özellikte olan Moringa ve Sorbus bitki ekstraktları kullanılmıştır. Antibiyotik olarak (OX) ve enrofloksasin (ENR) maddeleri her bir bitki ekstraktına göre etkileri kıyaslanmıştır. Antibiyogram testi hem klasik katı besiyerinde hem de sıvı besiyerinde spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda önemli bakteriyel hastalık etkenlerinden *Y. ruckeri* etkeni ile mücadelede kullanılacak alternatif bitki ekstraktları ve etki oranları belirlenerek, antibiyotik dirençlerinin sıklıkla kullanılan antibiyotiklere göre kıyaslaması gerçekleştirilmiştir.

## 2.1. Etiyoloji

Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan *Yersinia* genusuna mensup türler, Gram-negatif, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik bir özellik göstermekte olup, insanlar, balıklar dahil olmak üzere birçok omurgalı hayvanda hastalığa neden olmaktadır (Kumar ve ark., 2015). *Y. ruckeri* 1950'lerde Amerika Birleşik Devletleri İdaho, Hagerman vadisinde gökkuşağı alabalıklarından tanımlanmıştır (Ross ve ark., 1966).

Yersiniosis hastalığının etkeni olan *Y. ruckeri*, Gram negatif, 1,0x2,0-3,0 µm ebadında genellikle 8 adet peritrik flagellasıyla hareketli, oksidaz, H<sub>2</sub>S, İndol, VP negatiftir. Katalaz, ONPG, LDC, ODC, MR, nitrat, sitrat pozitif özelliktedir (Çağırğan, 2007).

Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) salmonidler içerisinde en duyarlı türdür. Yersiniosis gökkuşağı alabalığı ve diğer salmonid balıkların en önemli hastalıklarından biridir. Hastalık etkeni, *Salma salar*, *Salmo clarki*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*, *Oncorhynchus kisutch* ve *Oncorhynchus nerka* gibi birçok salmonid balıktan izole edildiği bildirilmiştir (Çağırğan, 2007; Bastardo ve ark., 2011).

Etkenin bulaşmasında asemptomatik portör balıklar önemlidir. Bakteri asemptomatik portör balıkların bağırsağının son kısmında bulunur. Böyle balıklar stres içinde değilse enfeksiyonu bulaştırmazlar. Fakat elleme, suda yüksek amonyak ve diğer artık maddelerin yüksek düzeyde bulunması, sudaki çözünmüş oksijen seviyesinin düşmesi sonucunda oluşan stresle enfeksiyon etkenini yaymaya başlayarak sağlıklı balıklara da bulaştırırlar. Doğal enfeksiyonlarda mortalite, patojene maruz kaldıktan 5-19 gün sonra başlar, alınan patojenin miktarına göre, 30-60 gün devam eder. Etken bu balıkların dışkılarıyla suya çok miktarda saçılmakta ve diğer balıkları enfekte etmektedir. *Y. ruckeri* %0,0- %0,20 tuzlulukta 4 ay kadar canlı kalabilmekte, epizootiden sonra patojen tatlı suda uzun süre bulunabilmektedir. Bakterinin dormant fazı vardır, bu fazda kültürü yapılamamasına rağmen canlılık devam edmektedir (Austin ve Austin, 2007).

*Y. ruckeri* normal insan florası üyesi değildir. Ancak, oldukça geniş dağılıma sahiptir. *Y. ruckeri*'nin doğal rezervuarları arasında, vahşi, ev ve kesim hayvanlarının oluşturduğu tüm sıcakkanlı hayvanları (kemiriciler, tavşan, kuş, geyik, balıklar, sığır, domuz, koyun, keçi, at, köpek ve kedi gibi) sayabiliriz. Zaman zaman kabuklu veya

kabuksuz deniz canlılarında da bulunabilmektedir. Primer hastalık sonrası iyileşen birçok hayvan, taşıyıcı olarak kalmakta; dışkıları ile bakterileri büyük miktarlarda dışarı atmakta ve böylece toprak, göl, dere, içme suları, sebze gibi besin maddeleri kontamine olmaktadır. *Y. ruckeri*, ayrıca etlerde, süt ve süt ürünlerinde de bulunabilmektedir. *Y. ruckeri*'nin +4 °C'de bile üreyebilmesi, buzdolabında bekletilen kontamine gıdaların da riskli olduğunu göstermektedir (Butler, 2001).

## 2.2. Klinik Semptomlar ve Otopsi Bulguları

Gökkuşluğu alabalıklarında ERM'nin çoğunlukla 7-10 cm büyüklüğündeki balıkları etkilediği belirtilmektedir. Hastalık yaşlı ve büyük balıklarda daha çok kronik formda ortaya çıkmaktadır. Hastalığın en şiddetli seyrettiği su sıcaklığı 15-18 °C'dir. 10 °C'nin altında hastalığın gözükmediği bildirilmektedir (Busch, 1982; Horne ve Barnes, 1999). Hastalık salgınları düşük seviyeli ölümlerle başlamakta zamanla bu ölümler devam ederek sonuçta kümülatif olarak yüksek kayıplara (mortalite) neden olmaktadır (Toback ve ark., 2007). Hastalık akut, subakut ve kronik formlarda seyretmektedir. Akut form daha çok su sıcaklığının aniden yükseldiği ilkbahar döneminde ve genç balıklarda görülmektedir. Hastalık aniden çıkmakla beraber, bazı vakalarda ağızda, yüzgeçlerin tabanında, operkulumlarda ve anüs etrafında eritem görüldüğü bildirilmektedir (Horne ve Barnes, 1999). Deride ve vücudun değişik kısımlarında hemorajiler görülebilmektedir. İç organlarda, peritonda, vücut yağında, gonadlarda ve mezenteriumlarda eritem ve peteşiyel hemorajilere de rastlanılmaktadır. İntestinal organlar genellikle eritemiktir ve kanlı bir mukusla doludur. Dalak ve böbrek şişkindir. Karaciğer soluk renktedir. Kaslarda peteşiler görülebilir (Austin ve Austin, 1987; Bullock ve Cipriano, 1990; Çağırğan ve Yüreklitürk, 1991).

Subakut vakalar da akut vakalara benzerlik gösterir, ama hastalık belirtileri daha şiddetlidir. Ayrıca tek veya çift taraflı ekzoftalmus görülebilir. Böbrek ve dalak daha şişkindir ve genel eritem görülebilmektedir (Post, 1987).

Kronik vakalar akut veya subakut vakalardan daha farklıdır. Hasta balıklarda kısmi veya tam körlük şekillenebilmektedir. Derinin rengi iyice koyulaşmıştır. Hasta balıklar su yüzeyinde halsiz (letarjik) ve düzensiz bir şekilde yüzerler. Bazılarında abdomen gergin ve şişkin, bazılarında içine çekik olabilir. Yüzgeçlerin tabanında,

ağızda ve operkulumlarda eritem görülebilir. Visera etrafında seröz sıvı birikimi ve genel eritem olabilmekte fakat hemoraji görülmemektedir. Böbrekler şişkin ve dalak büyümüştür. Karaciğer genellikle soluk renktedir (Busch, 1982; Austin ve Austin, 1987).

Hasta balıklarda egzoftalmus, solungaçlarda solgunluk, dil mukozası, gözlerde peteşi ve hemoraji, deride kararma, karında şişlik ve uyuşukluk, mikroskopik olarak dalak ve böbrek hematopoitik dokularında melanomakrofajlarda artış, solungaç lamellerinde yapışmalar, epidermiste spongiozis, ülser ve telangiektaziler görülür (Sağlam ve ark., 2006). Olumsuz su kriterleri ve aşırı stok yoğunluğunun bulunduğu yetiştiricilik yapılan işletmelerde, balıklarda ağız ve dil üzerinde kanamalarla karakterize olduğu bildirilmektedir (Lasea, 1995). *Y. ruckeri* konakçı dışında uzun süre yaşayamaz. Etkenin bitki veya hayvan bulunmayan suda 2-3 hafta, çamurda 2 ay yaşadığı bildirilmiştir *Y. ruckeri*'nin balıktan balığa bulaşması daha çok oral yolla olmaktadır (Tıravoğlu Demirtaş, 2006).

Hastalığı geçiren balıklar portör kalırlar ve hastalığın bulaşmasında bu portör balıklar önemli rol oynarlar. Enfeksiyondan sonra 30-60. günlerde iç organlardan izole edilebilen *Y. ruckeri* enfeksiyondan sonraki 60-65. günlerde balıkların % 50-75'inin ince bağırsaklarında lokalize olmaktadır. Enfeksiyondan sonra yaklaşık 100 gün kadar 30-40 günlük periyotlar halinde bağırsaktan etrafa saçılmakta ve sonrasında tipik semptomlar gözlemlenmektedir (Austin ve Austin, 1987).

### 2.3. Bulaşma

*Y. ruckeri* enfeksiyonları enfekte ve enfekte olmayan balıklar arasında doğrudan temas yoluyla bulaşabilir. *Y. ruckeri* enfeksiyonlarda taşıyıcı durumda olan balıklar önem taşımaktadır. Öyleki, taşıyıcı balıklar stres altında kaldığında enfeksiyonu yayabilmektedirler. Örneğin, taşıyıcı balıkların yaşadığı ortamdaki su sıcaklığı 25 °C'ye yükseltildiğinde klinik olarak sağlıklı balıklara *Y. ruckeri* aktardığı gözlemlenmiştir (Kumar ve ark., 2015).

Ancak stres altında olmayan taşıyıcı balıklardan hiçbir aktarım gerçekleşmemektedir. Bakterinin dışkıyla saçılması bulaşmada önemli bir rol oynamaktadır ve *Y. ruckeri* konakçı dışında en az 4 ay yaşayabilmektedir (Toback ve

ark., 2007). Yapılan bir çalışmada Gökkuşığı alabalıklarında *Y. ruckeri* enfeksiyonundan 45 gün sonra dahi populasyonun %25'inin, bağırsağının son bölümünde herhangi bir klinik tablo görülmeden etkeni taşıdığı bildirilmiştir (Busch ve Lingg, 1975).

Akuatik ortamlardaki sediment, havuz ve tank gibi yüzeylerdeki bakterilerin hayatta kalmasında en önemli etmen biyofilm formasyonudur (Kumar ve ark., 2015). Coquet ve ark., (2002), balık işletmelerinde kullanılan tanklarda sıklıkla bulunan katı destekler üzerinde biyofilm oluşturabilen bir *Y. ruckeri* suşu izole etmişlerdir. Ayrıca *Y. ruckeri*'nin yayılması su omurgasızları ve kuşları içerisine alan olası vektörler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2015).

#### 2.4. Teşhis

Hastalığın tanısında klinik belirtiler, bakteriyel izolasyon-identifikasyon ve histopatolojik bulgular önemlidir (Busch, 1982; Austin ve Austin, 1987). Gram negatif bakterilerin neden olduğu sepsisemilere benzerlik göstermesi nedeniyle klinik belirtiler ve otopsi bulgularına bakılarak hastalığın kesin teşhisi yapılamamaktadır. Klinik ve patolojik bulgular önem taşımakla beraber kesin tanı için hastalıklı organlardan etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmalıdır (Altun ve ark., 2010).

*Y. ruckeri* rutin bakteriyolojik besiyerlerinin çoğunda ürer. Bakteriyolojik ekimler için genellikle TSA, Nutrient Agar (NA), Walltman-Shotts (WS), Rimler-Shotts Agar (RSA), BHIA kullanılmaktadır (Rodgers, 1992). 20-25 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra gözle görülebilen koloniler oluşmaktadır (Horne ve Barnes, 1999). Etken identifikasyonu amacıyla şüpheli kolonilerden alınan bakteriler biyokimyasal testlere tabi tutulur. *Y. ruckeri* suşları genel olarak biyokimyasal reaksiyonlarda homojen karakter gösterirler. Ama metil red, voges-proskauer, lizin dekarboksilaz, arjinin hidrolaz ve laktoz fermentasyon testlerinde suşların farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Austin ve ark., 1982; Green ve Austin, 1983).

Hastalığın, genelde akut formda yüksek mortalite ve morbidite oranıyla seyretmesi hastalıktan kaynaklanan ekonomik kayıpları arttırmakta, bu nedenle teşhiste hızlı ve spesifik metotların kullanılma gerekliliğini arttırmaktadır. Polimerize Zincir Reaksiyonu (PCR) metodu geleneksel mikrobiyolojik metotlara alternatif olarak

oldukça geniş bir kullanım alanı sunmaktadır. *Y. ruckeri* suşu ile deneysel olarak enfekte edilmiş ya da doğal olarak enfekte olmuş, alabalıklarda etkenin PCR yöntemi ile identifikasyonunun daha güvenli olacağını ve klasik kültür metotlarına nazaran daha kısa sürede sonuç vereceği de bildirilmiştir (Altınok ve ark., 2001).

## 2.5. Kontrol ve Tedavi

Genel olarak hastalığın önlenmesi ve kontrolü iyi idare veya yönetim uygulamaları ve aşılama ile sağlanmaktadır. Klinik yersiniozis hastalığı stres ile ilişkili bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle hastalığın hali hazırda bulunduğu bölgelerde, hastalığın şiddetinin, stresin azaltılması, su kalitesinin kontrol edilmesi, uygun beslenme ve iyi sağlık uygulamalarının sürdürülmesi ile azaltılabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte hastalığın önlenmesi için etkeni bulundurmeyen stokların alınması, stokların aşılama ve/veya aşılanmış stokların alınması ve yüksek riskli dönemlerde yemlemenin azaltılması önerilmektedir (Furones ve ark., 1993).

Balıklarda bakteriyel patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlarda çoğu zaman enfeksiyon sonrası tedavi, antibiyotik kullanımına dayanmaktadır. Yersiniozis'in tedavisinde de oksolonik asit (10 gün boyunca günlük 10 mg/kg) ve OX (10 gün boyunca günlük 50-75 mg/kg) gibi antibakteriyellerin kullanılabilmesi bildirilmiştir (Furones ve ark., 1993). *Y. ruckeri*, çeşitli antibiyotiklere duyarlı olmasına rağmen, birçok antimikrobiyal bileşiğe karşı direnç kazandığı çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *Y. ruckeri* izolatlarının antibiyotiklere karşı değişik oranlarda direnç kazandığı ortaya konulmuştur (Akaylı ve ark., 2013). Altun ve ark. (2013) tarafından, gökkuşağı alabalığı kökenli *Y. ruckeri* izolatlarının Türkiye'de balıklarda kullanım için ruhsatlanmış antibiyotiklerden olan florfenikol, OX ve trimetoprim-sulfamethoxazole karşı direnç geliştirmiş olduklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Balta ve ark. (2016), yersiniozis vakalarında en sık kullanılan antibiyotiklerden OX'e karşı % 62,8 ve trimetoprim + sulfametoksazol'a karşı % 14,9 direnç şekillendiğini tespit etmiştir. Son yıllarda *Y. ruckeri* izolatlarında antimikrobiyal direncin yayılımında rol oynayan antibiyotik direnç genlerinin varlığını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda etkenin tetA, tetB (Balta ve ark., 2010),

sulI, tetC, tetE, tetD, ve floR direnç genlerini taşıdığı bildirilmiştir (Duman ve ark., 2017).

Antibiyotik direnç gelişimi ile ilgili kaygılar etkenin kontrolünde alternatif metotlar üzerinde çalışılmasına neden olmuştur. Bu amaçla özellikle probiyotik bakteri ve immunostimulan kullanımı önem kazanmıştır (Kumar ve ark., 2005; Tobbak ve ark., 2007).







### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri İzolasyonu

Çalışmada ATCC 29473 nolu referans *Y. ruckeri* suşu ve farklı zamanlarda izole edilen *Y. ruckeri* izolatu kullanılmıştır. Tüm bakteriler TSA ve WS besiyerlerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Morfolojik olarak benzerlik gösteren tipik koloniler seçilerek identifikasyona geçilmiştir. Çalışma esnasında bakteriler %15 gliserol, %85 besiyeri ortamında -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir (Austin ve Austin, 1999).

#### 3.2. Bakterilerin İdentifikasyonları

İzolasyonu gerçekleştirilen bakterilerin identifikasyonları mikrobiyolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak gerçekleştirilmiştir.

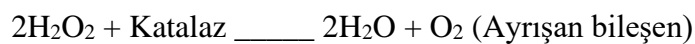
##### 3.2.1. Mikrobiyolojik identifikasyon

###### 3.2.1.1. Gram boyama

Bakteri süspansiyonu lam üzerine sürülüp kısık ateşte kurutulup alevden 3 kez geçirilerek sabitlenmiştir. Ardından 1 dakika kristal viole, 1 dakika lugol, 15 saniye alkol ve 1 dakika safranine maruz bırakılmıştır. Boyama işlemi sonrasında kurumaya bırakılan preparat mikroskop altında 4, 10, 40 ve 100X'lik objektiflerde gözlemlenmiştir (Önalın ve Arabacı, 2016).

###### 3.2.1.2. Katalaz testi

Katalaz, içerisinde bir hematin bulunan enzimdir ve bu enzim hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gaz oksijen ve suya ayırıştırılmaktadır (Beşe, 1974).



Katalaz enzimi yaygın olarak doğada ve çoğunlukla aerobik hücrelerde bulunmaktadır. Katalazın görevi oksidasyon-redüksiyon olayından meydana gelen toksik hidrojen peroksidi almak ve onun hücrelerde birikimine engel olmaktır. Çalışmada izole edilen *Y. ruckeri* izolatları lam üzerinde birkaç damla dökülmüş olan hidrojen peroksidi üzerine öze yardımıyla bırakılmıştır. Katalaz varlığından O<sub>2</sub> (Oksijen) açığı çıkmasından dolayı oluşan köpük katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Beşe, 1974).

### 3.2.1.3. Oksidaz testi

Birçok bakteri oksidaz sistemine sahiptir. Bu enzimler bakteri ile bir redox boyadaki (tetramethyl-P-phenylene-diamine) elektron domerleri arasında elektronların naklini katalize etmektedirler. Oksidaz reagent kiti para-amino dimetilanilin içermektedir. Çalışmada izolatların oksidaz testinin gerçekleştirilmesi amacıyla petri üzerine steril filtre kağıdı konularak üzerine oksidaz reagent dökülmüştür. Ardından bakteri kolonisi öze yardımıyla alınarak filtre kağıdına sürülmüştür. 1 dakika süre içerisinde oluşan mavi renk oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Önalın ve Arabacı, 2016).

### 3.2.1.4. Hareket testi

Besiyeri ortamında izole edilen *Y. ruckeri* kültürleri üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su (PBS) damlatılan lamın üzerine sürülerek mikroskop altında incelenmiştir. Glayding hareketi gösteren bakteriler hareketli olarak kabul edilmiştir (Austin ve Austin, 1999).

## 3.2.2. Bakterilerin fenotipik (biyokimyasal) identifikasyonları

Çalışmada besiyeri ortamında izole edilen ve mikrobiyal identifikasyonları gerçekleştirilen *Y. ruckeri* kültürleri fenotipik identifikasyon amacıyla Microgen ticari kiti (GNA-GNB) kullanılarak biyokimyasal özellikler belirlenmiştir. TSA besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından McFarland 0,5 optik dansiteye ayarlanan bakteriler kit içerisindeki küpüllere inoküle edilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonrasında mikrogen firmasının okuma tablosuna göre

sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Microgen web sitesi programı ile eşleştirilerek biyokimyasal identifikasyonları gerçekleştirilmiştir (Gülaydın ve ark., 2018).

### **3.2.3. Bakterilerin moleküler identifikasyonları**

#### **3.2.3.1. Total DNA izolasyonu**

Bakterilerin genomik DNA'ları GeneJet Genomik DNA izolasyon kiti ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda izole edilmiştir. İzole edilen DNA'ların saflıkları nanospektrofotometre cihazı (Thermo) ile 260 nm dalga boyunda llmştir. İzole edilen DNA'lar çalışma sresinde -20 C'de muhafaza edilmiştir (nalın ve Yavuz, 2019).

#### **3.2.3.2. Real-Time PCR analizi**

İzole edilen DNAlar, *Y. ruckeri* spesifik Forwad ve Reverse Primerler (47F-1492R), 2x SYBRGreen master mix, DNase-RNase free su kullanılarak 25 l toplam hacime ayarlanmıştır. Real-Time PCR işleminde 95 C n denatürasyon işlemini takiben 94 C'de denatürasyon, 55 C'de bağlanma ve 72 C'de uzama işlemi 45 cycle olarak tamamlanmıştır. Son basamak olarak 72 C de 7 dakika son uzama ile PCR işlemi tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak non-template kontrol tüpleri kullanılmıştır. RotorGene Q 9000 yazılımda sigmoidial eğriler veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir. PCR ampikonları ile gerçekleştirilecek sekans analizi sonucunda çalışmada kullanılan *Y. ruckeri* izolatlarının hem identifikasyonları hem de kendi içlerinde benzerlik oranları belirlenmiştir (nalın ve Arabacı, 2016).

### **3.3. Fitokimyasaların Temini**

Çalışmada kullanılacak Moringa (*M. oleifera*) ve Sorbus (*S. domestica*) bitki ekstraktları sıvı formda ticari olarak satın alınmıştır. Satın alınan bitki ekstraktları farklı dilüsyonlarda seyreltilerek katı (antibiyogram testi için) ve sıvı (spektrofotometrik ölçüm için) besiyeri ortamlarında uygulanmıştır.

### 3.4. Sıvı Besiyerinde Fitokimyasalların Etkilerinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Çalışmada kullanılacak olan bakteri kültürlerine fitokimyasalların ve antibiyotiklerin etkilerinin belirlenmesi amacıyla 10 gruptan oluşan süspansiyon çözeltiler hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). Çalışmada negatif kontrol olarak tüm grupların bakteri ekilmemiş grupları kullanılacaktır. Pozitif kontrol olarak Tryptic Soy Broth (TSB) de referans bakterinin gelişimi ölçülmüştür. Ölçümler her 2 saatte bir alınmıştır.

Çizelge 3.1. Spektrofotometrik ölçümler amacıyla oluşturulan gruplar

Grup no	Grup içeriği
1	10 mL TSB Kontrol (10 mL TSB)(Sıfırlama)
2	10 mL TSB+50 µl Bakteri(Sıfırlama:1)
3	10 mL TSB+400 µl Moringa-sıfırlama
4	10 mL TSB+400 µl Moringa+50 µlbakteri(Sıfırlama: 3)
5	10 mL TSB+400 µl Sorbus(sıfırlama)
6	10 mL TSB+400 µl sorbus+50 µl bakteri(Sıfırlama: 5)
7	10 mL TSB+1-OX+50 µl bakteri (Sıfırlama:9)
8	10 mL TSB+1-ENR+50 µl bakteri (Sıfırlama:10)
9	10 mL TSB+1 Disk OX (Sıfırlama)
10	10 mL TSB+1 Disk ENR (Sıfırlama)

### 3.5. Antibiyogram Testi

Antibiyogram testinde Müller-Hinton Agar (MHA) besiyerinde toplam 100 µl *Y. ruckeri* süspansiyonları drigaski ile yayılmıştır. Ardından OX ve ENR antibiyotik diskleri simetrik bir şekilde petri kutularına yerleştirilmiştir. Besiyerleri 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonrasında oluşan zone çapları cetvel yardımıyla mm olarak ölçülmüştür. Sonuçlar Antibiotic Zone Diameter Table ile kıyaslanarak hem etkene antibiyotiklerin duyarlılık ve dirençleri hem de fitokimyasalların antibiyotiklere oranlara kıyaslaması gerçekleştirilmiştir (Balta ve ark., 2010).

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada bakterilerin izolasyonu amacıyla TSA ve WS besiyerlerinde ilk ekimlerin ardından koloni morfolojisine göre seçilen tek kolonilerden tekrar ekimler yapılarak bakteriler saflaştırılmıştır. Ardından, Kanlı Agar (BA) besiyerine ekimler gerçekleştirilmiş olup gelişen bakterilerin hemolitik özellikleri belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kanlı agar besiyerinde gelişen *Y. ruckeri* izolatlarının görüntüsü.

Kanlı agarda gelişen bakterilerden gerçekleştirilen testler sonucunda bakterilerin Gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif oldukları ve hareketli oldukları gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Y. ruckeri* izolatlarının bazı mikrobiyolojik test sonuçları.

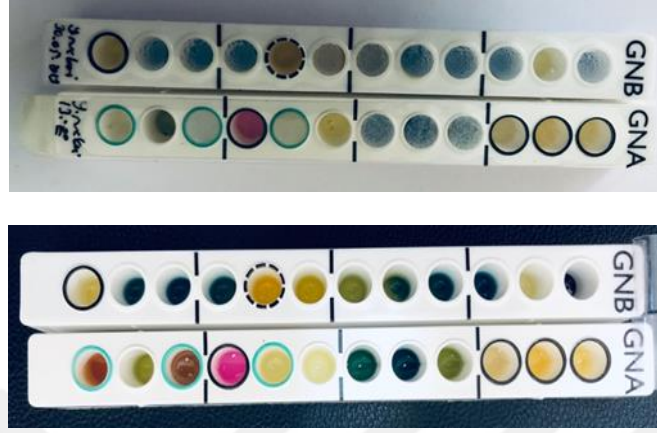
Testin adı	<i>Y. ruckeri</i> referans suş	<i>Y. ruckeri</i> izolatı
Gram boyama	(-)	(-)
Katalaz	(+)	(+)
Oksidaz	(-)	(-)
Hareket	(+)	(+)

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

### 4.2. Bakterilerin Biyokimyasal Test Sonuçları

*Y. ruckeri* izolatlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Microgen firmasının GnA+B ID sistemi kullanılmıştır. Bakteri inkübasyonunun ardından gelişen

renk değişimleri (Şekil 4.2) ve biyokimyasal test sonuçları (Çizelge 4.2) aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.2. *Y. ruckeri* izolatları ile gerçekleştirilen Microgen GnA+B testleri sonrası meydana gelen reaksiyon sonuçları.

Çizelge 4.2. *Y. ruckeri* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

Test	Açıklama	Sonuç	Test	Açıklama	Sonuç
INO	Acid from Inositol	+	TDA	Tryptophan Deaminase	-
LYS	Lysine Decarboxylase	+	GEL	Gelatin Liquefaction	+
ORN	Ornithine Decarboxylase	+	MAL	Malonate Utilization	-
H2S	H2S Production	-	SOR	Acid from Sorbitol	-
GLU	Acid from Glucose	+	RHA	Acid from Rhamnose	-
MAN	Acid from Mannitol	+	SUC	Acid from Sucrose	-
XYL	Acid from Xylose	-	LAC	Acid from Lactose	-
ONP	ONPG	+	ARA	Acid from Arabinose	-
IND	Indole	-	ADO	Acid from Adonitol	-
UR	Urea Hydrolysis	-	RAF	Acid from Raffinose	-
VP	Voges Proskauer	-	SAL	Acid from Arabinose	-
CIT	Citrate Utilization	+	ARG	Arginine Dihydrolase	-

Biyokimyasal test sonuçları kit kuyucuklarında bulunan reaktifler ile bakteriler arasındaki reaksiyon sonucunda meydana gelen renk değişimlerine göre değerlendirilmiştir. Microgen firmasının yazılımına pozitif (+) ve negatif (-) sonuçların girilmesi ile online olarak elde edilen sonuç raporuna göre izolatların %99,85 oranında *Y. ruckeri* oldukları teyid edilmiştir (Şekil 4.3). Ayrıca, çalışmada kullanılan 2 farklı *Y. ruckeri* izolatının biyokimyasal test sonuçları arasında fark olmadığı görülmüştür.

**Microgen ID****Microgen GNA + B Oxidase Negative****Specimen Details****Lab Ref.:****Date:** 29.05.2019**Name:****Specimen Type:****Source (ward/location):****Results Entry****Octal Code:** 66424000

+ LYS	Lysine Decarboxylase	+ ORN	Ornithine Decarboxylase	- H2S	H2S Production
+ GLU	Acid from Glucose	+ MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	- IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
- VP	Voges Proskauer	+ CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
+ GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

**Identification Analysis**

	<i>Y.ruckeri</i>	<i>S.marcescens biogp 1</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>H.alvei biogp 1</i>	<i>X.maltophilia</i>
<b>Select ID Choice</b>	Yes	No	No	No	No
<b>Probability</b>	1/35.081	1/37.715.125	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
<b>Percent Probability</b>	99,85%	0,09%	0,03%	0,02%	<0,01%
<b>Likelihood</b>	0,04%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
<b>Human Isolate</b>	No	No	Yes	Yes	No
<b>Tests against</b>					
<b>Test 1</b>	CIT (0,1%)	SUC (99,9%)	SOR (99%)	CIT (0,1%)	ORN (0,1%)
<b>Test 2</b>		SOR (92%)	SUC (99%)	GEL (0,1%)	MAN (0,1%)
<b>Test 3</b>		SAL (92%)	VP (98%)		GLU (3%)
<b>Additional Tests</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>DNase (25C)</b>	0,1%	82%	98%	0,1%	0%
<b>Acid from Maltose</b>	95%	70%	96%	0,1%	0%
<b>Motility (37C)</b>	0,1%	17%	97%	0,1%	0%
<b>Acid from Mannose</b>	99,9%	99,9%	99%	99,9%	0%

**Additional Comments**

61

54

- 54 Previously *Pseudomonas maltophilia*. Also reported as *Stenotrophomonas maltophilia*.  
61 Original citation: Int. J. Syst. Bacteriol. (1978) 28 : 37-44

**Identification Comments**Acceptable Identification of "*Yersinia*" *ruckeri*

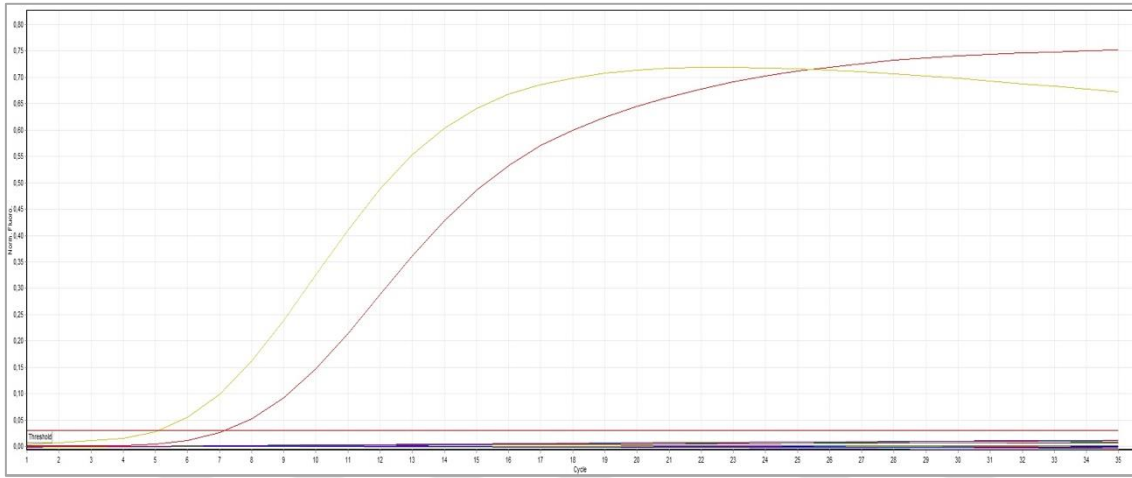
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices

ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Şekil 4.3. *Y. ruckeri* izolatlarının biyokimyasal identifikasyon sonuç raporu (Microgen ID sisteminden üretilmiştir).

### 4.3. Bakterilerin Moleküler İdentifikasyonları

Çalışmada kullanılan bakterilerin hem farklı metotlar ile identifikasyonları hem de bu metotlar kullanıldığında izolatlar arasındaki farklılıkların olup olmadığı ortaya konulmuştur. Moleküler metotlar kullanılarak bu işlemin gerçekleştirilmesi amacıyla bakterilerin moleküler identifikasyonu amacıyla universal bakteri primerleri (27F-1492R) kullanılarak gerçekleştirilen Real-Time PCR işlemi sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



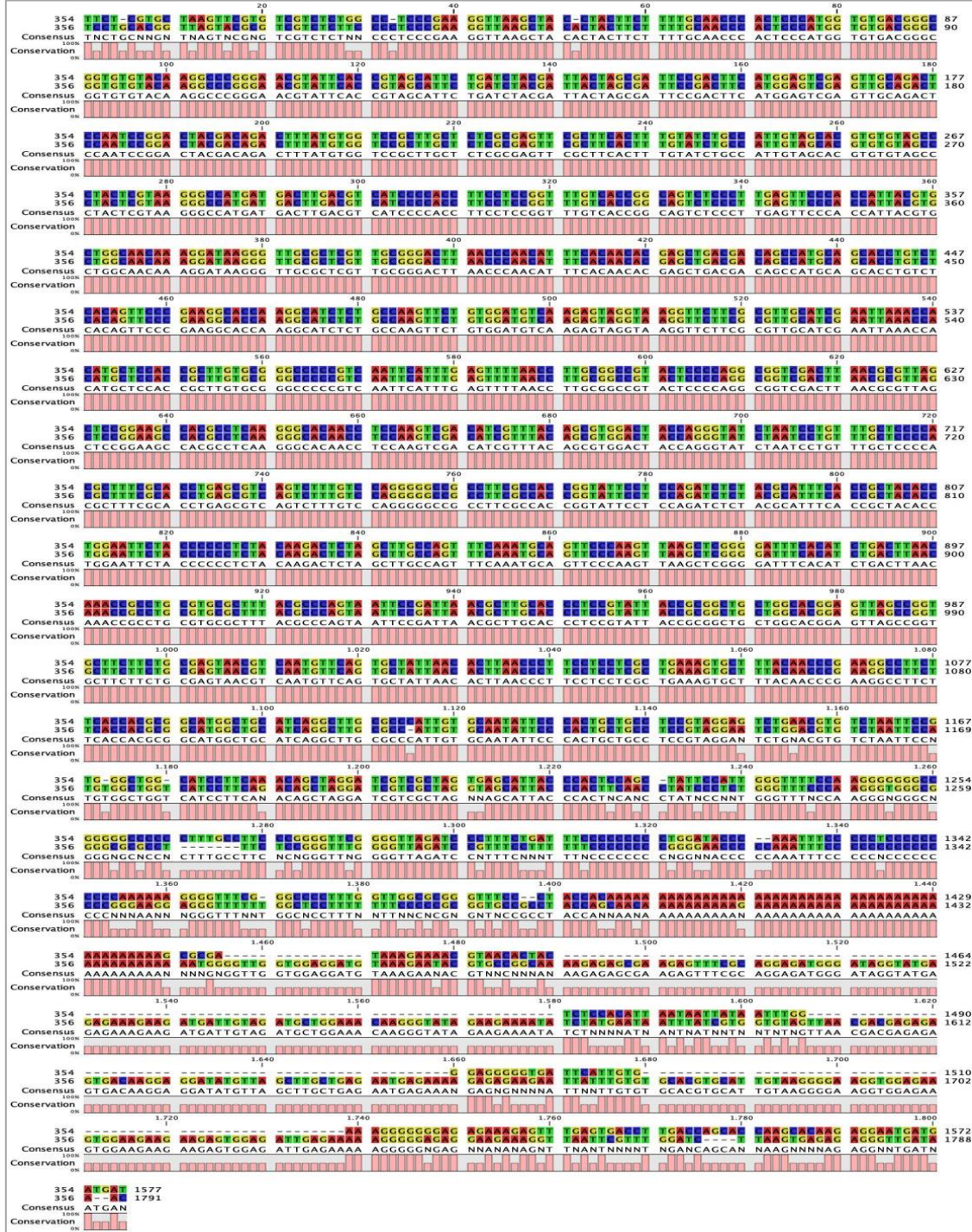
Şekil 4.4. *Y. ruckeri* izolatlarının Real-Time PCR sonucu.

Real-Time PCR analizi sonuçlarına göre çalışmada kullanılan *Y.ruckeri* referans ve izolatının sigmoidal eğriler verdiği ve pozitif oldukları gözlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan örneklerin (NTC ve Master mix Kontrol) eşik değerinin altında ve düz çizgi ile negatif sonuç verdikleri görülmüştür.

### 4.4. Bakterilerin Sekans Analizi ve Filogenetik Benzerlikleri

Real-Time PCR analizi sonrasında elde edilen PCR ampliconları ile 27F-1492R primerleri kullanılarak 16S rRNA gen bölgesinin dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen dizi sonuçları NCBI Blast uygulaması ile gen bankasında *Y. ruckeri* oldukları teyid edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilerin 16S rRNA gen dizilimleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.5).





Şekil 4.5. Çalışmada kullanılan *Y. ruckeri* izolatlarının 16S rRNA gen sekansları (354: *Y. ruckeri* referans suş, 356: *Y. ruckeri* izolatu).

Sekans verisi ve blast işleminin tamamlanmasının ardından elde edilen veriler CLC Main Workbench yazılımında filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatların filogenetik benzerlikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6).

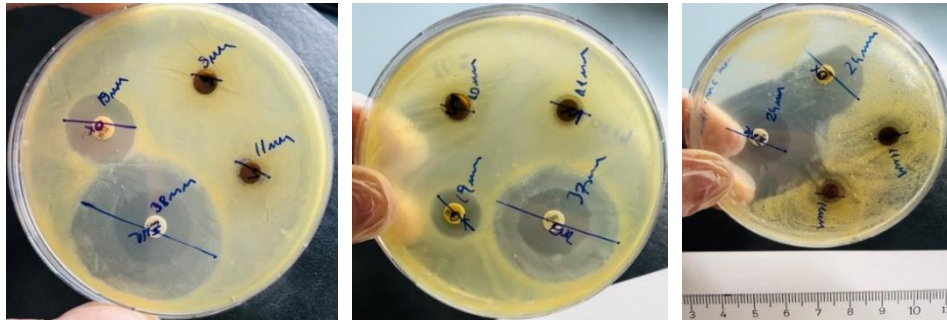


Şekil 4.6. Çalışmada kullanılan *Y. ruckeri* izolatlarının filogenetik benzerlik sonuçları (354:*Y. ruckeri* referans suş, 356: *Y. ruckeri* izolatu).

Bu sonuçlar doğrultusunda %99 üzeri benzerlik oranı ile *Y. ruckeri* izolatlarının benzer olduğu görülmüştür.

#### 4.5. Antibiyogram Test Sonuçları

Antibiyogram testinde MHA besiyerine (25 mL/petri) 100 µl bakteri ekimleri gerçekleştirilmiştir. Boş disklere Moringa ve Sorbus solüsyonları antibiyotik (ENR ve OX) disk oranları ile aynı miktarda ve toplam 15 µl boş disklere eklenmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyon periyodu sonrasında gelişen zon çapları hesaplanmıştır. Antibiyotik Zone Diameter Table’de belirtilen sınırlar içerisinde değerlendirmeler gerçekleştirilmiştir.

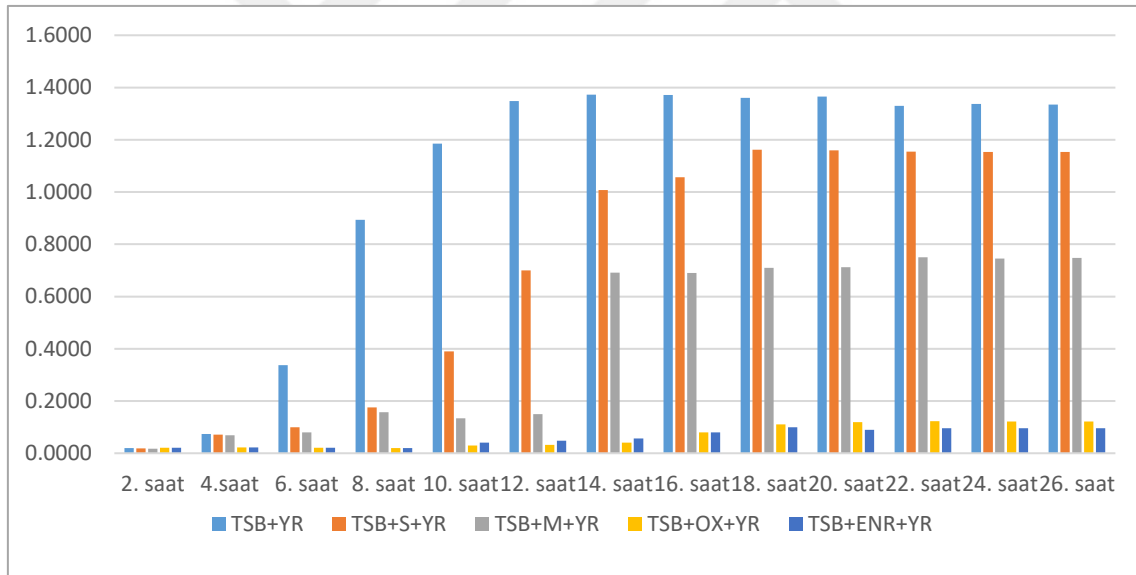


Şekil 4.7. Çalışmada kullanılan antibiyotik ve fitoplanktonları antibiyogram test sonuçları.

ENR ve OX antibiyotikleri antibiyogram testinde MHA besiyerinde 24 mm zone çapına sahip olduğu görülmüştür. Antibiyotik Zone Diameter Table’da bu değer dirençli olarak gözlenirken, *M. oleifera* 11 mm ve *S. domestica* ise 11 mm olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ile *M. oleifera* ve *S. domestica*’nın (11, 9, 8 mm) ENR ve OX’e göre duyarlı oldukları görülmüştür (Şekil 4.7).

#### 4.6. Spektrofotometrik Gelişim Sonuçları

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve fitoplankton ekstraktlarının *Y. ruckeri* izolatlarının sıvı besiyerinde gelişimlerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla oluşturulan 10 grup ile her iki saatte bir 600 nm’deki yoğunlukları (OD) ölçülmüştür. Spektrofotometrik gelişim değerleri kullanılarak elde edilen grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Y. ruckeri* izolatlarının antibiyotik ve fitokimyasal ekli sıvı besiyeri ortamındaki spektrofotometrik gelişim oranları.

\*TSB+Yr:TSB+*Y.ruckeri*\*TSB+S+Yr:TSB+Sorbus+*Y.ruckeri*\*TSM+M+Yr:TSB+Moringa+*Y.ruckeri*  
 \*TSB+OX+Yr:TSB+Oksitetrasiklin+*Y.ruckeri*\*TSB+OX+Yr:TSB+Enrofloksasin+*Y.ruckeri*

Elde edilen grafik doğrultusunda ilk 2 saatlik ölçümlerde TSB besiyerinde kontrol grubu bakteri gelişimi 600 nm’de en yüksek olduğu görülürken OX ve ENR antibiyotiklerinin seviyesinin başlangıçta kontrol grubuna göre etkisinin başlamadığı

görülmüştür. Sorbus ve Moringa eklenmiş gruplarda ise kontrol grubuna göre bakteri gelişiminin daha yavaş (%40-50) olduğu gözlenmiştir. Bakteri gelişiminin TSB+Yr grubunda en yüksek düzeyde olduğu 14 ve 16. saatlerde OX ve ENR antibiyotiklerinin eklendiği gruplarda bu düzeyin 18 ve 20. saatlerde en yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Moringa ve sorbus ekstraktlarının sıvı besiyerindeki etkilerinin katı besiyerindekine (Antibiogram testi) göre daha fazla olduğu görülmüştür. Kendi içlerinde ise Moringa ekstraktının Sorbus ektratına göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Antibiogram testinde duyarlı durumda olan fitokimyasalların sıvı besiyerinde özellikle Moringanın %50 oranında bakterinin gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada diğer birçok alanlarda olduğu gibi su ürünleri sektöründe de bitkilerin farklı şekillerde balıklar üzerinde kullanımı ve etkilerinin araştırıldığı bilimektedir (Yiğitarıslan ve ark., 2011). Bitkilerin ve içerdikleri aktif maddelerin yetiştiricilikte kullanılma olanaklarının belirlenmesi amacıyla yapılan sınırlı sayıdaki araştırmada, yeme ve suya ilave edilen bitki ekstraktlarının yem tüketimi, yemden yararlanma, büyüme ve karkas kalitesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Şimşek ve ark., 2005; Aly ve ark., 2008; Immanuel ve ark., 2009).

Tıbbi bitki ekstraktlarının bazı bakteri ve mantar türleri üzerine antimikrobiyal etkilerinin bulunduğu uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konudur (Kıvanç ve Akgül, 1986). Son yıllarda tıbbi bitkilerin genel hayvansal ve su ürünleri üretiminde yem katkı maddesi, büyümede artış, yem değerlendirmede olumlu sonuçların eldesi, hastalıklardan koruyucu ürünler olarak kullanılması konusunda bazı araştırmalar yapılmıştır (Hammer ve ark., 1999; Görmez, 2012).

*M. oleifera* (Moringaceae) tropik ve subtropik birçok ülkede dağıtılmış, çok değerli bir bitkidir. Besin değerleri yüksek, etkileyici bir tıbbi kullanım yelpazesine sahiptir. Bu bitkinin farklı kısımları önemli minerallerin bir profilini içerir ve iyi bir protein, vitamin, karoten, amino asit ve çeşitli fenolik kaynaklarıdır. Su arıtma güçlerine ve yüksek besin değerine ek olarak, *M. oleifera* tıbbi değerleri için çok önemlidir. Bu bitkinin yaprakları, kökleri, çekirdeği, kabuğu, meyvesi, çiçekleri ve olgunlaşmamış kabukları gibi çeşitli kısımları kalp ve dolaşım uyarıcı olarak işlev görür. Antidiyabetik, hepatoprotektif, antibakteriyel ve antifungal aktiviteler yer alır ve özellikle Güney Asya'da, yerli ilaç sisteminde farklı hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır (Anwar ve ark., 2007; Kenanoğlu, 2016).

Bitkisel ürünler daha kolay temin edilebilmeleri ve ucuz olmaları gibi özelliklerinin yanında bazı bitkilerin bakteriyel, viral, fungal, parazitik etkenlere karşı etki göstermeleri sebebiyle tercih edilmektedirler (Cihangir ve Diler, 2016).

Bakteri, mantar, virüs ve parazit gibi mikroorganizmalar birçok infeksiyöz hastalığın ajanıdır ve bu mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal bileşenler kullanılmaktadır. Bu bileşenlerin sağlık ve çevre güvenliği üzerine çok sayıda yan

etkileri olmasından dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır. Bakteriyel hastalıkların tedavilerinde antibiyotiklerin yoğun bir şekilde kullanılmaları ile balık dokularında rezidü oluşabilmekte ve bunun sonucunda antibiyotiğe direçli patojenlerin gelişimi artmaktadır. Ayrıca antibiyotikler balıkta akümüle olmakta ve hem çevre sağlığı hem de tüketici için potansiyel bir risk oluşturmaktadır (Okmen ve ark., 2012). Tüm bu nedenlerden dolayı günümüzde hastalıklardan korunmada alternatif arayışlar içerisine girilmiştir.

Tıbbi bitkiler ve onlardan elde edilen uçucu yağların antibakteriyel, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar, antiseptik, antioksidan, antiparazitik, antitoksijenik ve insektisidal özelliklere sahip olduğu, yapılan çalışmalarda antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmalar üzerinde de etkili oldukları bildirilmiştir (Yiğitarıslan ve ark., 2011; Bayaz, 2014). Tıbbi bitkiler geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olup bakteri, virüs, maya ve diğer mantarlara karşı etki göstermektedirler. Bugüne kadar tıbbi bitkilerde farmakolojik etkiye sahip 100.000' den fazla biyoaktif bileşen bulunduğu, bu bileşenlerin bir familya için hatta bir cins veya bir tür için bile spesifik olabildiği bilinmektedir. Tıbbi bitkilerin antimikrobiyal etkilerini sentezledikleri biyoaktif bileşikleri aracılığıyla gösterdikleri, etkilerinin ise bu bileşenlerin oranlarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Şahin ve ark., 2004).

Bu çalışmada kullanılan *Y.ruckeri* izolatları mikrobiyolojik testlerde; Gram boyama yönünden *Y. ruckeri* izolatu kristal viyole, lugol alkol ve safranine maruz bırakılması sonucu mikroskopta görülen kırmızı-pembe renkli bakteriler şeklinde Gram negatif olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde bazı araştırmacılar da yaptıkları çalışmalarda Gram boyama sonuçlarında negatif olduğunu belirtmişlerdir (Kubilay, 1997; Okka, 2009). Çalışmada bakterilerin oksidaz özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir petri kutusu içerisine bırakılan steril filtre kağıdına özel olarak alınan oksidaz reagent kiti dökülmüştür ve *Y. ruckeri* izolatuının düzgün kenarlı bir kolonisi alınarak parlament mavisi renk almaması gözlenmesi sonucu negatif sonuç verdiği görülmüştür. *Y. ruckeri* ile gerçekleştirilen birçok çalışmada araştırmacılar aynı sonuçları bildirilmiştir (Tıravoğlu Demirtaş, 2006; Akşit ve Cavit, 2008). Çalışmada kullanılan izolatların katalaz testleri lam üzerinde birkaç damla dökülmüş olan hidrojen peroksid yardımıyla

koloni eklenerek gerçekleştirilmiştir. Katalaz varlığından O<sub>2</sub> açığı çıkmasından dolayı oluşan köpük katalaz pozitif olarak gözlenmiştir. Katalaz testinin aynı metot ile uygulamasının gerçekleştirildiği ve *Y. ruckeri* üzerinde aynı sonuçların alındığı bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Korun ve ark., 2019). İzolatların hareket yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla bir damla PBS damlatılan lamın üzerine sürülen *Y. ruckeri* izolatı mikroskop altında incelenmiş ve bakterilerin Glayding hareketi gösterdikleri görülmüştür. Benzer şekilde bazı araştırmacılar aynı etken üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda benzer sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir (Balta ve Balta, 2016; Koyun ve Şeker, 2017).

Bu çalışmada biyokimyasal testleri yönünden izolatların değerlendirilmesi amacıyla GnA+B (Microgen) kitleri kullanılmıştır. Süspansiyon halindeki *Y. ruckeri* izolatları kit içerisindeki kuyucuklara inoküle edilmesinin ardından 37 °C'de 24 saat inkübe edilmişler ve ardından mikrogen firmasının okuma tablosuna göre sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar Microgen web sitesi programı ile eşleştirilerek biyokimyasal identifikasyonu yönünden % 99,85 *Y. ruckeri* olduğu sonucuna varılmıştır. Bakterilerin biyokimyasal özellik ve farklılıkları mikrobiyolojik çalışmalarda büyük öneme sahiptir. Öyle ki, bakterilerin tür içi farklılıkları aynı bakterilerin biyokimyasal tepkimeleride farklı sonuçlar vermesine sebep olmaktadır (Önalın, 2019). Biyokimyasal testlerin uygulamasında birçok araştırmacı farklı kit ve metotlar kullanarak sonuçlar elde etmişlerdir. Bazı araştırmacılar biyokimyasal testlerin API kitleri ile gerçekleştirdiklerini (Santos ve ark., 1993; Önalın ve Arabacı, 2016), bazı araştırmacılar otomatize sistemlerden BD Phoenix ID (Salomon ve ark., 2005; Muraleedharan ve ark., 2019) ile bazı araştırmacılar ise VITEK (Arias ve ark., 2007; Crowley ve ark., 2012) otomatize sistemi ile *Y. ruckeri* izolatlarının biyokimyasal özelliklerini araştırdıklarını bildirmişlerdir. Günümüzde bakteri identifikasyonunda yeni yaygınlaşan bir yöntem olan ve hassasiyeti çok yüksek olan MALDI\_TOF\_MS ile *Y. ruckeri*'nin identifikasyonun gerçekleştirildiği de bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Popoviç ve ark., 2017). Farklı metotlarla biyokimyasal testlerin gerçekleştirildiği birçok araştırma bulunduğu gibi bu çalışmada kullanılan ve manuel sisteme gerçekleştirilen GnA+B (Microgen) kitlerinin kullanılarak *Y. ruckeri*

biyokimyasal özellik ve farklılıklarının belirlendiği birçok çalışma da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Lutwyche ve ark., 1995; Gülaydın ve ark., 2018).

Morfolojik ve biyokimyasal testler ile bakterilerin özellik ve identifikasyonları gerçekleştirilebilse de günümüzde hassasiyeti ve doğruluk oranı en yüksek metot olarak tanımlanmaktadır. DNA ve RNA etkileşimleri ve dizileri üzerinden gerçekleştirilen bu çalışmalar tanımlama farklılıkların ortaya konulmasında mikrobiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada bakteri izolatlarının moleküler olarak tanımlanması amacıyla Real-Time PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, bakterilerde identifikasyon için sıklıkla kullanılan 16S rRNA genine spesifik universal primerler (27F-1492R) kullanılmıştır. PCR ampliconları ise dizileme sonrası gen bankasından teyid edilmiştir. Bakterilerin identifikasyonunda 16S rRNA geninin kullanıldığı bazı araştırmacılar tarafından bildirilmekle birlikte (Balta ve ark., 2010; Çağatay ve Gümüş, 2018), bazı araştırmacılar ise moleküler idendifikasyonun testi amacıyla PCR yönteminde ompTS, gyrA ,Yer, n-DNA ve p57 geni kullanmıştır (Bastardo ve ark., 2011).

Çalışmada kullanılan fitoplantonların antibiyotik disklerle birlikte kullanılarak antibiyogram testi ile kıyaslamaları gerçekleştirilmiştir. ENR ve OX antibiyotikleri antibiyogram testinde MHA besiyerinde 24 mm zone çapına sahip olduğu görülmüştür. Antibiyotik Zone Diameter Table’da bu değer dirençli olarak gözlenirken, *M. oleifera* 11 mm ve *S. domestica* ise 11 mm olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ile *M. oleifera* ve *S. domestica*’nın (11, 9, 8 mm) ENR ve OX’e göre duyarlı oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda kullanılan antibiyotiklerin *Y. ruckeri* üzerinde dirençli oldukları görülmüştür. *M. oleifera* ve *S. domestica* ekstraktlarının ise Antibiyotiklere göre duyarlı oldukları ancak sıvı solüsyon ve konsantrasyon oranlarının 10 kat sulandırılması göz önünde bulundurulduğunda Antibiyotik toz formları ile aynı şekilde hazırlanacak olan bitki ekstraktlarının aynı oranda etki edebileceği görülmüştür.

Sıvı besiyerinde bakteriyel gelişimlerin değerlendirildiği spektrofotometrik ölçümler sonucunda elde edilen grafik doğrultusunda, ilk 2 saatlik ölçümlerde TSB besiyerinde kontrol grubu bakteri gelişimi 600 nm’de en yüksek olduğu görülürken OX ve ENR antibiyotiklerinin seviyesinin başlangıçta kontrol grubuna göre etkisinin başlamadığı görülmüştür. Sorbus ve Moringa eklenmiş gruplarda ise kontrol grubuna göre bakteri



gelişiminin daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Bakteri gelişiminin TSB+Yr grubunda en yüksek düzeyde olduğu 14 ve 16. saatlerde OX ve ENR antibiyotiklerinin eklendiği gruplarda bu düzeyin 18 ve 20. Saatlerde en yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir. *Y. ruckeri* ile gerçekleştirilen önceki çalışmalarda antibiyogram testinde OX ve ENR'nin bakteriye karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Akhlaghi ve Sharifi, 2008; Bastardo ve ark., 2011). Balık patojenlerine karşı kimyasal koruyuculara ve antibiyotiklere alternatif olabilmeye potansiyelleri nedeniyle bitki uçucu yağlarının antibakteriyel etkileri ile ilgili günümüze kadar pek çok araştırma yapılmıştır (Metin ve ark., 2017). Son yıllarda artan özellikle bakteriyel hastalık etkenlerine karşı sentetik yapıda olan ilaç ve terapötik etkili maddelerin yetersiz kalması farklı tedavi yöntemlerinin kullanılması yönünde çalışmalara sebebiyet vermiştir (Toroğlu ve Çenet, 2006; Çelik ve Çelik 2007). Önceki yapılmış çalışmalarda sulfonamidler ve OX'lerin *Y. ruckeri* üzerine dirençli oldukları bildirilmiştir (Post, 1987). *M. oleifera* ve *S. domestica* ekstraktlarının sıvı besiyerinde (Spektrofotometrik test) bakteriye karşı etkilerinin katı besiyerinde etkilerine (Antibiyogram testi) göre daha fazla olduğu görülmüştür. Kendi içlerinde ise Moringa ekstraktının Sorbus ekstraktına göre daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Antibiyogram testinde duyarlı durumda olan fitokimyasalların sıvı besiyerinde özellikle Moringanın %50 oranında bakterinin gelişimini etkilediği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, izolatların gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketli ve tipik *Y. ruckeri* kolonileri oluşturdukları gözlenmiştir. Microgen ID paneli ile gerçekleştirilen biyokimyasal testler sonrasında %99,85 oranında benzerlik olduğu belirlenmiştir. İzolatların sekans analizi sonrasında 16S rRNA gen bölgesi ile %100 örtüştüğü ve filogenetik analizde izolatların %99 benzer oldukları görülmüştür. Antibiyogram testi sonrasında ENR ve OX antibiyotiklerinin *Y. ruckeri* üzerine dirençli oldukları ancak katı besiyerinde fitokimyasalların etkilerinin daha az olduğu gözlenmiştir. Spektrofotometrik olarak TSB besiyerinde bakteri gelişimine karşı etkilerin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen ölçümler neticesinde ise fitokimyasalların %40-50 oranında bakterinin gelişimini inhibe ettiği gözlenmiştir. Antibiyotik direncinin öneminin her geçen gün artmakta olduğu günümüzde antibiyotik kullanımına alternatif ve ekonomik yönden daha uygun olan bitkilerin tedavide olumlu sonuçlar vereceği kanaatindeyiz.



## KAYNAKLAR

- Akaylı, T., Ürkü, Ç., Özgür, Ç., 2013. Kültür gökkuşağı alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'ından izole edilen gram-negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılığı. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, **6**(2): 17-22.
- Akhlaghi, M., Sharifi Yazdi, H., 2008. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **9**(4): 347-352.
- Akşit, D., Cavit, K., 2008. Gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, walbaum 1792)'nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19**(1): 1-7.
- Altınok, I., Grizzle, J. M., Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org*, **44**: 29–34.
- Altun, S., Kubilay, A., Diler, Ö., 2010. *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **16**(Suppl B): S223-S229.
- Altun, S., Onuk, E. E., Ciftci, A., Büyükekiz, A. G., Duman, M., 2013. Phenotypic, genotypic characterisation and antimicrobial susceptibility determination of *Lactococcus garvieae* strains. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **19**(3): 375-381.
- Aly, S.M., Atti, N. M. A., Mohamed, M. F. 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*, *8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, 277-296.
- Anonim-a, 2018. Üvez nedir faydaları nelerdir. <https://www.saglikaktuel.com/bitki-ansiklopedisi-uvez-nedir-faydolari-nelerdir-1562.htm>. Erişim Tarihi: 25.08.2018. Sata 11:25.
- Anonim-b, 2018. *Moringa oleifera* nedir. <http://www.gazetevatan.com/moringa-oleifera-nedir--998718-saglik/> Erişim Tarihi:25.08.2018. Sata 11:45.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A. H., 2007. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, **21**(1): 17-25.
- Arias, C. R., Olivares-Fuster, O., Hayden, K., Shoemaker, C. A., Grizzle, J. M., Klesius, P. H., 2007. First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. *Journal of Aquatic Animal Health*, **19**(1): 35-40.
- Ateşoğlu, A., 1996. Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarının Kuruluşu ve Özellikleri, *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, **20**: 34.
- Austin, B., Green, M., Rodgers, C. J., 1982. Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*, **27**: 73-78.
- Austin, B., Austin, D. A., 1987. *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. 1st. Ed., Ed. Simon and Schuster, Chichester, UK. : 207-224.
- Austin, B., Austin, D. A., 1999. *Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish*. 3rd (Revised) ed., 457, Praxis Publishing, Chichester, UK.

- Austin, B., Austin, D. A., 2007. *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*, 4. Edition Springer Publishing, New York.
- Baba, E., 2017. Su ürünleri yetiştiriciliğinde bitkisel immunostimulant kullanımı, *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. Tech.*, 7(3): 249-256.
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S., Ozgumus, O. B., 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 30(6): 211-219.
- Balta, F., Balta, Z. D., 2016. Vibrio infection and treatment on the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transferred seawater. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 1(1): 13-20.
- Bastardo, A., Sierralta, V., León, J., Ravelo, C., Romalde, J. L., 2011. Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture*, 317(1-4): 229-232.
- Bayaz, M., 2014. Esansiyel Yağlar: Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 12(3): 45-53.
- Begüm Kenanoğlu, B., 2016. Tohumların çimlendirilmesinde farklı organik ön çimlendirme (ozmotik koşullandırma) uygulamalarının kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2): 124-134.
- Beşe, M., 1974. Mikrobiyolojide kullanılan biyokimyasal testler ve besiyerleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 298.
- Bullock, G. L., Cipriano, R. C., 1990. Enteric Redmouth Disease of Salmonids. *Fish Disease Leaflet*; 82.
- Busch, R. A., 1982. Enteric redmouth disease. "Symposium International de Talloires" 10-12 May., 1982, Les antigenes des micro-organismes pathogenes des poissons. Collection fondation marcel merieux: 201-224.
- Butler, W. R., 2001. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *BSAP Occasional Publication*, 26(1): 133-145.
- Cihangir, E., Diler, İ., 2016. Yavru ve juvenil gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerine farklı oranlarda ilave edilen kekik (*Origanum vulgare*) uçucu yağının büyüme performansı ve yemden yararlanma üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 12(2): 86-96.
- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G. A., Beucher, E., Saiter, J. M., Jouenne, T., 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: *influence of cell and material surface properties*. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 26:373-378
- Crowley, E., Bird, P., Fisher, K., Goetz, K., Boyle, M., Benzinger Jr, M. J., Johnson, R., 2012. Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative (GN) microbial identification test card: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 95(3): 778-785.
- Çağırğan, H., 2007. *Gökkuşağı Alabalığı Hastalıkları*. Doğu Anadolu Kalkınma Bileşeni, 2007.
- Çağırğan, M. İ., Yıldırım, B. M., 1990. Macromutational variability in metric traits of barley. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1-2): 139-152.
- Çağırğan, H., Yürekli Türk, O., 1991. First isolations of *Y. ruckeri* in Turkey. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 4: 1-10.

- Çelik, E., Çelik, G. Y., 2007. Bitki Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, **5** (2): 1-6,
- Davenport, J., Black, K., Burnell, G., Cross, T., Culloty, S., Ekaratne, S., Furness, B., Mulcahy, M., Tretmeyer, H., 2003. *The ecological issues, Aquaculture, Blackwell Publ*, USA, 89.
- Duman, M., 2017. *Gökkuşığı Alabalıklarında Görülen Motil Aeromonas (Aeromonas hydrophila, A. sobria, A. caviae), Y. ruckeri ve L. garvieae Bakterilerinin Antimikrobiyal Duyarlılıkları Ve Duyarlılıkta Rol Oynayan Genlerin Tespiti* (doktora tezi). Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nilüfer, Bursa.
- Erdoğan, A. E., Everest, A., 2013. Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2): 27-32.
- Ergönül, M. B., Yavuzcan, H., Altindag, A., 2012. Balık Sağlığı Ve Immunostimulanların Kullanımı/Fish Health and the Use of Immunostimulants. *Journal of Fisheries Sciences. com*, **6**(3): 188.
- Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J., Fanning, G. R., 1978. *Yersinia ruckeri sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 37-44.
- Furones, D. M., Gilpin, L. M., Munn, B. C., 1993. *Culture media for the differentiation of isolates of Yersinia ruckeri, based on detection of a virulence factor, J Bacteriol*, **74**: 360-366.
- Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Cutuli, M. T., Domenech, A., Dominguez, L., Fernández-Garayzabal, J. F., 1999. *Development of a PCR Assay for Detection of Yersinia ruckeri in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout. Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(1): 346-350.
- Görmez, Ö., 2012. *Saprolegnia Türlerine Karşı Bazı Tıbbi Bitkilerin Esansiyel Yağlarının Antifungal Aktivitesi* (lisans tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çünür, Isparta.
- Görmez, Ö., Diler, Ö., 2017. Balık patojenlerine karşı bazı bitkisel uçucu yağların antibakteriyel aktivitesi. *Yalvaç Akademi Dergisi*, **2**(1): 112-122.
- Green, M., Austin, B., 1983. The Identification of Yersinia ruckeri and its Relationship to Other Representatives of the Enterobacteriaceae. *Aquaculture*, **34**: 185-192.
- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø., 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **72**(1-2): 203-212.
- Gulaydin, O., Ozturk, C., Onalan, S., Karapinar, Z., Arabaci, M., Ekin, I. H., Ilhan, F., 2018. *The Investigation of The Presence of Some Bacterial and Viral Agents In Pearl Mullet (Chalcalburnus tarichii, Pallas 1811) By Real-Time PCR and The Histopathological Examination.* Feb-Fresenius Environmental Bulletin, 8286.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., 1999. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts. *Journal of Applied Microbiology*, **86**: 985-99.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Kim, M. C., Kim, J. S., Han, Y. J., Heo, M. S., 2010. Effect of a mixed herb-enriched diet on the innate immune response and disease resistance of Paralichthys olivaceus against Philasterides dicentrarchi infection. *J. Aquat. Animal Health.*, **22**: 235-243.

- Hatha, M., Vivekanandhan, A. A., Joice, G. J. Christol., 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, **98**: 131–134.
- Horne, M. T., Barnes, A. C., 1999. *Enteric redmouth disease (Yersinia ruckeri)*.
- Immanuel, G., Uma, R. P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Punitha Peter, S. M., Michael Babu, M., Palavesam, A., 2009. Yemary Medicinal Plant Extracts Improve Growth, Immune Activity and Survival of Tilapia *Oreochromis mossambicus*, *Journal of Fish Biology*, **74**: 1462-1475.
- Kahraman, Ü. Ç., 2013. *Yersiniosis Hastalığından Korunmanın Yeni Yolu: Canlı Aşı* (yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Merkez, Trabzon.
- Karataş Düğenci, S., Candan, A., 1997. Marmara bölgesindeki bir gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) işletmesinde yersiniozis vakası. *IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*. (17–19 Eylül 1997). Eğirdir/Isparta, 641-648.
- Kayis, S., Capkin, E., Altinok, I., Balta, F., 2009. Bacteria and bacterial diseases of rainbow trout in the Southern Black Sea Region of Turkey - A Survey, *The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh*, **61**(4): 341-346.
- Kıvanç, M., Akgül, A., 1986. Antibacterial Activities of Essential Oils from Turkish Species and Citrus. *Flavour and Fragrance Journal*, **1**: 175-179.
- Korun, J., Okudan, E. Ş., Yardımcı, R. E., Timur, G., Ulutaş, A., Gökoğlu, M., Balcı, B. A., 2019. Bazı deniz alg türlerinin etanol ve metanol ekstraktlarının antibakteriyel aktivitelerinin *Yersinia ruckeri* üzerinde araştırılması. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, **12**(3): 1-1.
- Koyun, M., Şeker, E., 2017. Keban baraj gölü pertek bölgesinde (5. Bölge) yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Solungaçlarındaki bakteriyel floranın incelenmesi. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **29**(1): 21-25.
- Kubilay, A., 1997. *Gökkuşuğu Alabalıklarında (Oncorhynchus Mykiss) Patojen Bakteri Yersinia ruckeri'ye Karşı Antikor Üretimi Ve Tespiti Üzerinde Bir Araştırma* (doktora tezi). Fen Bilimleri Enstitüsü, Süleyman Demirel Üniversitesi, Çünür, Isparta.
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırkan, Ş., Sekkin, S., 2004. Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Enterococcus seriolicida izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. *Vet. Hek. Dern. Derg.*, **75**: 47-53.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary research*, **46**(1): p.103.
- Lasee, B. A., 1995. *Introduction to Fish Health Management*, U.S. fish and wildlife service la crosse fish health center 555, Lester Avenue Onalaska, Wisconsin, 54650.
- Lutwyche, P., Exner, M. M., Hancock, R. E., 1995. A conserved aeromonas salmonicida porin provides protective immunity to rainbow trout. *Infection And Immunity*, **63**(8): 3137-3142.
- Metin, S., Didinen, B. I., Mercimek, E. B., Ersoy, A. T., 2017. Bazı bakteriyel balık patojenlerine karşı bazı bakteriyel uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitesi. *Yunus Araştırma Bülteni*, **1**: 59-69.

- Muraleedharan, C., Talreja, D., Kanwar, M., Kumar, A., Walia, S. K., 2019. Occurrence Of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing Bacteria In Urban Clinton River Habitat. *Journal Of Global Antimicrobial Resistance*, **16**: 225-235.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C. M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. *Effect of Aquaculture on World Fish Supplies*. *Nature*, **405**: 1017-1024.
- Okka, S., 2009. *Denizli Yöresindeki Alabalık İşletmelerinde Yersinia ruckeri Varlığının Araştırılması* (yüksek lisans tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Efeler, Aydın.
- Okmen, G., Uğur, A., Sarac, N., Arslan, T., 2012. In vivo and in vitro antibacterial activities of some essential oils of Lamiaceae species on *Aeromonas salmonicida* isolates from cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **11**(15): 2762-2768.
- Önalın, Ş., Arabacı, M., 2016. Van, Bitlis, Muş ve Hakkari illerinde bulunan gökkuşuğı alabalığı çiftliklerinden elde edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarının fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi (doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tuşba, Van.
- 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, IJA*, **7**(1): 1597.
- Önalın, Ş., Yavuz, H. İ., 2019. Nanopartikül içerikli sıvı besiyerlerinde *Lactococcus garvieae* izolatlarının gelişim farklılıklarının spektrofotometrik olarak belirlenmesi. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **5**(1): 6-15.
- Popović, N. T., Kazazić, S. P., Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, R., 2017. Differentiation Of Environmental Aquatic Bacterial Isolates By MALDI-TOF MS. *Environmental research*, **152**: 7-16.
- Post, G., 1987. *Enteric redmouth disease Yersiniosis*. In: *Textbook of Fish Health* (ed. by G. Post), pp. 47-51. THF Publications, Neptune City, New Jersey, USA.
- Rintamaki, P., Voltanen, E. T., Frerichs, G.N., 1986. Occurrence of *Yersinia ruckeri* Infection in Farmed Whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *C. muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Northern Finland. *Journal of Fish Diseases*, **9**: 137-140.
- Rodgers, C. J., 1992. Development of a Selective-Differential Medium for the Isolation *Yersinia ruckeri* and its Application in Epidemiological Studies. *Journal of Fish Diseases*, **15**: 243-254.
- Ross, A. J., Rucker, A. R., Ewing, W. H., 1966. Description of a Bacterium Associated with Redmouth Disease of Rainbow Trout (*Salmo gaidneri*). *Can. J. Microbiol.*, **12** : 763-770.
- Sağlam, Y. S., Nurettin, I. Ş. I. K., Arslan, A., Hüdaverdi, E. R. E. R., 2006. Erzurum bölgesindeki gökkuşuğı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* w. 1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* izolasyonu ve patolojik incelemeler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, **1**(1): 6-10.
- Salomon, J., Smith, E., Hansen, T., White, V., Gresock, T., Williams, W., Reuben, J. 2005. Identification of Gram-Negative Bacilli in BD Phoenix™ Using the New Low Inoculum Mode. In *15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID), Copenhagen*.

- Santos, Y., Romalde, J. L., Bandin, I., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J. L., Toranzo, A. E., 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, **116**(2-3): 111-120.
- Scholz, T. (1999). Parasites in cultured and feral fish. *Veterinary parasitology*, **84**(3-4): 317-335.
- Stevenson, R., Flett, D., Raymond, B. T., 1993. *Enteric redmouth (ERM) and other enterobacterial infections of fish*. Bacterial diseases of fish, 80-105
- Şahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, M., Polissiou, M., Agar, G., Özer, H., 2004. Biological Activities of the Essential Oils and Methanol Extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Food Control*, **15**: 549-557.
- Şimşek, Ü. G., Güler, T., Çiftçi, M., Ertaş, O. N., Dalkılıç, B., 2005. Esans yağ karışımının (kekik, karanfil ve anason) broylerlerde canlı ağırlık, karkas ve etlerin duyuşal özellikleri üzerine etkisi. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16**(2): 1-5.
- Tanrıkul, T. T., Çağırğan, H., Tokşen, E., 1996. Bakteriyel balık hastalıkları. *Vet. Kontr. ve araşt. Enst. Md. Derg.*, **34**: 105-1
- Tıravoğlu Demirtaş, Y., 2006. *Gökkuşuğı Alabalıklarında Enterik Kızılağız Hastalığına Karşı Y. ruckeri Serotip I ve Saha Suşlarından Hazırlanan Monovalan Ve Polivalan Aşuların Bağışıklık Güçlerinin Karşılaştırmalı İncelenmeleri* (doktora tezi). Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Efeler, Aydın.
- Timur, G., Timur, M., 1985. Eğirdir gölü sudak (*stizostedion lucioperca* l. 1758) balıklarında yüksek mortaliteye neden olan bakteriyel hemorajik septisemi hastalığı üzerinde bir araştırma, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **32**: 33-41.
- Timur, G., Timur M., 1991. An outbreak of enteric redmouth diseases rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **11** (5): 181-182.
- Timur, M., Timur, G., 2003. *Balık Hastalıkları Kitabı*, TC. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Rektörlük Yayın No: 4426, Su Ürünleri Yayın No: 5, 238, İstanbul.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K., 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of fish diseases*, **30**(5): 257-268.
- Toranzo, A. E., Magarinos, B., Romalde, J. L., 2005. *A Review of The Main Bacterial Fish Diseases in Mariculture Systems*, *Aquaculture*, **246**, 37-61.
- Toroğlu, S., Çenet, M., 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar, *KSÜ Fen ve Müh Derg.*, **9** (2): 12-20.
- Uluköy, G., Baba, E., Sayın, Z., 2013. *Listonella anguillarum* ve *Y. ruckeri* balık patojenleri üzerine mantar ve bitki ekstraktlarının in vitro antibakteriyel aktivitesinin. *Su Ürünleri Dergisi*, **28**(2): 119-134.
- Yiğitarıslan, K. D., Azdural, K., Yavuz, U., Turan, F., 2011. Alabalıklarda fitoterapi uygulamaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **4** (1): 63-68.



## EKLER

### Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)  
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE  
APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı Bazı fitokimyasalların *Yersinia ruckeri* üzerine etkileri ve antimikrobiyal direnç durumlarının araştırılması

Title of the Research Investigation of antimicrobial resistant and effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri*

Araştırmacı(lar) Yürütücü / Chief investigator: Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN  
Investigator(s) Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Mustafa ÇEVİK (YL Öğrencisi)

Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research:

Tür / species: Bakteri (*Yersinia ruckeri*) Sayı / Numbers:

Yaş / Age: Cinsiyet / Sex:

Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 15.11.2018

Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: 15.11.2019

Dosya no / File no:

#### Karar:

Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmektedir. Tarih: 06/01/2018; Karar no: 24/08

#### Decision:

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 06 / 01 / 2018 Decision number: 24/08

	<b>BAŞKAN/CHAIR</b>  Prof. Dr. Semiha DEDE	
<b>ÜYE</b>  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	<b>ÜYE</b> Prof. Dr. Sıddık KESKİN	<b>ÜYE</b> Prof. Dr. Suphi DENİZ
<b>ÜYE</b> Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	<b>ÜYE</b>  Doç. Dr. Atilla DÜRMÜŞ	<b>ÜYE</b>  Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
<b>ÜYE</b>  Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	<b>ÜYE</b> Dr. Öğr. Ü. Oruc ALLAHVERDİYEV	<b>ÜYE</b>  Dr. Öğr. Ü. Canser Yılmaz DEMİR
<b>ÜYE</b>  Dr. Öğr. Ü. Hacer ŞAHİN AYDINYURT	<b>ÜYE</b> Dr. Öğr. Ü. Şükrü ÖNALAN	<b>ÜYE</b>  Vet. Hek. Kerem ÖGRAK
<b>ÜYE</b>  Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	<b>ÜYE</b> Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	



## ÖZ GEÇMİŞ

1982 yılında Samsun'un 19 Mayıs ilçesinde Dünyaya geldi. 1987-1998 yılları arasında İlk, Orta ve Lise öğrenimini 19 Mayıs ilçesinde tamamladı. 1999 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi'ne bağlı Sinop Su Ürünleri Fakültesi'ni kazanarak 2003 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldu. 2003-2004 yılları arası askerlik görevini yedek subay olarak tamamladı. Akabinde, 2005-2007 yılları arası özel balık çiftliklerinde Su Ürünleri Mühendisi olarak görev yaptı. 2007 yılında Polis Meslek Eğitim Merkezi'ni kazanarak 2008 yılında polis memuru olarak İstanbul Emniyet Müdürlüğü'nde göreve başladı ve 2013 yılına kadar görev yaptı. 2013 yılında Van İl Emniyet Müdürlüğü kadrosuna geçti. 2016 yılında kurumlar arası naklen geçiş ile Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'ne memur olarak geçiş yaptı. 2019 yılından beri Su Ürünleri Fakültesi'nde Su Ürünleri Teknikeri olarak görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.