

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Lactococcus garvieae'DE BAZI VİRÜLANS GENLERİNİN
TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Aycan ULUTAŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MART 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Lactococcus garvieae*'DE BAZI VİRÜLANS GENLERİNİN
TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Aycan ULUTAŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MART 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Lactococcus garvieae*'DE BAZI VİRÜLANS GENLERİNİN
TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

**Aycan ULUTAŞ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından FYL-
2020-5378 nolu proje ile desteklenmiştir.**

MART 2022

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Lactococcus garvieae*'DE BAZI VİRÜLANS GENLERİNİN
TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Aycan ULUTAŞ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/03/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Jale KORUN (Danışman)

Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Doç. Dr. Remziye Eda YARDIMCI

ÖZET

***Lactococcus garvieae*'DE BAZI VİRÜLANS GENLERİNİN TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Aycan ULUTAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Jale KORUN

Mart 2022; 58 sayfa

Bu çalışmanın amacı *Lactococcus garvieae* suşlarının fenotipik ve moleküler düzeyde tanımlanarak suşlarda bazı virülans genlerinin bulunup bulunmadığının ortaya koyulmasıdır. Çalışmada 10 *L. garvieae* suşunun PZR tekniği kullanılarak yapılan tanımlamasında PLG ve SA1B10 primerleri kullanılmıştır. Virülans genlerinin tespitinde adezin Pav (*adhPav*), adezin PsaA (*adhPsaA*), LPXTG içeren yüzey proteinleri 1-2-3-4 (*LPXTG-1*, *LPXTG-2*, *LPXTG-3*, *LPXTG-4*), hemolizin 1-2-3 (*hlyI*, *hlyII*, *hlyIII*) genleri, süperoksit dismutaz (SOD) ve fibronektin bağlayıcı protein (*fbp*) genlerini hedef alan primer çiftleri kullanılmıştır. Virülans genlerinin tespitine ek olarak suşların antimikrobiyal duyarlılığı da araştırılmıştır. Antibiyogram test sonuçlarına göre suşların hepsinin oksasilline dirençli olduğu ancak enrofloksasine ise duyarlı olduğu bulunmuştur. Suşların oksasillin ve enrofloksasin dışındaki diğer antibiyotiklere olan duyarlılık ve direnç durumları ise suşlara göre değişiklik göstermiştir. Çalışmada kullanılan tüm *L. garvieae* suşlarının *hlyII*, *hlyIII*, adezin Pav (*adhPAV*), adezin PsaA (*adhPsaA*) genlerini taşıdığı tespit edilmiştir. Bazı suşlarda *LPXTG-1*, *LPXTG-3*, *hlyI*, SOD ve *fbp* genleri tespit edilemezken, tüm suşların ise *LPXTG-2* ve *LPXTG-4* genlerini taşımadığı bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: *Lactococcus garvieae*, Laktokokkozis, Virülans gen, Antibiyogram

JÜRİ: Prof. Dr. Jale KORUN

Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Doç. Dr. Remziye Eda YARDIMCI

ABSTRACT

A STUDY ON THE DETECTION OF SOME VIRULANCE GENES IN *Lactococcus garvieae*

Aycan ULUTAŞ

MSc Thesis, Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Jale KORUN

March 2022; 58 pages

This aim of this study is to identify *Lactococcus garvieae* strains at the phenotypic and molecular level to determine whether some virulence genes are present in the strains. The PLG and the SA1B10 primer pairs were used in the identification of the 10 *L. garvieae* strains using PCR technique. Surface proteins containing adhesin Pav (*adhPav*), adhesin PsaA (*adhPsaA*), LPXTG-containing 1-2-3-4 (*LPXTG-1*, *LPXTG-2*, *LPXTG-3*, *LPXTG-4*), hemolysin 1-2-3 (*hlyI*, *hlyII*, *hlyIII*) genes, superoxide dismutase (SOD), and fibronectin-binding protein (*fbp*) genes were used. In addition to the detection of virulence genes, antimicrobial sensitivity of the strains was also investigated. According to the antibiogram test results, all strains were found to be oxacillin resistant but sensitive to enrofloxacin. The susceptibility and resistance of the strains to other antibiotics except oxacillin and enrofloxacin varied according to the strains. It was determined that all *L. garvieae* strains used in the study carried hemolysin 1-2-3 (*hlyI*, *hlyII*, *hlyIII*) genes, adhesin Pav (*adhPav*) and adhesin PsaA (*adhPsaA*) genes. Some strains were not detected *LPXTG-1*, *LPXTG-3*, *hlyI*, SOD and *fbp* genes while not all strains were found to carry the *LPXTG-2* and *LPXTG-4* genes.

KEYWORDS: *Lactococcus garvieae*, Lactococcosis, Virulence gene, Antibiogram

COMMITTEE: Prof. Dr. Jale KORUN

Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU

Assoc. Prof. Dr. Remziye Eda YARDIMCI

ÖNSÖZ

Balık yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların önemi fazladır. Balık hastalıkları, yetiştiricilik faaliyetlerini sınırlayan etmenler arasında yer almaktadır. Yetiştiricilik sırasında işletmelerde görülen hastalıklar popülasyonları etkileyerek ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalıklarla baş etmenin en iyi yolu hem bulaşıcı hem de bulaşıcı olmayan salgınları kontrol etmektir. Ayrıca hastalıkların doğru teşhis edilmesi ve tedavinin ekonomik olması gerekmektedir.

Yapılan bu tez çalışması ile laktokokkosiz hastalığına neden olan *Lactococcus garvieae* suşlarında bazı virülans genlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonunda elde edilen verilerin aşı ve ilaç gelişimine yardımcı olması hedeflenmiştir.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımlarından, bilgi birikiminden ve hoşgörüsünden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Jale KORUN'a teşekkür ederim. Bilgisini benden esirgemeyen ve tez çalışmam boyunca yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU'na teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmaları sırasında yardımını esirgemeyen Mikrobiyolog Erbülent ALTAN'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

Tez yazımı boyunca her türlü yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen Metin KAYABAŞI'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	5
2.1. Laktokokkozis.....	5
2.1.1. Etiyolojisi.....	5
2.1.2. Epizootiolojisi	7
2.1.3. Klinik ve nekropsi bulguları	7
2.1.4. Hastalığın bulaşması	7
2.1.5. Kontrol ve tedavi.....	8
2.2.1. Bakteri patojenitesi.....	9
2.2.2.1. <i>L. garvieae</i> 'de adezyon virülans genleri	10
2.2.2.2. <i>L. garvieae</i> 'de hemolizin virülans genleri	12
2.2.2.3. <i>L. garvieae</i> 'nin diğer virülans genleri	12
3. MATERYAL VE METOT.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları	14
3.1.2. Çalışmanın yapıldığı yer.....	14
3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	15
3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	15
3.1.5. Çalışmada kullanılan ticari kitler	15
3.1.6. Çalışmada kullanılan antibiyotikler	16
3.2. Metot	16
3.2.1. <i>L. garvieae</i> 'nin Morfolojik ve Hareket Özelliklerinin Tespiti	16
3.2.2. <i>L. garvieae</i> 'nin Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi	17
3.2.2.1. Bakteri suşlarının katalaz üretimi.....	18

3.2.2.2. Bakteri suşlarının sitokrom oksidaz üretimi	18
3.2.2.3. Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) testi.....	18
3.2.2.4. İndol üretimi	19
3.2.2.5. Metil kırmızısı-Voges Proskauer (MR-VP) testi	19
3.2.2.6. MacConkey agarda gelişme	19
3.2.2.7. Nişasta hidrolizi	19
3.2.2.8. Nitrat redüksiyon testi	20
3.2.2.9. Sitrat üretimi	20
3.2.2.10. Hidrojen sülfid üretimi (H ₂ S)	20
3.2.2.11. Jelatin hidrolizi.....	20
3.2.2.12. Beta Galaktosidase (ONPG) üretimi	21
3.2.2.13. Aminoasit dekarboksilaz ve dihidrolaz testi.....	21
3.2.2.14. Karbonhidrat fermantasyon testi.....	22
3.2.2.15. Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme	22
3.2.2.16. Tuzluluk tolerans testi	22
3.2.3. <i>L. garvieae</i> 'den DNA İzolasyonu	22
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	23
3.2.5. <i>L. garvieae</i> 'de Virülans Genlerinin Tespiti	23
3.2.6. Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntüleme	24
3.2.7. Antibiyotik duyarlılık testi.....	25
3.2.7.1. Standart disk difüzyon yöntemi	25
4. BULGULAR	26
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşlarının Fenotipik Bulguları	26
4.1.1. Bakteri suşlarının koloni morfolojilerine ait bulgular	26
4.1.2. Bakteri suşlarının hücre morfolojilerine ait bulgular	26
4.1.3. Bakteri suşlarının hareket özelliklerine ait bulgular	27
4.1.4. Bakteri suşlarının biyokimyasal özelliklerine ait bulgular	27
4.2. <i>L. garvieae</i> Suşlarının Antibiyogram Testi Bulguları.....	35
4.3. Moleküler Çalışma Bulguları	39
4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) bulguları	39
4.3.2. Virülans Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bulguları.....	40
4.3.2.1. Adezyon virülans genleri bulguları	40

4.3.2.2. Hemolizin virölans genleri bulguları.....	44
4.3.2.3. Diğer virölans genlerinin bulguları	45
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR.....	53
7. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Lactococcus garvieae*’de Bazı Virülans Genlerinin Tespiti Üzerine Bir Çalışma” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/03/2022

Aycan ULUTAŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
g	: Gram
ddH ₂ O	: Çift distile saf su
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
pH	: Maddenin asitlik ya da bazlık ölçüsü
μ g	: Mikrogram
UV	: Ultra Viyole
°C	: Derece
%	: Yüzde

Kısaltmalar

ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BHIA	: Beyin-Kalp Infuzyon Buyyonu
BHIA	: Beyin-Kalp Infuzyon Agar
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Hücre Dışı Matris
EDTA	: EtilenDiamin Tetraasetik Asit
LAB	: Laktik Asit Bakterileri
LPS	: Lipopolisakkarid
LPXTG	: Leu-Pro-any-Thr-Gly
MR-VP	: Metil Red-Voges Proskauer

NA	: Nurient Agar
NB	: Nutrient Buyyonu
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NOX	: NADPH oksidazlar
ONPG	: Beta Galaktosidaz
O/F	: Oksidasyon ve/veya Fermentasyon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı
rRNA	: Ribozomol RNA
PG	: Fosfoglukomutaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBE	: Tris-Borat-EDTA tamponu
TUİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Buyyonu
TSIA	: Triple Sugar Iron Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. LPXTG motifine sahip protein yapısı (Comfort ve Clubb 2004; Call ve Klaenhammer 2013)	11
Şekil 3.1. Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı	14
Şekil 3.2. Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı	15
Şekil 4.1. <i>L. garvieae</i> suşuna ait 0.5-1.0 mm çapında küçük kolonilerin görüntüsü	26
Şekil 4.2. <i>L. garvieae</i> suşunun Gram boyama sonrası ışık mikroskobunda görüştüsü (100X büyütme).....	27
Şekil 4.3. <i>L. garvieae</i> suşunun sitokrom oksidaz test sonucu (negatif reaksiyon).....	28
Şekil 4.4. Bakteri suşunun katalaz enzim aktivitesi (negatif reaksiyon)	29
Şekil 4.5. O/F besiyerinde fermentatif bakteri suşu	29
Şekil 4.6. Kanlı vasatta alfa (α) hemoliz oluşumu	30
Şekil 4.7. Voges-Proskauer pozitif reaksiyon sonucu	30
Şekil 4.8. Metil kırmızısı pozitif reaksiyon sonucu	31
Şekil 4.9. Nitrat indirgenme negatif reaksiyon sonucu	31
Şekil 4.10. İndol test sonucu (negatif reaksiyon)	32
Şekil 4.11. MacConkey agarda negatif üreme	32
Şekil 4.12. Suşların jelatin hidroliz sonuçları (a:buzda bekletme b:negatif reaksiyon sonucu	33
Şekil 4.13. Farklı tuzluluk derecelerinde gelişme (a:%0, b:%2, c:%4 d:%6, e:%8)	33
Şekil 4.14. Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik hassasiyetinin belirlenmesi	37
Şekil 4.15. <i>L. garvieae</i> 'nin antibiyotiklere karşı gösterdiği dirençlilik	37
Şekil 4.16. <i>L. garvieae</i> suşlarının PLG primerleri ile tanımlanması	39
Şekil 4.17. SA1B10 primer çifti kullanılarak yapılan PZR çalışması	40
Şekil 4.18. AdhesinPav virülans geninin tespit edildiği <i>L. garvieae</i> suşları	41
Şekil 4.19. AdhesinPsaA virülans geninin varlığının tespit edildiği <i>L. garvieae</i> suşları	41
Şekil 4.20. LPXTG-1 geni için yapılan PZR sonuçları	42
Şekil 4.21. LPXTG-2 geni için yapılan PZR sonuçları	42

Şekil 4.22. <i>LPXTG-3</i> genin tespiti için yapılan PZR çalışmasının sonuçları	43
Şekil 4.23. <i>LPXTG-4</i> virülans geni için yapılan PZR çalışması	43
Şekil 4.24. Hemolizin-1 (<i>hlyI</i>) için PZR sonuçları	44
Şekil 4.25. Hemolizin-2 (<i>hlyII</i>) geni için PZR sonuçları	44
Şekil 4.26. Hemolizin-3 (<i>hlyIII</i>) geni için yapılan PZR sonuçları	45
Şekil 4.27. Süperoksit dizmutaz (SOD) geninin varlığının tespiti için yapılan PZR sonuçları	46
Şekil 4.28. Fibronektin bağlayıcı protein (<i>fbp</i>) geninin tespiti için yapılan PZR sonuçları	46



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Deniz ve İçsu yetiştiricilik üretim miktarları.....	2
Çizelge 1.2. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan balık türlerinin üretim miktarı.....	2
Çizelge 2.1. <i>L. garvieae</i> ’nin fenotipik özellikleri	6
Çizelge 3.1. PZR reaksiyon bileşenleri.....	23
Çizelge 3.2. <i>L.garvieae</i> ’nin tanımlanmasında kullanılan primerler	23
Çizelge 3.3. Virülans genlerinin tespiti için kullanılan primer çiftleri	24
Çizelge 3.4. TBE tamponunun hazırlanışı	25
Çizelge 3.5. 0.5 M EDTA’nın hazırlanışı	25
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan <i>L. garvieae</i> suşlarına ait fenotipik özellikler.....	34
Çizelge 4.2. <i>L. garvieae</i> suşlarının antibiyogram testi sonuçları	36
Çizelge 4.3. <i>L. garvieae</i> suşlarında <i>adhPav</i> , <i>adhPsaA</i> , SOD, <i>hlyI</i> , <i>hlyII</i> , <i>hlyIII</i> , <i>LPXTG-1</i> , <i>LPXTG-2</i> , <i>LPXTG-3</i> , <i>LPXTG-4</i> , <i>fbp</i> virülans genlerinin varlığı	47

1. GİRİŞ

Balık hastalıkları, balık üretim kapasitesini sınırlayan nedenler arasında yer alır. Üretim sırasında işletmelerde görülen hastalıklar balık popülasyonunu etkileyerek ekonomik kayıplara neden olur. Normal koşullar altında balıklar, çevre ve patojenler arasında sabit bir denge vardır. Bu dengenin bozulması durumunda hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Hastalıkların ortaya çıkmasında predatör türler, patojenler, besinler, zehirler, stok yoğunluğu, balığın yaşı, birleşik amonyak, nitrit, pestisitler ve/veya ağır metallerle kronik maruz kalma, yetersiz oksijen, yüksek konsantrasyonlarda karbondioksit (CO₂), pH, su sıcaklığında dalgalanmalar, tuzluluk, kirlilik ve balıkçılık faaliyetleri yer almaktadır (Plumb ve Hanson 2011).

Ülkemiz’de yetiştiricilik faaliyetleri 1970’li yıllarda sazan (*Cyprinus carpio*) ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kültürü ile başlamış olup, 1980’li yıllardan itibaren Ege ve Akdeniz’de Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) yetiştiriciliği ile devam etmiştir. 1990’lı yıllarda ise gökkuşağı alabalığının denizde kafes sistemlerinde büyütme çalışmaları popülerlik kazanmıştır (Dirican vd. 2009).

Tarım ve Orman Bakanlığı Su Ürünleri istatistiklerine göre, yetiştiricilik yoluyla üretim 2000 yılında denizde 35646 ton, iç suda 43385 ton olmak üzere yıllık üretim 79031 ton olmuştur. 2005 yılında ise denizdeki üretim miktarı 69673 ton iken iç sudaki üretim miktarı 48604 ton ile toplam üretim 118277 ton olmuştur. Yetiştiricilik yolu ile denizdeki üretim miktarı 2010 yılında 88573 tona ulaşmıştır. İç sularda yetiştiricilik yoluyla üretim 2010 yılında 78568 ton iken bu miktar 2020 yılında iç sularda 128236 ton denizdeki üretim miktarı 293175 tona ulaşarak toplam üretim miktarı 421411 tona ulaşmıştır (TÜİK 2021) (Çizelge 1.1).

Türkiye’de yetiştiriciliği en çok yapılan türlerin üretim miktarlarına bakıldığında 2000 yılında iç sularda alabalık üretimi 42572 ton iken denizde çipura üretimi 15460 ton, levrek üretimi ise 17877 ton olmuştur. 2010 yılına gelindiğinde ise iç sularda alabalık üretimi 100239 ton, denizde çipura üretimi 28157 ton, levrek üretimi ise 50796 tona ulaştığı bildirilmiştir (Çizelge 1.2). 2020 TÜİK verilerine göre iç sularda alabalık üretimi 126101 ton, çipura üretimi 109749 ton, levrek üretimi ise 148907 ton olmuştur (TÜİK 2021).

Çizgelge 1.1. Deniz ve İçsu yetiştiricilik üretim miktarları (TÜİK 2021)

Yıllar	Yetiştiricilik Üretimi				TOPLAM (ton)
	Deniz (ton)	Toplamdaki Payı (%)	İçsu (ton)	Toplamdaki Payı (%)	
2000	35.646	45,1	43.385	54,9	79.031
2001	29.730	44,2	37.514	55,8	67.244
2002	26.868	43,9	34.297	56,1	61.165
2003	39.726	49,7	40.217	50,3	79.943
2004	49.895	53,1	44.115	46,9	94.010
2005	69.673	58,9	48.604	41,1	118.277
2006	72.249	56,0	56.694	44,0	128.943
2007	80.840	57,8	59.033	42,2	139.873
2008	85.629	56,3	66.557	43,7	152.186
2009	82.481	52,0	76.248	48,0	158.729
2010	88.573	53,0	78.568	47,0	167.141
2011	88.344	46,8	100.446	53,2	188.790
2012	100.853	47,5	111.557	52,5	212.410
2013	110.375	47,3	123.018	52,7	233.393
2014	126.894	54,0	108.239	46,0	235.133
2015	138.879	57,8	101.455	42,2	240.334
2016	151.794	59,9	101.601	40,1	253.395
2017	172.492	62,4	104.010	37,6	276.502
2018	209.370	66,6	105.167	33,4	314.537
2019	256.930	68,8	116.426	31,2	373.356
2020	293.175	69,6	128.236	30,4	421.411

Çizgelge 1.2. Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan balık türlerinin üretim miktarı (TÜİK 2021)

Yıllar	Alabalık			Çipura	Levrek
	İçsu	Deniz	Toplam		
2000	42.572	1.961	44.533	15.460	17.877
2001	36.827	1.240	38.067	12.939	15.546
2002	33.707	846	34.553	11.681	14.339
2003	39.674	1.194	40.868	16.735	20.982
2004	43.432	1.650	45.082	20.435	26.297
2005	48.033	1.249	49.282	27.634	37.290
2006	56.026	1.633	57.659	28.463	38.408
2007	58.433	2.740	61.173	33.500	41.900
2008	65.928	2.721	68.649	31.670	49.270
2009	75.657	5.229	80.886	28.362	46.554
2010	78.165	7.079	85.244	28.157	50.796
2011	100.239	7.697	107.936	32.187	47.013
2012	111.335	3.234	114.569	30.743	65.512
2013	122.873	5.186	128.059	35.701	67.913
2014	107.983	5.610	113.593	41.873	74.653
2015	101.166	6.872	108.038	51.844	75.164
2016	101.297	5.716	107.013	58.254	80.847

Çizelge 1.2.'nin devamı

2017	103.705	5.952	109.657	61.090	99.971
2018	104.887	9.610	114.497	76.680	116.915
2019	116.053	9.692	123.573	99.730	137.419
2020	126.101	18.182	144.182	109.749	148.907

Balıklarda bildirilen bakteriyel patojenlerin sayıca fazla olmasına karşın dünya genelinde kültürü yapılan balık türlerinde yaşanan kayıpların *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Piscirickettsia*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Vibrio*, ve *Tenacibaculum* gibi Gram-negatif bakteri türleri ile *Streptococcus*, *Mycobacterium*, *Renibacterium* ve *Lactococcus* gibi Gram-pozitif patojenin sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Altan 2019).

Laktokokkozis ilk olarak 1950'lerin sonlarına doğru Japonya'da yoğun bir şekilde üretimi yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) sepsisemi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Portekiz, Yunanistan ve İran'da dahil olmak üzere dünyanın birçok ülkesinden bildirilmiştir. Türkiye'de ilk *Lactococcus garvieae* enfeksiyonu Ege bölgesindeki bir gökkuşağı alabalığı çiftliğinden rapor edilmiştir (Diler vd. 2002). Laktokokkozis 2002 yılından itibaren farklı coğrafi bölgelerde bulunan alabalık çiftliklerinde özellikle havuz suyu sıcaklığının 15 °C ve üzeri olduğu yaz aylarında en sık görülen hastalıklardan biri haline gelmiştir (Altan ve Korun 2021).

Hastalıktan etkilenen balıklarda sıklıkla hiper akut hemorajik sepsisemi olarak tanımlanır. Laktokokkozisten etkilenen balıklarda iştahsızlık, melanoz, uyuşukluk, düzensiz yüzme davranışı, tek taraflı veya iki taraflı ekzoftalmi, gözün periorbital ve göz içi kısımlarında kanamalar, yüzgeçlerin tabanında ve operküler bölgede kanamalar, karında şişkinlik ve asidik sıvı birikimi ile anal prolapsus görülür (Altan 2019; Altan ve Korun 2021; Korun vd. 2021).

L. garvieae Gram-pozitif, hareketsiz, sporsuz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif fakültatif anaerobik kısa zincir oluşturan oval-kok şekilli bir türdür. Suşlar kanlı vasatta alfa (α) hemoliz oluşturur. Tür 10-45 °C de %0-6.5 NaCl içeren ortamda ve pH 4.5-9.6 aralığında gelişme gösterir (Dolgun 2015; Kurtoglu ve Korun 2018).

Bakterinin moleküler tanımlanmasında kullanılan primer çiftleri arasında PLG-1 ve PLG-2 ile SA1B10-1-F ve SA1B10-1-R primer çiftleri yer alır (Zlotkin vd. 1998; Aoki vd. 2000).

Laktokokkozisin kontrolü için amoksisilin, eritromisin, oksitetrasiklin ve düşük dozda doksisiklin gibi antibiyotikler kullanılır (Vendrell vd. 2006). Farklı bölgelerden izole edilen *L. garvieae* suşlarının nitrofurantoin ve enrofloksasine duyarlı olduğu ancak bakterinin sülfametoksozal-trimetoprim ile oksolinik asite direnç gösterdiği bildirilmiştir (Altan 2019; Altan ve Korun 2021; Korun vd. 2021).

Türkiye'de hasta balıklardan izole edilen bakterinin patojenite ve virülansına yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Türe ve Altınok 2016). Bu tez çalışması ile hasta gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiş olan *Lactococcus garvieae* suşları fenotipik ve moleküler düzeyde tanımlanarak suşlarının hangi virülans genlerini taşıdığı

tespiti yapılarak ileride yapılması planlanan koruyucu amaçlı çalışmalar için temel olabilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmada *L. garvieae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılığı tespit edilmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Laktokokkozis

Laktokokkozis Gram-pozitif bakteri olan *Lactococcus garvieae*'nin oluşturduğu bakteriyel bir enfeksiyondur. Hastalık su sıcaklığının artış gösterdiği aylarda (Haziran - Eylül) hemorajik sepsisemi oluşması ile tanımlanan bir hastalıktır. Hastalık kaynaklı endemik enfeksiyonlar balık yetiştiriciliği sektöründe önemli kayıplara neden olmaktadır (Vendrell vd. 2006; Sánchez vd. 2011).

Laktokokkozis hiperakut hemorajik sepsisemi ile karakterizedir. Enfekte olmuş balıklarda uyuşukluk, iştahsızlık, deri renginde koyulaşma ve dengesiz yüzme gibi dış bulgular görülmektedir. Hastalığın seyrine göre enfekte balıkların baş, perioküler ve anal bölgesinde ve yüzgeç tabanlarında hemorojiler, karında şişkinlik ve asidik sıvı birikimi, tek ya da çift taraflı ekzoftalmus, korneada opaklık ve körlük ile anüste prolabsus gibi bulgular gözlenir (Ravelo vd. 2001; Dolgun 2015; Altan 2019).

L. garvieae (*Enterococcus seriolya*'nın önceki sinonimi) ilk kez 1950'li yılların sonlarına doğru Japonya da yoğun bir şekilde kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Fortina vd. 2006). Adriyatik mersin balığı (*Acipenser naccarii*), palyaço lapin (*Coris aygula*), dev tatlı su karidesi (*Macrobrachium rosenbergii*), kefal (*Mugil cephalus*), kara kaya balığı (*Sebastes schlegelii*), zeytin pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*), *Pseudocaranx dentex*, sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*), gölge balığı (*Thymallus thymallus*), Atlantik somonu (*Salmo salar*), kahverengi alabalık (*S. trutta*), sazan (*C. carpio*), kadife balığı (*Tinca tinca*) türlerinin hastalıktan etkilendiği de bildirilmiştir (Buller 2015).

Balıklarda laktokokkozisin bulaşma yolu yatay yol iledir. Hastalığın yayılmasında hasta, taşıyıcı ve asemptomatik balıklar rol oynar. Laktokokkozisin tedavisinde genellikle amoksisilin, eritromisin, oksitetrasiklin, doksisisiklin gibi antibiyotiklerin kullanıldığı bildirilmiştir (Altan 2019; Korun vd. 2021).

2.1.1. Etiyolojisi

Lactococcus cinsi, Streptococcaceae familyasına dahildir. 1985 yılında süt sığırları ve süt ürünlerinden izole edilen laktik streptokoklar olarak tespit edilen *Streptococcus* cinsinin bölünmesinden sonra tanımlanmıştır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* ve *L. garvieae* bilinen en önemli türlerdir (Vendrell vd. 2006).

L. garvieae Gram-pozitif, hareketsiz, fakültatif olarak anaerobik, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, oval-kok şekilli bir bakteri türüdür (Venderell vd. 2006). Eskülin ve arjinini hidrolize ederken kazein, nişasta ve jelatini hidrolize edemez. Eskülin, selobiyoz, galaktoz, maltoz, mannitol, salisin, sorbitol, trehaloz, *D*-fruktoz, *D*-glukoz, *D*-mannoz gibi karbonhidratlardan asit üretimi gerçekleştirir. Adonitol, inositol, laktoz, melezitoz, melibiyoz, rafinoz, *D*-arabinoz, *L*-ramnoz, *D*-ksilozdan ise asit üretemez (Çizelge 2.1). Voges-Proskauer (VP) ve Metil kırmızısı (MR) üretimi pozitifdir. Bakteri nitratı nitrite indirgeyemez. Gelişme sıcaklığı 10-45°C arasında olup, % 0-6,5 NaCl ortamında gelişme gösterir (Vendrell vd. 2006; Austin ve Austin 2016).

*E. seriolic*a'nın fenotipik ve moleküler özellikleri, bu türün *L. garvieae*'nin eş anlamlısı olarak sınıflandırılması gerektiğini göstermiştir. Japonya'dan izole edilen suşların bir özelliği biyokimyasal olarak birbirinden ayırt edilemeyen iki serotipin varlığı olup bu iki serotipte bir kapsülün bulunması (serotip KG-) veya bulunmaması (serotip KG+) ile ilişkilendirilir. Kapsüllü (serotip KG-) suşlarda hidrofilik karakter, fagositoza direnç ve yüksek patojenite dahil olmak üzere çeşitli özelliklerin bulunduğu bildirilmiştir (Gomes vd. 2006).

Çizelge 2.1. *L. garvieae*'nin fenotipik özellikleri (Austin ve Austin 2016; Vendrell vd. 2006)

Özellikler	Vendrell vd. 2006	Austin ve Austin 2016
Hücre morfolojisi	Oval kok	Kok
Gram boyama	-	-
Hareketlilik	-	-
Sitokrom oksidaz	-	-
Katalaz	-	-
O/F	F	F
Hemoliz	α	α
Sitrat (Simmon's)	-	*
Nitrat indirgeme	-	-
Metil kırmızısı	*	+
Voges-Proskauer	+	+
İndol üretimi	-	-
H₂S	-	-
Glukozdan gaz oluşumu	*	*
Gelişme		
0% NaCl	*	+
2 % NaCl	*	+
4 % NaCl	+	+
6 % NaCl	+	+
8 % NaCl	*	*
10% NaCl	*	*
4°C	+	*
20°C	+	+
30°C	+	+
35°C	+	+
ADH	+	+
LDK	-	*
ODK	-	*
Amilaz üretimi	*	*
ONPG	*	*
Asit oluşumu		
Laktoz	(+)	-
D-glukoz	*	+
D-fruktoz	*	+
Galaktoz	+	+
Mannitol	+	+
Sükroz	D	-
D-mannoz	+	+
Sorbitol	-	+
Rafinoz	-	-
İnositol	-	*
Arabinoz	-	-
D-ksiloz	-	-

+: pozitif, - : negatif, (+): zayıf ya da yavaş reaksiyon, D: değişken reaksiyon, *: belirtilmemiş, F: Fermentatif, α: alfa hemolitik. ADH: Arginin Dihidrolaz, ODK: Ornitin Dekarboksilaz, LDK: Lizin Dekarboksilaz, ONPG: Beta Galaktosidaz.

2.1.2. Epizootiolojisi

L. garvieae 1974 yılında Japonya’da sarıkuyruk (*S. quinquerediata*) balığından izole edilmiştir. 1991 yılından itibaren su sıcaklığının arttığı dönemlerde İtalya ve İspanya’daki gökkuşaklı alabalık işletmelerinde yüksek mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Vendrell vd. 2006; Dolgun 2015). Bakteri Tayvan’da tekir (*Mullus murmuletus*) ve tatlısu karidesi (*M. rosenbergii*) gibi sucul canlılardan da izole edilmiştir (Dolgun 2015).

Türkiye’de laktokokkozis ilk kez 2001 yılında Ege Bölgesi’ndeki gökkuşaklı alabalığı çiftliğinden bildirilmiştir (Diler vd. 2002). Ülkemizde hastalığın ilk kez görülmesinden sonra farklı coğrafik bölgelerde gökkuşaklı alabalığı üretimi yapılan işletmelerde de görüldüğü araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Korun vd. 2018; Kurtoğlu ve Korun 2018).

2.1.3. Klinik ve nekropsi bulguları

L. garvieae’nin yetiştiriciliği yapılan gökkuşaklı alabalıklarında hemorajik sepsiseminin etiyolojik etkeni olduğu bildirilmiştir (Avcı vd. 2010).

Laktokokkozisten etkilenen balıklarda; iştahsızlık, tek ve çift taraflı ekzoftalmus, deri renginde koyulaşma, konjonktivit, düzensiz yüzme, yüzgeçlerin taban kısımlarında, ağız ve göz çevresi ile anal bölgede kanamalar görülmektedir. Hastalıktan etkilenen balıklarda karın bölgesinde şişlik ve anal prolapsus bildirilmiştir (Chang vd. 2002; Diler vd. 2002; Avcı 2010).

Nekropside karın içerisinde kanlı asidik sıvı birikimi, iç organların yüzeyinde nokta ve yaygın tarzda kanamalar gözlenir. Dalak da büyüme, kalp zarı iltihabı, karaciğer ve dalak da fokal nekrotik bölgeler, beyin yüzeyinin sarımsı eksudat ile kaplı olması ve ayrıca bağırsak lümeninde hemorajik kanama bildirilmiştir. Hastalıktan etkilenen başlıca organlar arasında karaciğer, böbrek, dalak, kalp, bağırsak ve beyin bulunur (Chang vd. 2002; Vendrell vd. 2006; Korun vd. 2018).

2.1.4. Hastalığın bulaşması

Laktokokkozis ilk kez 1990’lı yılların başında Avrupa’da İspanya ve İtalya’da ortaya çıkmış ve hızlı bir şekilde Portekiz, Türkiye, Yunanistan, Bulgaristan’da dahil olmak üzere Güney Avrupa’ya yayılmıştır (Savvidis vd. 2007).

Hastalığın bulaşması yatay yol ile olmaktadır. Bu şekilde balık işletmelerine yeni balık girişi, asemptomatik balıklar ve laktokokkozisten kurtulan balıklar başlıca kaynak olmaktadır (Vendrell vd. 2006). Ayrıca aynı havuzda bulunan balıklar arasında su, balık yaralanması, fekal ve oral yolla doğrudan bulaşmada oldukça önemlidir (Vendrell vd. 2006). Hastalıkta dikey bulaşma bildirilmemiştir.

2.1.5. Kontrol ve tedavi

Laktokokkozisin 1974 yılındaki ilk bildiriminden itibaren dünyanın çeşitli bölgelerindeki kültürü yapılan balıklarda ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Altan 2019).

L. garvieae'nin neden olduğu laktokokkozis su sıcaklığının artış gösterdiği zamanlarda kültürü yapılan balıklarda yüksek mortaliteye ve ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Timur vd. 2011; Dinçtürk 2019).

Laktokokkozisi önlemede fiziksel ve kimyasal parametrelerin kontrolü önemlidir. Sudaki çözünmüş oksijenin azalması, amonyaklı bileşenlerin artış göstermesi, su sıcaklığının 15 °C'nin üzerine yükselmesi hastalığın ortaya çıkmasında etkili olmuştur. Ayrıca kültürü yapılan balıklarda hem kafes hem de havuzlarda sağlıklı ve hasta balıkların birlikte bulunması, kontamine su, kontamine havuzlar, fekal atıklar, hasta ve asemptomatik balıkların nakli, yabancı kuşlar hastalığının yayılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Dolgun 2015; Dinçtürk 2019).

Laktokokkozisin kontrolü için ölü balıkların ortamdaki uzaklaştırılması, stoklama yoğunluğunun azaltılması, havuz ve kafeslerin dezenfeksiyonu, yetiştirme tanklarının dezenfeksiyonu, kullanılan alet ve ekipmanların dezenfeksiyonu, balıkların elle müdahalesinin en aza indirilmesi hastalık etkeninin çiftliklere girişini engelleyen önemli tedbirler arasında yer almaktadır (Dolgun 2015). Hastalık etkeninin işletme koşullarına girişinin engellemek için satın alınan yavru balık ve yumurtaların hastalıktan arınmış olduğu tespit edilmesi gerekmektedir (Dolgun 2015). Hastalığı tedavi etmek amacıyla amoksisilin, eritromisin, doksisisiklin ve oksitetrasiklin kullanıldığı bildirilmiştir (Dolgun 2015; Dinçtürk 2019).

L. garvieae suşlarının farklı coğrafik kökenleri ile yapılan araştırmalarda enrofloksasin ve nitrofurantoina karşı duyarlı olduklarını sülfametoksazol-trimetoprim ve oksolinik asite karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Dolgun 2015).

Türkiye'deki laktokokkozis vakalarında *L. garvieae* suşlarının neomisin, gentamisin, linkomisin, sülfametoksazol-trimetoprim, oksitetrasiklin, florfenikol, amoksisilin ve doksisisikline karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir (Didinen vd. 2014).

Bakteri suşlarının *in vitro* koşullarda amoksisilin/klavulanik asit, amoksisilin, ampisilin, doksisisiklin, eritromisin, enrofloksasin, oksitetrasiklin, kloramfenikol, pristinamisin, sefolatin ve tetrasikline duyarlı oldukları, apromisin, flumekuin, gentamisin, kanamisin, nikomisin, oksalinik asit, penisilin, streptomisin ve sülfametoksazole dirençli oldukları bildirilmiştir (Kurtoğlu ve Korun, 2018). *L. garvieae* suşlarına karşı kullanılan antibiyotiklerin *in vitro* koşullarda etkili olmasına rağmen enfekte olmuş balıklarda yem alınmasında gözlenen iştahsızlık yüzünden antibiyotik alımını olumsuz yönde etkileyerek *in vivo* şartlarda etkisiz olduğunu bildirmişlerdir (Gomes vd. 2006; Dolgun 2015).

Bakteriyel hastalıkları önlemek amacı ile balıkların aşılama üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Bazı kemoterapötik ajanların *L. garvieae*'ye karşı etkili olmasına rağmen terapötik önlemler genellikle saha koşullarında etkisizdir. Bu nedenden dolayı

salgına duyarlı popülasyonların aşılınması laktokokkozis kontrolü için en iyi seçenek haline gelmiştir (Vendrell vd. 2006; Meyburgh vd. 2017). Ancak aşılarda balık sağlığını olumlu yönde etkilediğinin bildirilmesine karşın olumsuz yönde etkileri olduğunda bildirilmiştir. Aşılama ile sağlanan korumanın 2-3 ay gibi kısa süreli etkili olması, maliyetinin yüksek olması, intraperitoneal (I.P.) yolla uygulandığında iş gücü gerektirmesi ve balıklarda strese neden olması sebebi ile dezavantajları söz konusudur (Gomes vd. 2006).

2.2. *L. garvieae*'nin Patojenitesi ve Virölansı

2.2.1. Bakteri patojenitesi

Bir mikroorganizmanın konakda hastalık oluşturması patojenite olarak bilinirken, virölans ise patojen mikroorganizmanın konak veya organizmada yol açtığı hastalık şiddetini ifade etmektedir (Willey vd. 2008; Teker 2017).

Enfeksiyöz bir hastalık için öncelikle bakteriyel patojenin konağa tutunması, kolonileşmesi ve kolonizasyonunu tamamladıktan sonra konağın hasar görmesi gerekir (Willey vd. 2008; Teker 2017). Kolonizasyon patojen bakterilerin yeni (konak) ortamda hayatta kalma ve temel besinler için konağın normal mikrobiyotası ile rekabet etme yeteneğine bağlıdır. Patojen bakterinin konak içerisinde gelişmesini sağlayan besin, pH, sıcaklık gibi ortamların uygun olması gerekir. Konağın vücudunun en uygun koşullarını sağlayan bölgeleri, patojen mikroorganizmanın gelişmesini sağlar (Willey vd. 2008).

Patojen mikroorganizmalar konağa çeşitli yollar ile bulaşır. Enfekte olmuş konak bulunduğu ortama patojen bakterileri yayar. Ortama giren bakteriler çeşitli yüzeylerde birikebilir ve dolaylı olarak yeni bir konağa iletilebilir. Bakterilerin yayılmasında toprak, su, yem, eklemeli besinler ve cansız nesneler rol oynar (Willey vd. 2008).

Bakteriyel enfeksiyonlarda hastalığa neden olan etkenlerden biriside bakteri toksinleridir. Toksinler konağın hücre ya da dokularında hasar oluşturarak patojenin virölansını arttıran protein yapılarıdır (Deisinght ve Thompson 2002).

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen ve hücre dışına salgılanan proteinler ekzotoksin; Gram-negatif bakteriler tarafından salgılanan ve lipopolisakkarid (LPS) olarak bilinen hücre duvarı proteini ise endotoksin olarak tanımlanır (Teker 2017).

2.2.2. *L. garvieae*'nin virölansı

L. garvieae zoonotik bir patojendir. Bakteri tatlısu ve denizde yaşayan çeşitli balık türlerini enfekte etmesine rağmen gökkuşaağı alabalıklarında daha yüksek virölans gösterdiği bildirilmiştir (Shahi vd. 2018).

L. garvieae'nin yüksek patojenitesi, antibiyotiklere dirençli suşların gelişmesi, uygun kontrol yöntemlerinin olmaması ve enfekte balıkların nakli nedeniyle suşlar son yirmi yılda birçok ülkeye yayılmıştır. *L. garvieae* Avrupa, Asya, Afrika, Orta Doğu ve Avustralya'da yetiştiriciliği yapılan gökkuşaağı alabalıkları için en önemli risk faktörü

olarak kabul edilmektedir (Shahi vd. 2018).

L. garvieae'nin virölansı hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Yapılan çalışmaların izole edilen klinik izolatlarla odaklanmıştır. *L. garvieae*'nin virölans faktörlerini inceleyen ilk çalışmalar 1980'li yıllarda hemolitik aktivitesinde yer alan proteinleri, kapsül veya sideroforların ilişkisini açıklamaya yöneliktir (Gibello vd. 2016). Bakterilerde kapsül oluşumu balıklar için virölans faktörlerinden birisi olduğunu ortaya çıkaran çalışmalar mevcuttur (Türe ve Altınok 2016).

L. garvieae'nin serotipleri; serumu aglütine etme yeteneklerine göre ayırt edilir. Sarıkuyruk (*S. quinquerediata*) balığından izole edilen izolatlar aglütine edici (KG+) ve aglütine edici olmayan (KG-) fenotiplere ayrılmıştır (Morita vd. 2011; Meyburgh 2017). Morita vd. (2011) yaptıkları bir çalışmada *L. garvieae*'nin kapsüllü serotipi (KG-) olan Lg2 suşunun sarıkuyruk (*S. quinquerediata*) balığında kapsüllenmemiş (KG+) ATCC 49156 suşlarından daha öldürücü olduğunu bildirmişlerdir (Morita vd. 2011). Türe vd. (2014) ise kapsüllenmemiş *L. garvieae*'de Lgper ve ATCC 49156 suşlarının gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) için virülant olduğunu ve populasyonlarda yüksek ölümlere neden olduğunu bildirmişlerdir (Türe vd. 2014).

Türkiye, İspanya, İtalya, Fransa, ABD ve Japonya'daki gökkuşağı alabalıkları ve sarıkuyruk balıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarında kapsül gen kümesinin varlığı tespit edilememiştir. *L. garvieae* suşları için kapsül yapısının olup olmaması virölans faktörleri arasında yer almamaktadır (Gibello vd. 2016). Bu nedenle *L. garvieae*'nin patojenitesi için kapsül varlığının olup olmamasına bakılmaksızın diğer virölans genlerinin araştırılması önemlidir (Türe ve Altınok 2016).

L. garvieae suşlarının karşılaştırmalı genom analizlerine bakıldığında kapsül gen kümesinin varlığının patojeniteye yol açan tek etken olmadığını göstermiştir. *L. garvieae* genomunda yapışma yüzey proteinlerinden farklı virölans faktörleride bulunabilmektedir (Eraclio vd. 2018). Genom analizleri sonucunda adezin gen kümesi 1-2 (*adhCI*, *adhCII*), adezin geni (*adh*), adezin Pav (*adhPAV*), adezin PsaA (*adhPsaA*), LPXTG içeren yüzey proteinleri 1-2-3-4 (*LPXTG-1*, *LPXTG-2*, *LPXTG-3*, *LPXTG-4*), süperoksit dismutaz (*sod*), NADH oksidaz, hemolizin 1-2-3 genleri (*hly1*, *hly2*, *hly3*), fosfoglukomutaz (*pgm*), enolaz (*eno*) ve antibiyotik direnç genleri hem insanlarda hem de hayvanlarda potansiyel virölans genleri olarak tanımlanmıştır (Miyachi vd. 2012; Türe ve Altınok 2016; Eraclio vd. 2018).

Virölans faktörlerini keşfetmek, bakteriyel patojenlerin tedavisi, önlenmesi için yeni ilaçlar ve aşılar geliştirmek için en önemli adımlardan biridir. Bu faktörlerin belirlenmesi sadece bakterilerin patogeneze mekanizması hakkında bilgi sahibi olmaya katkı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda terapötikler için yeni hedefler olarak kullanılabilir (Teker vd. 2020).

2.2.2.1. *L. garvieae*'de adezyon virölans genleri

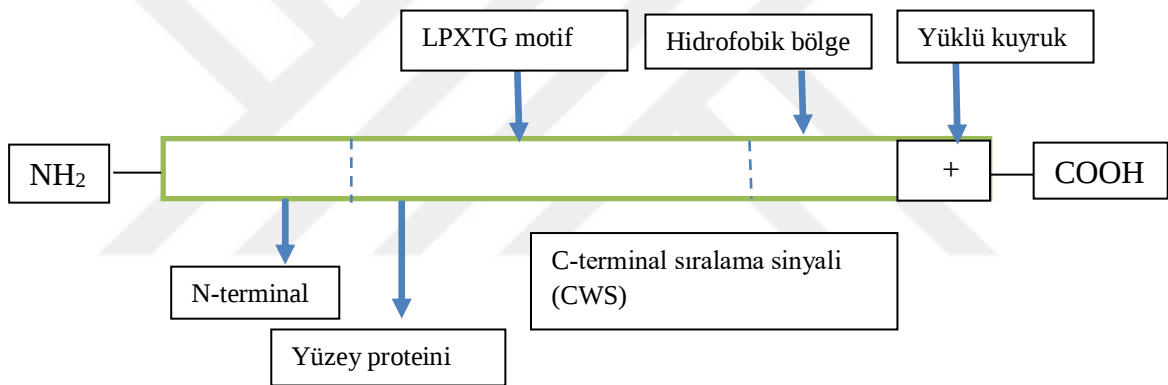
Bakterilerin çeşitli yüzeylere tutunması olarak tanımlanan adezyon; konak dokuların invazyonunu ve kolonizasyonunu kolaylaştırarak bakterilerin virölansında rol oynar (Chhatwal, 2002). Adezyon (yapışma) ile ilgili hücre yüzeyi proteinleri sitoplazmik membran proteinleri, spesifik alanlara sahip proteinler, karboksil terminali

LPXTG benzeri motif içeren proteinler ve membran lipidlerine kovalent olarak bağlanan lipoproteinler olmak üzere dört gruba ayrılmıştır (Desvaux vd. 2006; Kleerebezem vd. 2010; Teker vd. 2020).

Birçok bakteri türleri yüzeylere bağlı ve/veya yakın ilişki içerisinde. Adezin genleri bakterilerin hedef yüzeyleri üzerindeki çeşitli moleküler motiflerin spesifik olarak tanınmasını ve bağlanmasını sağlamaktadır. Adezinler moleküler motifleri enzimler ve immünoglobulinler sayesinde anahtar-kilit şeklinde tanımaktadır (Klemm vd. 2010).

LPXTG motifine sahip proteinler amino-terminal sinyal peptidi, karboksi-terminal hidrofobik bölge ve bu bölgenin içersinde yer alan yüklü bir kuyruktan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Gram-pozitif bakteri türlerinin ~ %70'inde yüzeye bağlanan (LPXTG motifi) farklı proteinler tanımlanmıştır (Chhatwal 2002).

LPXTG motif proteinlerin *L. garvieae* suşların neden olduğu enfeksiyondan etkilenen gökkuşağı alabalıklarında fagositik olmayan hücrelerinin tutunma ve hüce içersine giriş sürecinde etkili olduğu bildirilmiştir (Gibello vd. 2016).



Şekil 2.1. LPXTG motifine sahip protein yapısı (Comfort ve Clubb 2004; Call ve Klaenhammer 2013)

L. garvieae'de LPXTG motifine sahip yüzey proteinlerinin kodlanmasından sorumlu olduğu genler *LPXTG-1*, *LPXTG-2*, *LPXTG-3*, *LPXTG-4*'dür (Morita vd. 2011; Miyauchi vd. 2012).

PavA'nın yapısında salgı ve hücre yüzey çapa sinyallerinin olmamasına rağmen *Pneumococcus* hücre yüzeyinde bulunmaktadır. PavA ekstraselüler immobilize fibronektinlerine bağlanarak hücreleride adezyon ve virülans için gerekli olduğu bildirilmiştir (Chhatwal 2002).

Pneumococcus yüzey antijeni A (PsaA) taşıma sisteminde metal bağlayıcı lipoprotein olarak sınıflandırmaktadır. PsaA konak hücreye tutunarak bakterinin virülansında etkilidir (Morita vd. 2011).

Çeşitli canlı türlerinden izole edilmiş olan *L. garvieae* suşlarında *adh*, *adhCI*, *adhCII* genleri rapor edilmiştir. Bu genler bakteri suşlarının adezyon temelli virülansında yer almaktadır (Miyauchi vd. 2012; Türe ve Altınok 2016).

2.2.2.2. *L. garvieae*'de hemolizin virölans genleri

Hemolizinler Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler tarafından üretilen ekstraselüler toksin proteinlerdir. Bakteriyel enfeksiyon sırasında kan hücrelerinin zar yapısında hasara neden olurlar (Türe ve Altınok 2016; Teker vd. 2018).

Hemolizinlerin virölans ve patogeneze ile ilişkileri moleküler düzeyde *L. garvieae* dahil olmak üzere birçok patojenik bakteride incelenmiştir (Türe ve Altınok 2016; Teker vd. 2018).

Bakteriler besiyerinde bulunan kırmızı kan hücrelerinin α (alfa), β (beta) ve γ (gama) hemolitik türler olarak sınıflandırılmaktadır. *L. garvieae* kanlı agar üzerinde α -hemolitik aktivite gösterir. *L. garvieae* suşlarında hemolizin virölans genleri (*hlyI*, *hlyII*, *hlyIII*) belirlenmiş olup hemolitik aktiviteden sorumluluğu olduğu tespit edilmiştir (Türe ve Altınok 2016). Bu yüzden *hly* genleri hemolitik etkinin saptanmasında genetik belirleyici olarak kullanılmaktadır (Teker vd. 2018).

2.2.2.3. *L. garvieae*'nin diğer virölans genleri

Enolaz, glikolizin ikinci son basamağında 2-fosfoglisaratın fosfoenolpiruvata dönüşümünü katalize eden ve glukoneogenezde ters reaksiyondan sorumlu glikolitik bir enzimdir. Enolaz enzimi Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterileri suşlarının virölansında rol oynamaktadır (Meyburgh vd. 2018).

Bakteri türleri için süperoksit dismutaz (SOD) ve NADH oksidaz potansiyel virölans faktörleridir. Her iki enzimde patojen bakterilerin oksijene ve reaktif süperoksit radikallerine tolerans kazandırarak aerobik koşullarda hayatta kalmalarını sağlamaktadır (Morita vd. 2011).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücreler üzerine çeşitli zararları bulunmaktadır. Oksidatif strese karşı koruma ROS'un katalaz ve SOD tarafından enzimatik olarak uzaklaştırılmasıyla sağlanır (Meyburgh vd. 2018). LAB bakterileri katalaz negatiftir. Bu nedenle SOD *L. garvieae*'deki oksidatif strese karşı önemli bir savunma mekanizmasını temsil eder. SOD'un detoksifiye edici özellikleri, solunum patlaması sonucu bakterisidal ROS üretimi üzerine bakterilerin intrafagositik sağkalımını da artırabilir. NOX enzimi moleküler oksijeni H_2O veya H_2O_2 'ye indirger ve LAB'nin aerobik büyümesi sırasında temel işlevler olan O_2 toksisitesine ve O_2 algılamasına karşı savunmada önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. NOX'un *S. pneumoniae* virölansındaki önemi *nox* eksikliği olan bir mutantın önemli ölçüde zayıflaması gösterilerek ortaya konmuştur. NOX'un O_2 bakımından zengin ortamlarda *in vivo* çoğalması için gerekli olduğu sonucuna varmıştır (Meyburgh vd. 2018).

Fibronektin bağlayıcı proteinler (*fbp*) Gram-pozitif kok türlerinin yüzeyinde bulunan hücre dışı matrisin (ECM) yüzey reseptörleri olarak tanımlanmıştır. (Abdelfatah vd. 2015). Fibronektin işlevli bir proteindir. Hem konak hücrelerine hem de bakteri hücrelerine bağlanabildiğinden patojenlerin tutunması için gerekli olan bağlayıcı bir protein olarak kabul edilir (Chhatwal 2002).

Fosfoglukomutaz (PG) *L. garvieae* için olası virölans gendir. Ama bakterinin

virölansındaki rolü tam olarak anlaşılmamıştır. PG metabolik bir enzimdir. Ancak PG, *L. garvieae* hücre ekstraktlarında immünojenik proteinlerdir. Bakteri hücre duvarında bu proteinin varlığı araştırılmamıştır. Bu nedenle, CGC içermeyen bakterinin virölansı PG gibi potansiyel virölans faktörlerinden biri olarak kabul edilir (Türe ve Altınok 2016).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen ve tamamlanmış olan FBA-2018-3089 Normal Araştırma Projesi kapsamında Kemer bölgesindeki ticari alabalık işletmelerinden izole edilen ve liyofilize *L. garvieae* suşları tez çalışmasında materyal olarak kullanılmıştır. Liyofilize suşlar (10 suş) önce Beyin Kalp İnfüzyon (BHI) buyyonuna inoküle edildikten sonra $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de soğutmalı etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda sıvı besiyerinden Beyin Kalp İnfüzyon agar (BHIA)'lı Petri kutularına ekimler yapılarak suşların alt kültürleri hazırlanmıştır.

3.1.2. Çalışmanın yapıldığı yer

Bakteri suşlarının identifikasyonu ve virülans genlerinin tespiti için gerekli olan bakteriyolojik çalışmalar, Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı



Şekil 3.2. Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı

3.1.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Çalışmada Beyin Kalp Infuzyon Agar (BHIA), Tryptic Soy Agar (TSA), Nutrient Buyyonu (NB), MacConkey agar, Oksidasyon/Fermentasyon besiyeri (O/F), Metil Kırmızısı-Voges-Proskauer (MR-VP) besiyeri, Triple Sugar Iron Agar (TSIA) besiyeri, Simmon's sitrat besiyeri, Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri, Mueller Hinton Buyyonu (MHB), Nitrat Buyyonu, Nişasta Agar, Jelatin besiyeri ve Kanlı (%5 koyun kanı ilave edilmiş) agar kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Gram boyama tekniğinde kullanılan boyalar (kristal viyole, lugol ve fuksin), sitokrom oksidaz testi için tetramethyl-p-phenylen-diamine dihydrochloride ayırıcı, katalaz üretimi için %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit), şekerlerden asit üretimi için *D*-glukoz, *D*-ksiloz, *D*-fruktoz, *D*-mannoz, *D*-galaktoz, *L*-arabinoz, sükröz, laktoz, maltoz, dekarboksilaz ve dihidrolaz testi için *L*-arjinin dihidrolaz, *L*-lizin dekarboksilaz, *L*-ornitin dekarboksilaz, Griess-Ilosvay ayırıcı, ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside), Kovac's ayırıcı, alfa naftol (%5'lik), potasyum hidroksit (%40'lık), etil alkol (%96'lık), lizozim, çini mürekkebi, et özütü, pepton, tuz (NaCl), $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, agar, glikoz ve TBE tamponu hazırlanışı için trizma base, borik asit, 0,5M EDTA (pH 8,3) ile agaroz kullanılmıştır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan ticari kitler

Bakterilerden DNA izolasyonu için Hibrigen Genomik DNA (Türkiye) ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. Kit içeriğinde LB1, LB2, BDY, BDE ve BE tamponu ile proteinaz K ve RNaz A, bulunmaktadır. DNA izolasyon çalışmalarına lizis basamağında eklenmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmaları için Bioline MyTaq DNA Polimeraz (İngiltere) kiti kullanılmıştır.

3.1.6. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

Çalışmada bakteri suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının tespiti için on sekiz farklı antibiyotik kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan antibiyotikler; amoksisilin (25 µg), ampicilin (10 µg), basitrasin (0.04 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), flumequin (30 µg), furazolidon (100 µg), florfenikol (30 µg), kanamisin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), oksasilin (1 µg), oksitetrasiklin (30 µg), streptomisin (10 µg), sülfametoksazol (100 µg), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/sülfametoksazol (15 µg).

3.2. Metot

3.2.1. *L. garvieae*'nin Morfolojik ve Hareket Özelliklerinin Tespiti

Gram boyama yöntemi, en önemli ayırt edici boyama işlemidir. Gram-pozitif bakteri kültürlerinde kristal mor ve iyot etanol veya asetonla çözünmeyen hücre bileşenleri ile bir kompleks yapı oluşturur. Gram-negatif bakteriler ise kristal morunu kolayca kaybeder ve karşıt boyayı hücre duvarına alır (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

Uygulanışı

- 1- Temiz bir lam yüzeyine bakteriyel film hazırlanır ve bunzen bek alevinde fiske edilir.
- 2- Kristal viyole lam yüzeyine dökülür ve 1 dk bekletilir.
- 3- Akan su altında yıkanır.
- 4- İyot ile lam kaplanır, 30 sn bekletilir.
- 5- Lam akan su ile yıkanır.
- 6- Lam dik açışeklinde alkol-aseton karışımında mor renk kaybı olana kadar tutulur.
- 7- Lam su ile hemen yıkanır, fazla su uzaklaştırılır.
- 8- Lam yüzeyi fuksin ile kaplanır ve 10 sn kadar bekletilir.
- 9- Lam nazıkçe akan su altında yıkanır.
- 10- Lam kurutma kağıdı arasında kurutulup, lamel ile kapatılarak ışık mikroskobu altında incelenir.

Gram-negatif bakteriler pembe/kırmızı, Gram-pozitif bakteriler ise mor renk olarak gözükür (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

Bakteri hücresi türe göre kapsüllü ve kapsülsüz olmak üzere ikiye ayrılır. Bakterilerde kapsülün bulunup bulunmadığının tespitinde genellikle negatif boyama yönteminden yararlanılır. Negatif boyama; Yaş preparasyon tekniği ve negatif ayırt edici boyama olmak üzere iki çeşittir (Temiz 2000).

Yaş preparasyon yöntemi ile negatif boyama

1-Temiz, kuru lamın üzerine bir damla saf su ilave edilir.

2- Petri kutusunda gelişme gösteren bakteri kültüründen öze ile örnek alınarak saf su içeren lamın üzerine koyularak süspanse edilir.

3- Hazırlanan hücre süspansiyonu üzerine bir damla çini mürekkebi damlatılır ve öze ile karıştırılır.

4- Hücre süspansiyonun üzerine 45° eğimle lamel kapatılır ve mikroskop altında 40X büyütme de incelenir.

Bakteri hücreleri boyanmadığı için renksiz ya da çok donuk mavi-yeşil arası bir renkte görülür. İncelenen bakteri örneği kapsüllü ise; kapsül hücre çevresinde gri-siyah bir fon içinde tamamen saydam olarak görülür (Temiz 2000).

Bakteri türlerinin hareketli ya da hareketsiz olup olmadığını tespit etmek için hareket testi yapılır. Hareketlilik testi iki metot ile gerçekleştirilir.

Metot 1. Asılı damla metodu

Temiz bir lamelin üzerine bir damla saf su eklenir. Daha sonra bakteri kolonisi ile süspanse edilir. Lamel, çukur lamın üzerine ters çevrilerek kapatılır. Işık mikroskobu altında önce 10X daha sonra 40X büyütme ile incelenir (Timur ve Timur 2003).

Metot 2. Yarı katı agar metodu

Petri kutularına yaklaşık 20-25 ml olacak şekilde hareket besiyeri dökülür (Hareket besiyeri; Et özütü 0.70 g, Pepton 1 g, NaCl 0.30 g, Na₂HPO₄.2H₂O 0.20 g, Agar 0.45 g, Glikoz 1 g, dH₂O 100 ml, pH 7.5 ±2). Gelişme gösteren bakteri kolonisinden steril iğne öze ile örnek alınarak hareket besiyeri içeren Petri kutusunun ortasına ekim yapılır. Ekimli besiyeri 25 ± 2°C’ de 24 - 72 saat süre ile inkübe edilir. İnkübasyon sonunda bakteri suşu işaretlenen alandan dışarı doğru gelişme gösterirse hareketli gelişme göstermez ise hareketsiz olduğu tespit edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2. *L. garvieae*’nin Fenotipik Özelliklerinin Belirlenmesi

BHIA da gelişme gösteren bakteri suşlarından alt kültürler hazırlanmıştır. Bakteri suşlarının fenotipik özelliklerinin tespiti için kullanılan tüm besiyerleri 25±2°C de 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bakteri suşlarının fenotipik özelliklerinin tespiti için sitokrom oksidaz reaksiyonu, katalaz üretimi, hemoliz, sıcaklık ve tuzluluk tolerans testleri, Voges-Proskauer (VP) ve Metil Red (MR) testleri, H₂S üretimi, Simmon’s sitrat agar da sitrat kullanımı, nitrat indirgeme testi, jelatinaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz üretimi, arjinin dihidrolaz üretimi, MacConkey agarda gelişme, farklı şekerlerden asit üretimi, ürease üretimi, Beta Galaktosidase (ONPG) ve nişasta hidrolizasyonu ile ilgili testler yapılmıştır. (Timur ve Timur 2003; Austin ve Austin 2016).

3.2.2.1. Bakteri suşlarının katalaz üretimi

Bakteriyel solunumun toksit ürünü olan hidrojen peroksit (H_2O_2); katalazlar ve peroksidazlar tarafından yok edilir (Formül 3.1; Formül 3.2):



Katalaz aktivitesi moleküler gaz halindeki oksijen üretimiyle sonuçlanırken, peroksidaz hidrojen ve oksijen yalnızca bir organik alıcısı varlığında ayrıştırılır. Katalaz üretimi taksonomik açıdan büyük önem taşırken, peroksidazın saptanması bakteri türünün tanımlanmasında önemli değildir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

Uygulanışı

Lam üzerine %3'lük H_2O_2 solüsyonundan damlatılır. Bakteri kültüründen steril tahta eküvyon çubuğu ile örnek alınarak karıştırılır. Yoğun köpürme pozitif, hafif kabarcıklanma zayıf pozitif ve kabarcık gözlenmezse negatif olarak kabul edilir.

3.2.2.2. Bakteri suşlarının sitokrom oksidaz üretimi

Sitokrom oksidaz pozitif bakterilerin solunum zincirinin son halkası olarak oksitlenmiş sitokrom c elektronlarını alır ve onları son hidrojen alıcısı olan moleküler oksijene geçirir ve hidrojen peroksit indirger. Oksidaz testinde reaktif olarak kullanılan I-fenilendiamin türevleri oksitlenmiş sitokrom c ile renkli bileşiklere oksitlenir. Bu da indirgenmiş sitokrom c'ye dönüşür. Sitokrom oksidaz ayracı emdirilmiş steril kağıt şeritler üzerine 24 saatlik bakteri kültüründen steril tahta çubuklar ile örnek alınarak test kağıdının üzerine konulur ve 30 sn bekletilir. Bekleme süresi sonunda mor renk gözleniyorsa sonuç pozitif olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.3. Oksidasyon-Fermantasyon (O/F) testi

Test için O/F bazal besiyeri kullanılır. Ticari olarak mevcut O/F besiyeri 90 ml olacak şekilde hazırlanır. Ayrıca 10 ml saf su da $121^\circ C$ ' de 15 dakika otoklavlanır. Otoklavlama sonrası 10 ml'ye 1 g glikoz eklenir ve çözündürülür. O/F besiyeri $50^\circ C$ 'ye kadar soğuduğunda şeker solüsyonu membran filtreden geçirilir ve besiyerine aktarılarak tüplere dağıtılır. Tüplere 18-24 saatlik bakteri kültüründen ekim yapılır. Ekimli tüplerin biri açık, diğeri steril mineral yağ ile kaplandıktan sonra $24 \pm 2^\circ C$ ' de inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonucunda her iki tüp sarı ise fermantatif, iki tüpte yeşil renk gözlemleniyorsa non okside edici-non fermante edici, tüplerden açık olanı sarı, kapalı olanı yeşil ise okside edici, fermente etmeyen, her iki tüp mavi rengi alıyorsa non okside edici-non fermante şeklinde sonucun olduğunu belirler (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.4. İndol üretimi

Bu test mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol oluşturabilme getirebilme yeteneğini belirlemede kullanılır. Bakteri kültüründen indol besiyerine ekildikten sonra ekimli besiyerleri $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat süre ile inkübe edilir. İnkübasyon sonunda kültürlerin üzerine kovacs ayracından 0.5 ml ilave edilir ve karıştırılır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyonu, sarımsı halka ise negatif sonucun olduğunu gösterir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.5. Metil kırmızısı-Voges Proskauer (MR-VP) testi

Metil kırmızısı (MR) testi glikoz fermentasyonunu ayırt etmek için kullanılır. Glikoz; fosfat, pepton-su ortamında MR pozitif bakteriler pH'ı 4.5'nun altında tutmaya yetecek miktarda asit üretirken MR negatif bakteriler pH'ı 6 da tutarlar. Ayrıca olarak alkollü metil kırmızısı çözeltisi kullanılır. Çözelti kullanıldıktan sonra besiyeri rengi pH 4.5'tan düşük ise kırmızı, pH 6 ve üzerinde ise sarı renkte gözükür (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

Voges-Proskauer (VP) testi bakteri suşları tarafından glikoz parçalanması sırasında üretilen asetoinin (asetil metil karbinol) saptanması amacıyla kullanılır. VP pozitif bakteri kültürüne potasyum hidroksit (KOH, %40'lık) eklenirse asetoin diasetile oksitlenir. Bu durum arjinin ve diğer pepton bileşenlerinde bulunan guanidin çekirdekleriyle pembe renkli yoğunlaşma ürününü oluşturur. Diasetil üretimi için katalizör görevi gören α -naftol başka bir renk yoğunlaştırıcıdır. Bakteri kültürün üzerine önce 0.5 ml α - naftol solüsyonu sonrasında %40' lık KOH solüsyonundan eklenir. Tüp çalkalanır ve beklenir. Bekleme süresi sonunda tüpte gözlenen pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.6. MacConkey agarda gelişme

MacConkey agar bakteri türleri için seçici bir besiyeridir. Gram-negatif ve laktozu fermente eden bakteri türlerini ayırt etmek amacı ile kullanılır. Laktozu fermente eden bakteri suşları besiyerinde kırmızı-pembe renkli kolonileri oluştururken, laktozu fermente etmeyen bakteri suşlarında ise koloni rengi değişiklik göstermez. Besiyeri içerisinde bulunan kristal moru ve safra tuzları, Gram-pozitif bakterilerin gelişmesini inhibe ederken Gram-negatif bakterilerin gelişmesine ve izolasyonuna izin verir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.7. Nişasta hidrolizi

Nişasta hidrolizi bir monosakkarit bileşeni olan glikozun fermentasyonuna bağlı asit reaksiyonudur. Bakteriler için geçerli olan nişasta hidroliz testi, hidrolize olan nişastanın lugol iyotu ile renk reaksiyonuna dayanır. Nişasta koyu mavi bir renk verirken hidroliz ilerledikçe parçalanmış ürünler yavaş yavaş menekşe, kahverengimsi-kırmızımsı ve renksiz hale gelir.

Uygulanışı

1-Nişasta agarlı Petri kutularına bakteri kültüründen çizgi şeklinde ekim yapılır.

2-Petri kutuları $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 7 güne kadar inkübe edilir.

3-İnkübasyon sonucunda besiyerinde üreme gösteren bakteri kolonilerinin üzerine lugol solüsyonu eklenir.

4-Bakterilerin gelişme gösterdiği bölgenin etrafında açık renkli zon oluşumu varsa pozitif olarak değerlendirilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.8. Nitrat redüksiyon testi

Bakteriyolojide nitratın indirgenmesi genellikle nitrat içeren sıvı buyyon kültüründe gerçekleştirilir. Nitrat indirgenmesinin ana ürünleri nitrit veya nitrojen gazıdır (Formül 3.3; Formül 3.4):



Nitrati ayrıştıran bakteri kültürüne nitrit reaktifi (Griess-Ilosvay) eklenirse kırmızı bir renk oluşur (diazonyum bileşiği oluşumu). Bu reaksiyon nitrit üretimi olarak tanımlanır. Formül 3.4'e göre azot gazı üretimi tam nitrat parçalanması veya denitrifikasyonu gösterir. Nitrat buyyonunda gelişme gösteren bakteri kültürünün üzerine Griess-Ilosvay solüsyonu eklendikten sonra kırmızı renk pozitif, sarı renk negatif sonuç olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.9. Sitrat üretimi

Sitrat üretimi belli bazı Gram-negatif bakteri türlerini ayırt etmek için kullanılır. Simmon's sitrat agar besiyeri üzerinde gelişen bakteri kolonilerinin rengi inkübasyon süresi sonunda incelendiğinde mavi renk dönüşümü pozitif sonuç olarak kabul edilir. (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.10. Hidrojen sülfid üretimi (H_2S)

Birçok bakteri türü için H_2S üretimi bakteriyel tanımlamada dikkate alınmaktadır. Tiyosülfat-demir yöntemi; tiyosülfatın indirgenmesi ile bol miktarda üretilen H_2S 'i tespit eder. H_2S demir-tuz ile siyah renkte bir demir sülfür çökeltisi oluşturur. Bu test için TSI agar vasatı kullanılır. Cam tüp içerisine yatık agar olarak dökülür ve 24 saatlik üremiş olan bakteri kolonilerinden ekim yapılır. Ekimli besiyeri $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda cam tüpün dibinde vasatta siyahlaşma ve parçalanma var ise bakteri kültürü H_2S üretimi ile şekerden asit üretimi pozitif olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.11. Jelatin hidrolizi

Bakterilerin hücre dışı proteolitik enzimleri; proteinleri polipeptitlere, peptitlere ve amino asitlere hidrolize eder. Bu testin amacı; bakteriler tarafından jelatini hidrolize

eden jelatinaz enziminin varlığını ortaya koymaktır. Bakteri suşları için ayırt edeci bir testtir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

Uygulanışı

-24 saatlik bakteri kültüründen örnek alınır.

-Nutrient buyyonu+ jelatin vasatı konulmuş cam deney tüplerine inoküle edilir.

-Bakteri ekimleri yapıldıktan sonra $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24-72 saat süre ile inkübe edilir.

-İnkübasyon sonucunda cam tüpler buzlu su içeren beherlerin içerisine konur ve beklenir.

-Bekleme süresinin sonunda jelatini hidrolize etmeyen bakteri suşları katılaşı ve negatif sonuç olarak kaydedilir. Jelatini hidrolize edenler sıvı olarak kalır ve pozitif sonuç olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.12. Beta Galaktosidase (ONPG) üretimi

Bu testin amacı; o-nitrophenyl-beta-D-galactoside (ONPG) enziminin varlığını belirlemektir.

Uygulanışı

-Steril serum fizyolojik solüsyonundan cam tüplere eklenir ve ONPG diski yerleştirilir.

-Bakteri suşları inoküle edilir. $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübasyona bırakılır.

-İnkübasyon süresi sonunda sarı renk gözlenirse sonuç pozitif olarak, renk dönüşümü yoksa sonuç negatif olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.13. Aminoasit dekarboksilaz ve dihidrolaz testi

Nessler reaktifi ile belirlenen arginin amonyak üretimi ile üreyi parçalayamaması nedeniyle dihidrolaza uğrar. Üre olması gerekenden fazla ayrışır, dekarboksilasyon yolunun sonunda NH_3 ve CO_2 oluşur. Dekarboksilasyon, pH 5.0-6.0'da anaerobik olarak gerçekleşir. Amino asit substratlarına ek olarak, ortam piridoksal fosfat ve glikoz içerir. Bu durum dekarboksilaz aktivitesini arttırarak enerji kaynağı olarak kullanılır. Fermentatif bakteriler tarafından glikozdan üretilen asitler, amino asit ayrışır alkaline dönüşen düşük bir pH'ı korur (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

Uygulanışı

- Arjinin dihidrolaz ve lizin-ornitin dekarboksilaz buyyonu içeren iki tüpe ihtiyaç vardır.

-Bakteri kültürleri her bir tüpe inoküle edilir ve tüplerden biri steril sıvı parafin ile kapatılır.

- $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de 48-72 saat süre ile inkübe edilir.

-İnkübasyon süresi sonunda aminlerin birikmesi ile pH' ın artışı, besiyerindeki pH indikatörü sarıdan mora değiştirir. İnkübasyon sonunda mor renkli tüp pozitif sarı renkli tüp ise negatif kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.14. Karbonhidrat fermentasyon testi

Bakterilerin çeşitli spesifik karbonhidratları ayırıştırma özelliklerini belirlemek amacı ile uygulanır. Bakteriler karbonhidratları kendileri tarafından sentezlenen hidrolize enzimleri yardımı ile ayırıştırır. Karbonhidrat fermentasyon testi; karbonhidrat içeren buyyon kullanılarak yapılır. Test sonucunda sarı renk pozitif kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.15. Farklı sıcaklık derecelerinde gelişme

Bu test bakterinin farklı sıcaklık derecelerinde gelişip gelişemediğini ortaya koymak amacıyla yapılır. Bakteri kültüründen Nutrient buyyonuna ekimler yapılarak 4°C, 25°C, 37°C'lerde 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonucunda üremenin olduğu tüpte bulanıklık tespit edilirse sonuç pozitif olarak kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.16. Tuzluluk tolerans testi

Bu test; bakteri kültürlerinin farklı tuzluluk oranlarında (%0, %2, %4, %6 ve %8 NaCl) bakteri kültürlerin gelişmesini tespit eder. Tuzlu Nutrient buyyonuna ekimler yapılarak ekimli tüpler 25±2°C'de 96 saat süre ile inkübe edilir. İnkübasyon sonunda üremenin olduğu kültür pozitif kabul edilir (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.2.17. Hemoliz testi

Çeşitli bakteri türlerinin tanımlanmasında hemoliz testinden yararlanılır. Hemolize neden olan bakteriyel ürünlerin kimyasal yapısı ve özellikleri farklı taksonlara göre değişiklik göstermektedir. Bakteri kolonilerinden kanlı vasatta ekimler yapılarak 25±2°C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonucunda alfa-hemoliz; kanlı vasatta bakteri kolonilerinin etrafında yeşilimsi zon oluşumu ile karakterize edilir. Beta-hemoliz ise bakteri kolonilerinin çevresinde berrak, renksiz bir zon oluşumu şeklinde görülür (Lányi 1988; Buller 2004; Tiwari vd. 2009).

3.2.3. *L. garvieae*'den DNA İzolasyonu

L. garvieae suşlarının DNA izolasyonunda ticari bakteriyel ve maya genomik DNA saflaştırma kiti kullanılmıştır. Tür, Gram-pozitif bakteri türü olmasından dolayı lizozim basamağında izolasyon çalışmalarına dahil edilmiştir. İzolasyon sonrası DNA yoğunluğunun absorpsiyon değerleri spektrofotometrede ölçülerek, milimetredeki mikrogram miktarları hesaplanarak elution tamponu ile farklı sulandırma oranları kullanılıp 1 µg/ml'ye ayarlanılmıştır. DNA örnekleri, PZR çalışmalarında kullanılabilecek kadar -20°C de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir (Temizkan ve Arda 2004).

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzole edilen ve -20°C’de saklanan DNA örnekleri çalışma öncesi oda sıcaklığında çözündürülmüştür. PZR reaksiyon karışımı için üretici firmanın hazırlamış olduğu kullanım kılavuzuna göre 50 µl’lik olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR reaksiyonu hazırlanmıştır (Çizelge 3.1). PZR için kullanılan primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim
5X MyTaq reaksiyon buffer	10µl
DNA	5µl
Primer F	1µl
Primer R	1 µl
MyTaq Hs DNA Polimeraz	1µl
ddH ₂ O	32µl
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 3.2. *L. garvieae*’nin tanımlanmasında kullanılan primerler (Zlotkin vd. 1998; Aoki vd. 2000)

Primer	Primer dizisi	bç
PLG	F:5'-CATAACAATGAGAATCGC-3' R:5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3'	1100
SA1B10	F:5'-CATTTTACGATGGCGCAG-3' R:5'- CGTCGTGTTGCTGCAACA-3'	709

PLG primer çiftleri için PZR döngüsü; ilk denatürasyonda 95°C de 3 dakika, primerlerin bağlanması (annealing) 44°C de 15 saniye, uzama (extension) 72°C de 10 saniye olmak üzere 30 döngüye ayarlanmıştır. Son aşamada 72°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir (Zlotkin vd. 1998).

SA1B10 primer çiftleri için PZR döngüsü; ilk denatürasyonda 95°C’de 30 saniye, primerlerin bağlanması (annealing) 58°C de 30 saniye, uzama (extension) 72°C de 1 dakika olmak üzere 30 döngüye ayarlanmıştır. En son 72°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir (Aoki vd. 2000). PZR ürünleri jel elektroforez de yürütülene kadar -20°C de saklanmıştır.

3.2.5. *L. garvieae*’de Virülans Genlerinin Tespiti

L. garvieae suşlarındaki virülans genlerinin tespiti için (H1, H2, H3, LP1, LP2, LP3, LP4, SOD, AP, APSA ve fbp) primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3)

Fbp primer çifti dışındaki diğer primerler çiftleri için PZR döngüsü ilk denatürasyon 95°C de 3 dakika, primerlerin bağlanması (annealing) 52-56°C de 30

saniye, uzama (extension) 72°C de 60 saniye olmak üzere 35 döngü şeklinde yapılmıştır. Son aşamada 72 °C de 10 dakika süre ile inkübe edilmiştir (Türe ve Altınok 2016).

Fbp için ilk denatürasyon 94 °C de 2 dakika, primerlerin bağlanması (annealing) 60 °C de 60 saniye, uzama 72 °C de 1 dakika olmak üzere 35 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Son aşamada 72 °C de 7 dakika süre ile inkübe edilmiştir (Eraclio vd. 2018).

Çizelge 3.3. Virülans genlerin tespiti için kullanılan primer çiftleri (Türe ve Altınok 2016; Eraclio vd. 2018)

Hedef gen	Primer	Primer dizisi	bç	BS (°C)
Hemolizin1	H1	F:5'-CATAACAATGAGAATCGC-3' R: 5'-GCACCCTCGCGGGTTG-3'	521	54
Hemolizin2	H2	F: 5'-TCTCGTGCACACCGATGAAA-3' R: 5'-TGAACCTCGGCTTCTGCGAT-3'	492	53
Hemolizin3	H3	F: 5'-AACGCGAGAACAGGCCAAAAC-3' R: 5'-CCCACGTCGAGAGCATAGAC-3'	291	56
Süperoksit dizmutaz	SOD	F: 5'-GCAGCGATTGAAAAACACCCA-3' R: 5'-TCTTCTGGCAAACGGTCCAA-3'	80	54
Adhesin Pav	AP	F: 5'-CCTGTCTGGGCGCTTTTATTG-3' R: 5'-TCCC GAAGAAGAGTACGGT-3'	232	56
Adhesin PsaA	APSA	F: 5'-GTTGCAACAGCTGGACACAG-3' R: 5'-ATACGGTTGAGTTGGGCTGG-3'	180	54
LPXTG-1	LP1	F: 5'-GTGAACGTGGAGCTTCCAGA-3' R: 5'-CCACTCACATGGGGGAGTTC-3'	878	54
LPXTG-2	LP2	F: 5'-GCCAGTGAGAGAACCGTTGA-3' R: 5'-CAGGTTCAAGTGCAACTGCC-3'	767	54
LPXTG-3	LP3	F: 5'-TTAAGCACAAACGGCAACAGC-3' R: 5'-CACGCGAAATGATGGTGCAT-3'	231	54
LPXTG-4	LP4	F: 5'-GGGAGCACCGGATTCACCTT-3' R: 5'-ACAAAGCCGCAGACCTTACA-3'	928	52
Fibronektin bağlayıcı	fbp	F: 5'-CGGTTTCGTTTCAGGAAGAATC-3' R: 5'-CGGTCATTGCCTACTTGCTCAA-3'	181	60

3.2.6. Jel Elektroforez Yöntemi ile Görüntüleme

%1 agaroz jel hazırlayabilmek amacı ile 100 ml 1XTBE tamponu eldesi için 5XTBE tamponu (54 g Trisma base, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA, pH 8.3) 80:20 ml (saf su: tampon) olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır (Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5). 1XTBE tamponu içerisine 1 g agaroz eklenerek mikrodalga fırında eritilmiş ve 50-60 °C'ye kadar soğuması beklenmiştir. Daha sonra soğuyan agaroz 2 µl etidyum bromid solüsyonu ilave edilmiştir. Elektroforez cihazının tarakları yerleştirildikten sonra, tablasına hazırlanan jelden dökülerek jelin donması beklenmiştir. DNA marker olarak 1000 bç'lik, 100 bç'lik ve 50 bç'lik markerler kullanılmıştır. İlk kuyucuğa marker 5 µl olacak şekilde eklenmiştir. Diğer kuyucuklara ise PZR

ürününden 4 µl alınıp 1 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Örnekler 70-100 V da 60-100 dakika boyunca yürütülmüştür. Bu süre sonunda agaroz jelde yürütülen bantların görüntülenmesi U.V. lambası altında transililatörde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. TBE tamponunun hazırlanışı

5X TBE Tamponu (pH: 8.3)	
Trizma base	54 g
Borik asit	27,5 g
0,5 M EDTA (8,3 pH)	20 ml

Çizelge 3.5. 0.5 M EDTA'nın hazırlanışı

0.5 M EDTA (pH: 8.0)	
EDTA	18,6 g
dH ₂ O	100 ml

3.2.7. Antibiyotik duyarlılık testi

3.2.7.1. Standart disk difüzyon yöntemi

Bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri *in vitro* koşullarda yapılmıştır. Bu amaçla; standart disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Test için bakteri suşları Mueller-Hinton buyyonunda (MHB) 25 ± 2 °C de 16-18 saat süre ile inkübe edilmiştir. Bakteriyel süspansiyonun bulanıklığı Mueller-Hinton agarlı (MHA) Petri kutularının yüzeyine yayılmadan önce McFarland No 0.5 (1.5×10^8 CFU/ml)'e göre ayarlanmıştır. Ticari antibiyotik disklerinin besiyeri yüzeyine yerleştirilmesinden sonra Petri kutuları aerobik koşullarda 25 ± 2 °C de 24 ila 28 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disk difüzyon çapları ölçülüp kaydedilerek elde edilen sonuçlara göre, suşların antibiyotik duyarlılıkları hassas, orta dirençli ve dirençli olarak belirlenmiştir (EUCAS 2022).

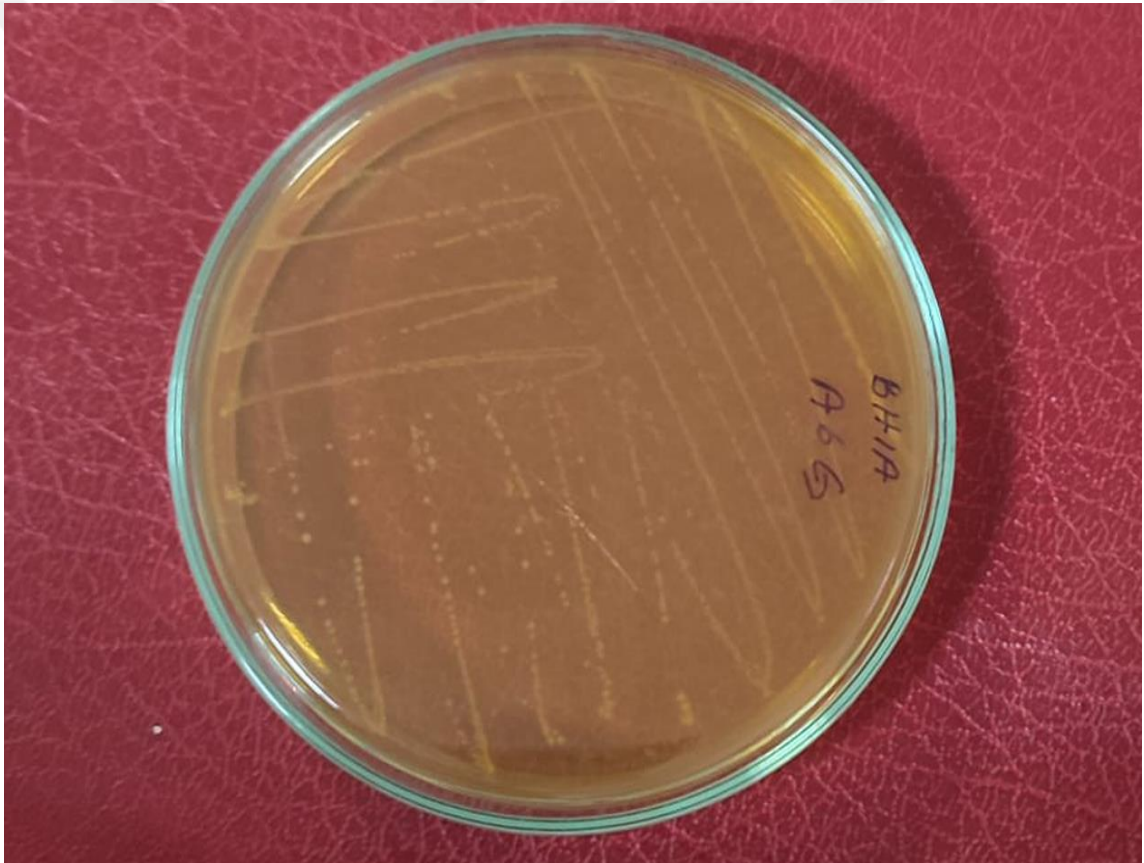
Çalışmada kullanılan antibiyotikler şunlardır: amoksisilin (25 µg), ampicilin (10 µg), basitrasin (0.04 µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15 µg), flumekuini (30 µg), furazolidon (100 µg), florfenikol (30 µg), kanamisin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), oksasilin (1 µg), oksitetrasiklin (30 µg), streptomisin (10 µg), sülfametoksazol (100 µg), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/sülfametoksazol (15 µg).

4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri Suşlarının Fenotipik Bulguları

4.1.1. Bakteri suşlarının koloni morfolojilerine ait bulgular

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen ve tamamlanmış olan FBA-2018-3089 Normal Araştırma Projesi kapsamında Antalya/Kemer'deki ticari alabalık işletmelerinden izole edilen liyofilize edilen *L. garvieae* suşları (10 suş) Beyin Kalp İnfüzyon buyyon (BHIB)'a inoküle edilip 25 ± 2 °C de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda sıvı besiyerinden Beyin Kalp İnfüzyon agar (BHIA)'lı Petri kutularına ekimleri yapılarak alt kültürleri hazırlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bakterilerin besiyeri yüzeyinde küçük, 0.5-1 mm çapında beyaz renkli ve yuvarlak koloniler oluşturdıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

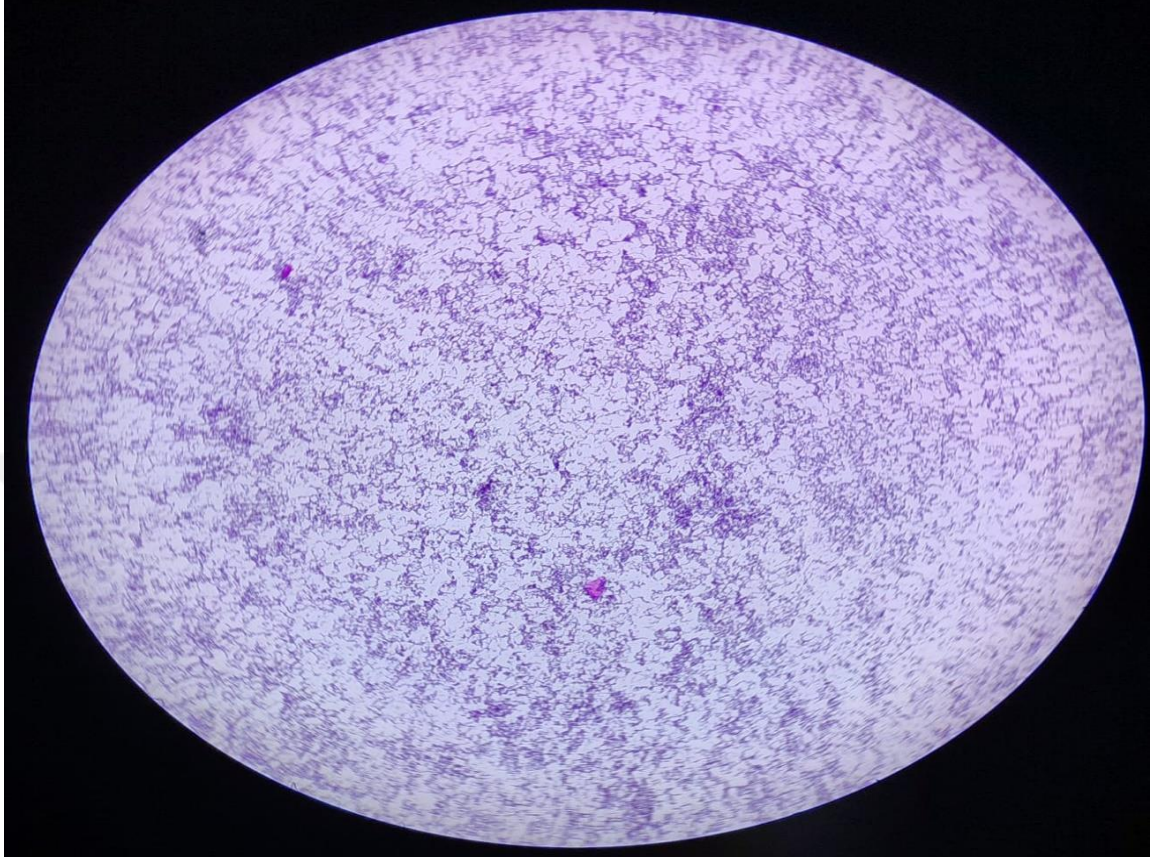


Şekil 4.1. *L. garvieae* suşuna ait 0.5-1.0 mm çapında küçük kolonilerin görüntüsü

4.1.2. Bakteri suşlarının hücre morfolojilerine ait bulgular

Bakteri suşlarının mikroskopik morfolojisinin tespiti için bakteri kolonilerinden preparatlar hazırlanarak, Gram-boyama yöntemi ile boyanmıştır. Bakteri suşlarının Gram-pozitif, oval-kok şekilli ve kısa zincirler oluşturdıkları ışık mikroskobu altında

tespit edilmiştir (Şekil 4.2). *L. garvieae* suşlarının kapsül boyaması sonucuna bakıldığında ise kapsülsüz oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.2. *L. garvieae* suşunun Gram boyama sonrası ışık mikroskopunda görüntüsü (100X büyütme)

4.1.3. Bakteri suşlarının hareket özelliklerine ait bulgular

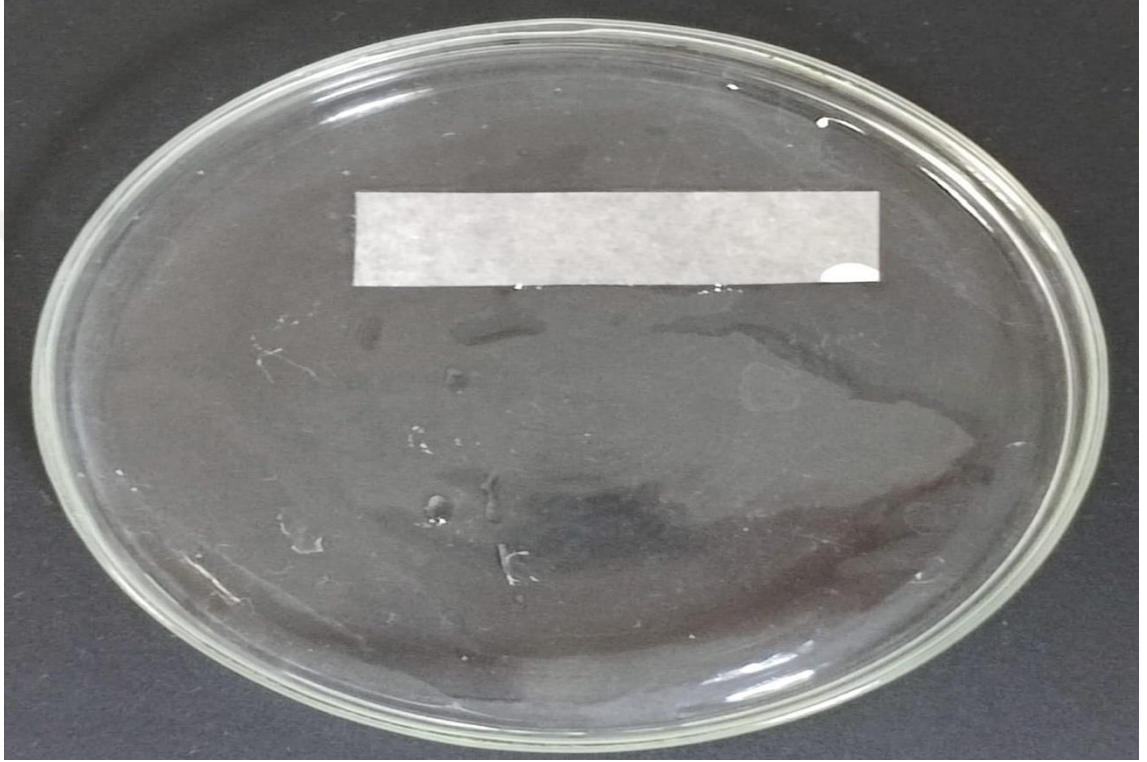
Asılı damla yöntemi kullanılarak çukur lamda hazırlanan preparatların ışık mikroskobu ve yarı yatık agar ile yapılan çalışma sonuçlarına göre bakteri suşlarının hareketsiz olduğu gözlemlenmiştir.

4.1.4. Bakteri suşlarının biyokimyasal özelliklerine ait bulgular

Suşların sitokrom oksidaz ve katalaz negatif (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4), fermentatif (Şekil 4.5) olup %5 koyun kanı içeren besiyerinde alfa (α)-hemoliz oluşturdıkları (Şekil 4.6), Voges-Proskauer (VP) reaksiyonu pozitif (Şekil 4.7), metil kırmızısı reaksiyonuna pozitif (Şekil 4.8) yanıt verdiği ve TSI agarda gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. Suşların H_2S üretimi, Simmon's sitrat, nitrat indirgeme reaksiyonları (Şekil 4.9) ve indol üretimleri negatif (Şekil 4.10), MacConcey agarda gelişme göstermedikleri (Şekil 4.11), jelatin hidrolizi (Şekil 4.12) ile nişasta hidrolizi negatif reaksiyon verdikleri %0 ile %6 NaCl dahil olmak üzere farklı tuzluluk oranlarında gelişme gösterdikleri (Şekil 4.13) ancak %8 NaCl ilaveli Nütrient buyyonunda ise gelişemedikleri, 4 °C ila 37 °C

dahil olmak üzere farklı sıcaklıklarda geliştikleri, Beta Galaktosidase (ONPG) enzimini kullandıkları tespit edilmiştir. Ayrıca bakteri suşlarının arjinini dihidrolize ederken, lizin ve ornitini dekarboksile etmediğini bulunmuştur. Glukoz, galaktoz, mannitol, *D*-fruktoz, *D*-mannoz ve sorbitol'den asit üretirken laktoz, sükroz, rafinoz, inositol, arabinoz ve ksilozdan asit üretmedikleri bulunmuştur.

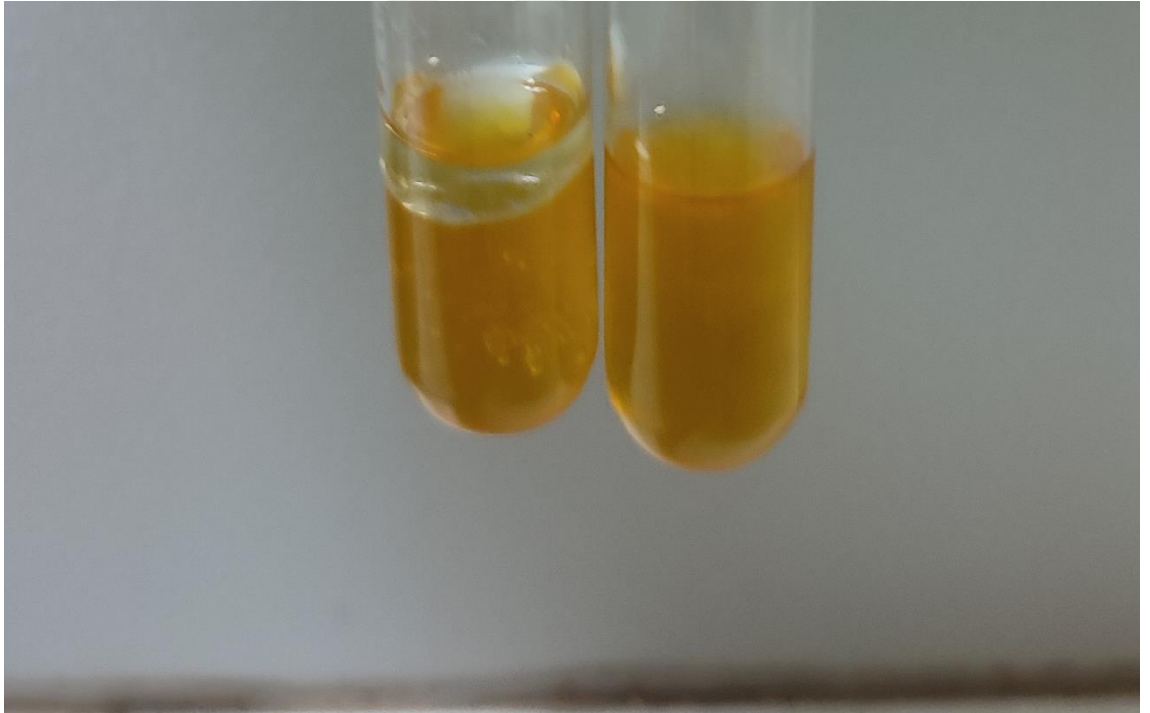
L. garvieae suşunun biyokimyasal özelliklerine ait bulgular Çizelge 4.1. de verilmiştir.



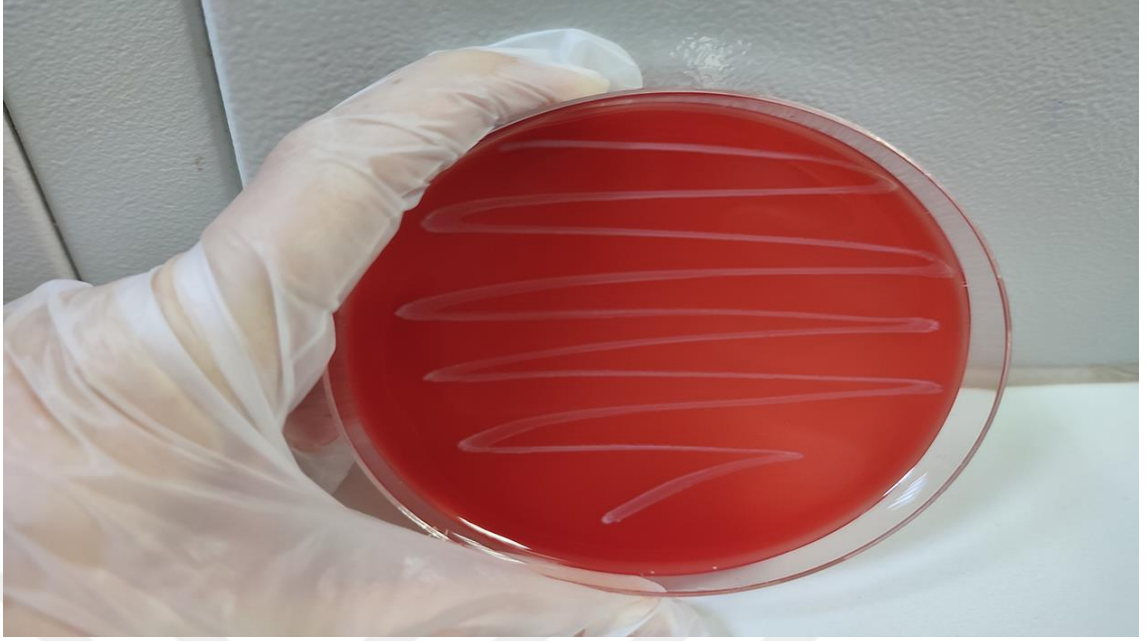
Şekil 4.3. *L. garvieae* suşunun sitokrom oksidaz test sonucu (negatif reaksiyon)



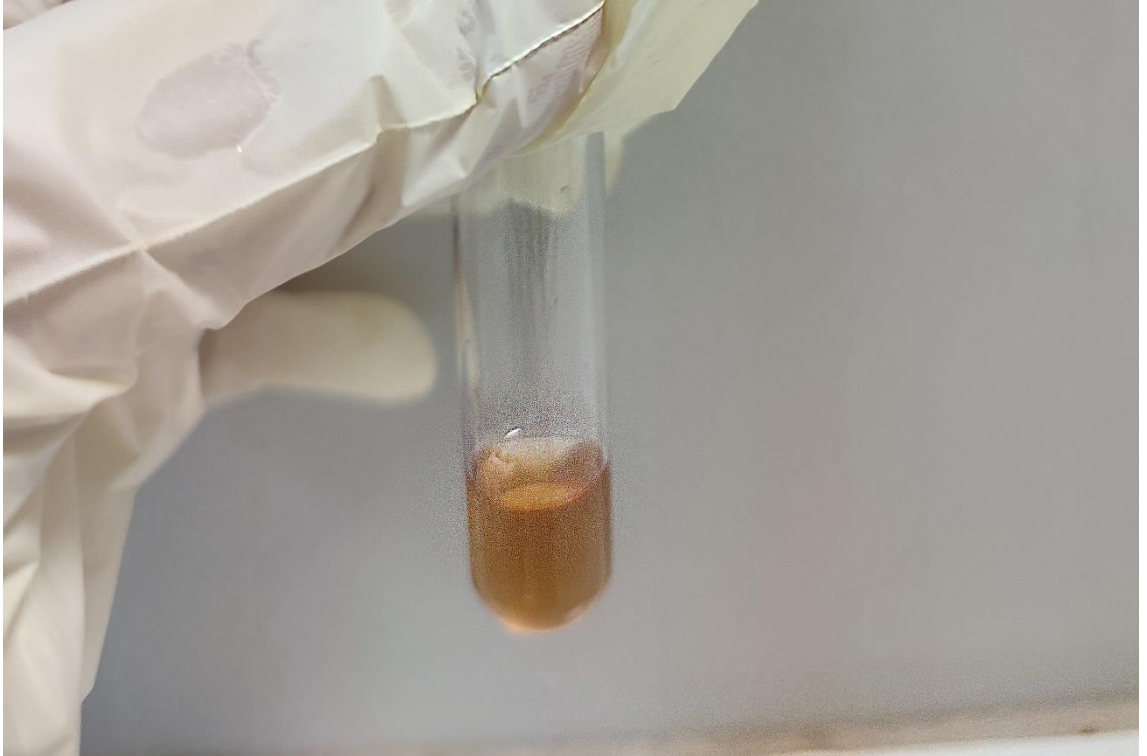
Şekil 4.4. Bakteri suşunun katalaz enzim aktivitesi (negatif reaksiyon)



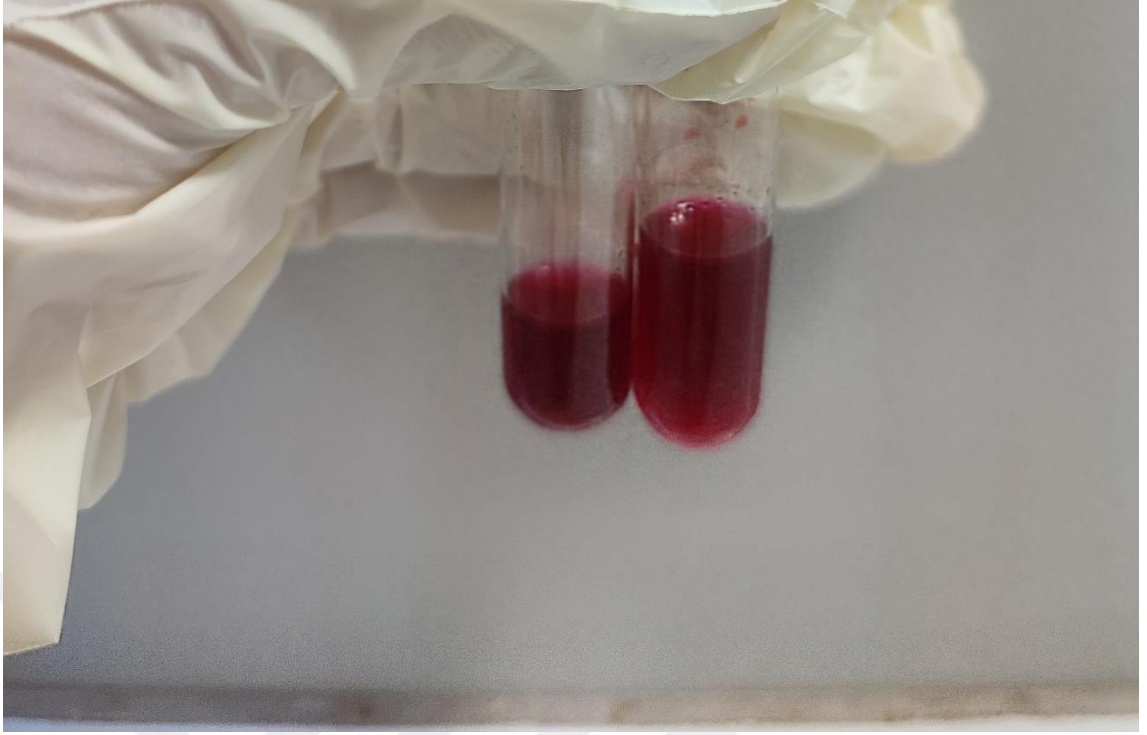
Şekil 4.5. O/F besiyerinde fermentatif bakteri suşu



Şekil 4.6. Kanlı vasatta alfa (α) hemoliz oluşumu



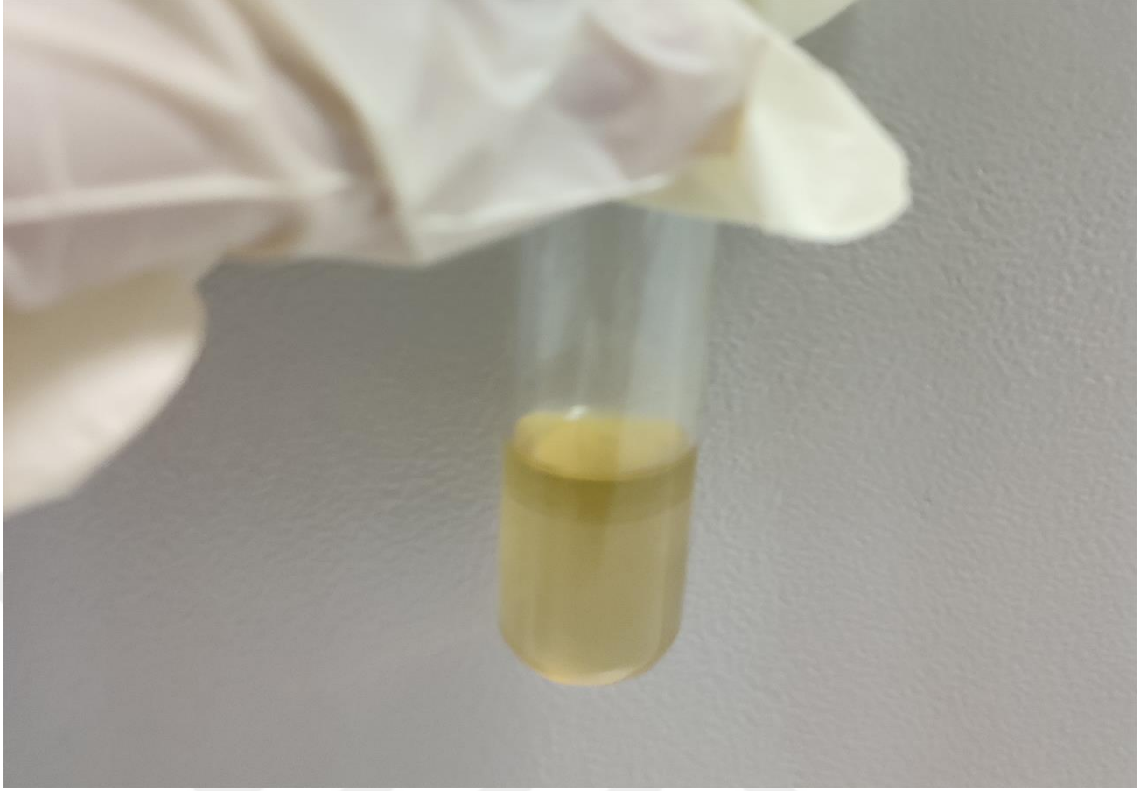
Şekil 4.7. Voges-Proskauer pozitif reaksiyon sonucu



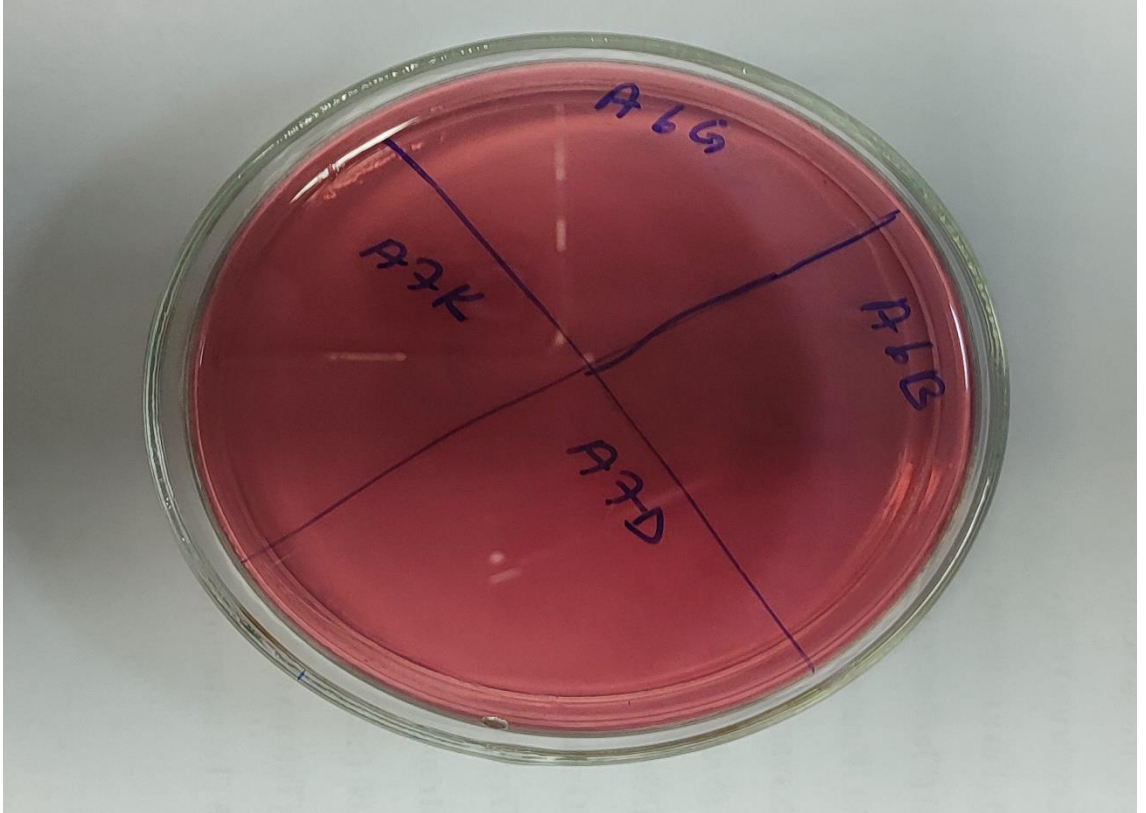
Şekil 4.8. Metil kırmızısı pozitif reaksiyon sonucu



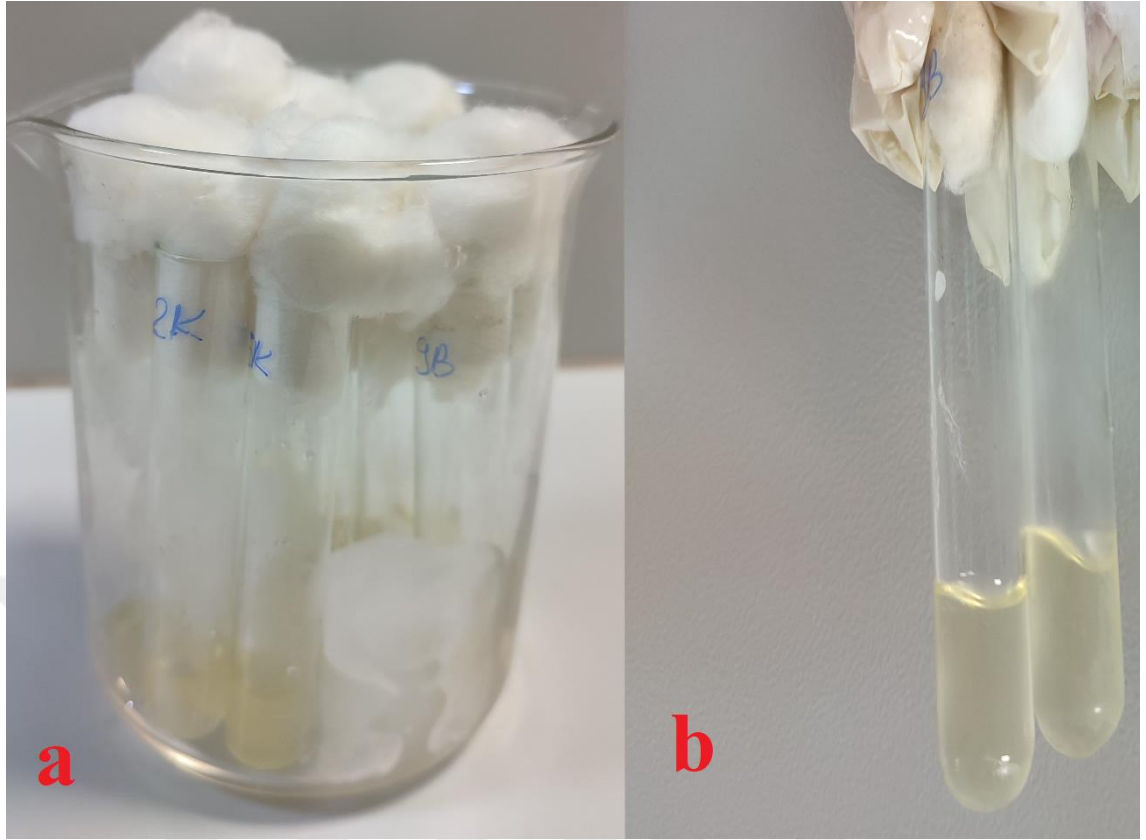
Şekil 4.9. Nitrat indirgenme negatif reaksiyon sonucu



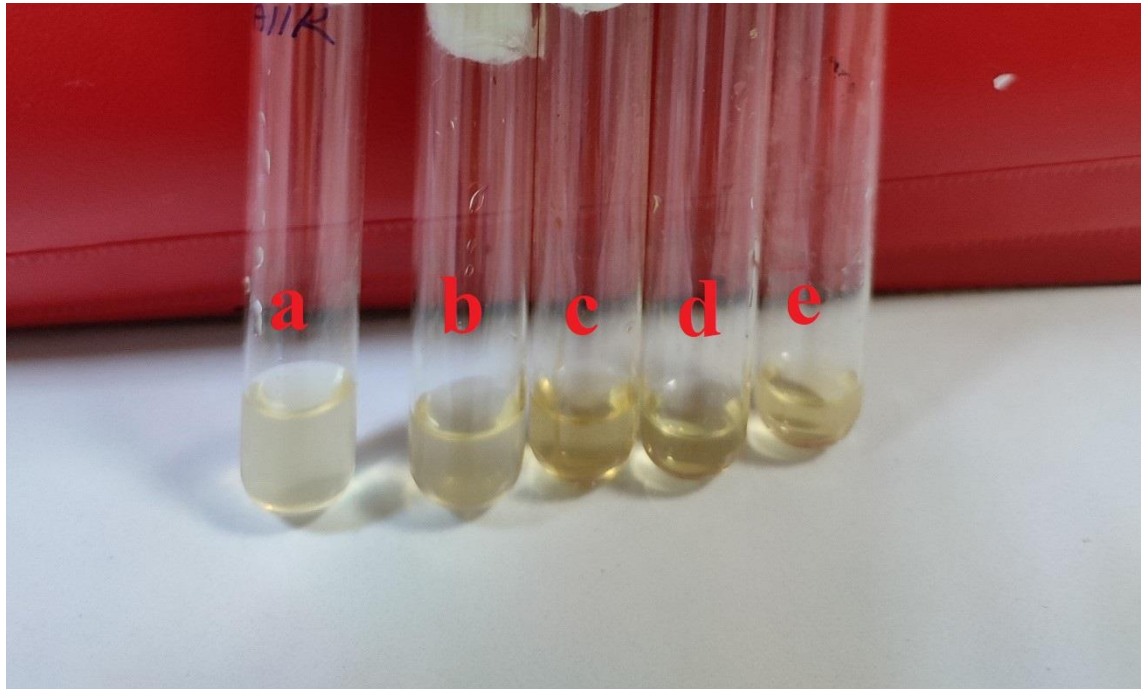
Şekil 4.10. İndol test sonucu (negatif reaksiyon)



Şekil 4.11. MacConkey agarda negatif üreme



Şekil 4.12. Suşların jelatin hidroliz sonuçları (**a:** buzda bekletme, **b:** negatif reaksiyon sonucu)



Şekil 4.13. Farklı tuzluluk derecelerinde gelişme (**a:**%0, **b:**%2, **c:**%4, **d:**%6, **e:**%8 NaCl)

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan *L. garvieae* suşlara ait fenotipik özellikler (Austin ve Austin 2016; Vendrell vd. 2006)

Özellikler	Mevcut çalışma 10 suş	Austin ve Austin (2016)	Vendrell vd. (2006)
Hücre morfolojisi	Kok	Kok	Oval kok
Gram boyama	+	+	+
Hareketlilik	-	-	-
Sitokrom oksidaz	-	-	-
Katalaz	-	-	-
O/F	F	F	F
Hemoliz	α	α	α
Simmon's sitrat	-	*	-
Nitrat indirgeme	-	-	-
Metil kırmızısı	+	+	*
Voges-Proskauer	+	+	+
İndol üretimi	-	-	-
Nişasta	-	*	*
TSIA	+	+	+
H ₂ S üretimi	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-
Büyüme			
0% NaCl	+	+	*
2% NaCl	+	+	*
4% NaCl	+	+	*
6% NaCl	+	+	+
8% NaCl	-	-	-
4°C	+	*	+

Çizelge 4.1.'in devamı

25°C	+	+	+
37°C	+	+	+
ONPG	+	*	*
Şekerlerden asit oluşumu			
Laktoz	-	-	(+)
D-glukoz	+	+	*
D-fruktoz	+	+	*
Galaktoz	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Sükroz	-	-	D
D-mannoz	+	+	+
Sorbitol	+	+	-
Rafinoz	-	-	-
İnositol	-	*	-
Arabinoz	-	-	-
D-ksiloz	-	-	-

+: pozitif, - : negatif, *: belirtilmemiş, F: Fermentatif, α: alfa hemolitik.

4.2. *L. garvieae* Suşlarının Antibiyogram Testi Bulguları

L. garvieae suşlarının antibiyogram test sonuçlarına göre suşların hepsinin oksasilline dirençli oldukları tespit edilmiştir. Suşların antibiyogram test sonuçları Çizelge 4.2; Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 de verilmiştir. Suşların antibiyogram test sonuçları EUCAST (2022)'a göre yapılmıştır. Bulgular Çizelge 4.2'de verilmiştir.

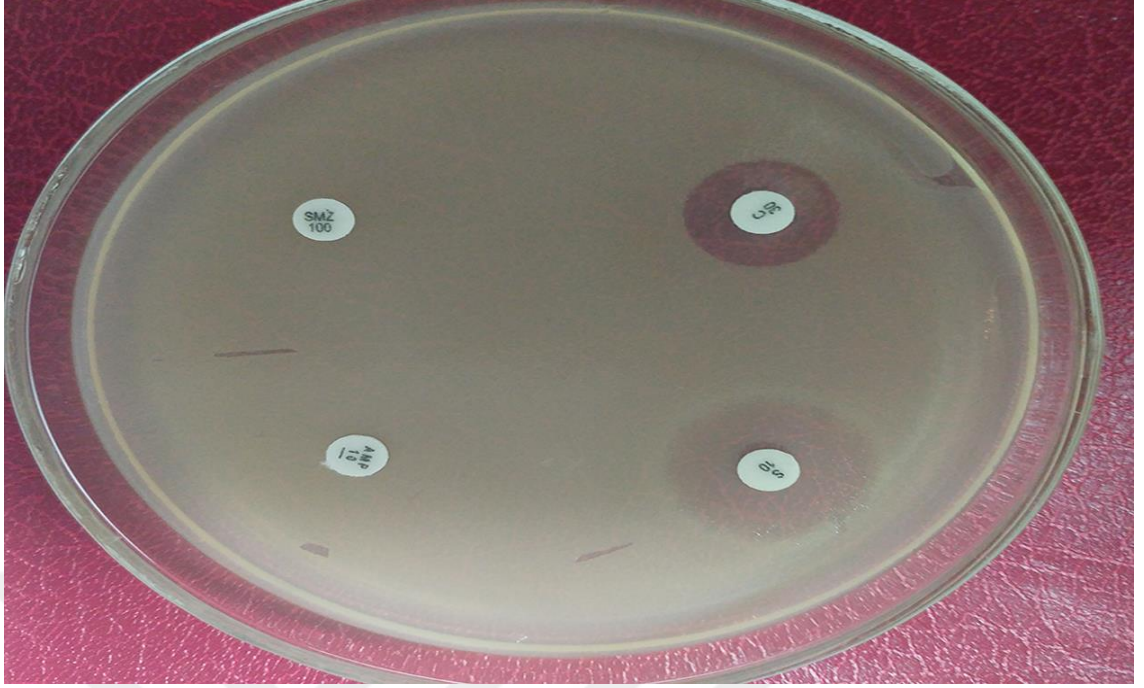
Çizelge 4.2. *L. garvieae* suşlarının antibiyogram testi sonuçları

<i>S. agalactiae</i>			Antibiyotik diskleri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H ≥19	I -	D ≤19mm	AX25	15	25	20	D	23	D	20	D	D	D
			AM10	16	20	D	20	D	D	D	D	D	20
			B10	15	20	D	20	D	25	D	D	D	D
			C30	D	20	25	20	30	20	35	30	25	25
H ≥21	I 21-18	D ≤18mm	ENR5	25	15	20	25	35	20	35	25	20	20
			E15	D	D	D	D	D	24	30	D	D	D
H ≥23	I 23-20	D ≤20mm	FX100	20	D	35	D	D	20	D	D	D	D
			FFC30	25	D	D	20	D	25	D	D	D	25
			FLM30	20	D	D	D	30	30	D	D	17	D
			K30	D	15	D	35	D	D	D	D	25	30
			NA30	D	D	D	D	D	D	D	D	18	20
			F300	28	20	20	20	25	20	20	D	15	20
			OX1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
			T30	D	D	25	30	D	D	21	15	D	30
			S10	35	D	15	20	D	D	30	D	D	25
			SMZ100	D	D	D	D	15	D	20	20	D	D
H ≥18	I 18-15	D ≤15mm	TE30	30	D	D	35	D	D	D	D	30	D
			SXT25	D	D	20	25	D	25	20	D	D	20

S. agalactiae için EUCAS (2022) tarafından bildirilen direnç zon çapı.

H: Hassas, D: Dirençli, O: Orta derecede dirençli.

AX25: Amoksisilin, AM10: Ampisilin, B10: Basitrasin, C30: Kloramfenikol, ENR5: Enrofloksasin, E15: Eritromisin, FX100: Furazolidon, FFC30: Florfenikol, FLM30: Flumekuın, K30: Kanamisin, NA30: Nalidiksik Asit, F300: Nitrofurantoin, OX1: Oksasillin, T30: Oksitetrasiklin, S10: Streptomisin, SMZ100: Sülfametoksazol, TE30: Tetrasiklin, SXT25: Trimetoprim/Sülfametoksazol



Şekil 4.14. Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik hassasiyetinin belirlenmesi



Şekil 4.15. *L. garvieae*'nin antibiyotiklere karşı gösterdiği dirençlilik

Antibiyoqram testi sonuçlarına göre;

Birinci suş; amoksisillin, ampisillin, basitrasin, enrofloksasin, furazolidon, florfenikol, flumequin, nitrofurantoin, streptomisin, tetrasikline duyarlı olduğu, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, nalidiksik asit, oksasilin, oksitetrasiklin, sülfametoksazol ve trimetoprim/sülfametoksazole dirençli olduğu bulunmuştur.

İkinci suş; amoksisillin, ampisillin, basitrasin, enrofloksasin, kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, nitrofurantoin duyarlı iken furazolidon, flumequin, florfenikol, nalidiksik asit, oksasilin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, streptomisin, sülfametoksazol ve trimetoprim/sülfametoksazole dirençli olduğu belirlenmiştir.

Üçüncü suş; enrofloksasin, furazolidon, oksitetrasiklin, tetrasiklin, amoksisillin, kloramfenikol, nitrofurantoin, trimetoprim/sülfametoksazol ve streptomisine duyarlı olduğu, ampisillin, basitrasin, eritromisin, florfenikol, flumequin, kanamisin, nalidiksik asit, oksasilin ve sülfametoksazole dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Dördüncü suş; kloramfenikol, enrofloksasin, nitrofurantoin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, streptomisin, ampisillin, basitrasin, florfenikol, kanamisin ve sülfametoksazole duyarlı amoksisillin, furazolidon, trimetoprim/sülfametoksazole, eritromisin, flumequin, nalidiksik asit, oksasiline dirençli olduğu bulunmuştur.

Beşinci suş; kloramfenikol, nitrofurantoin, tetrasiklin, sülfametoksazol amoksisillin ve flumequine duyarlı iken enrofloksasin, oksitetrasiklin, streptomisin, ampisillin, basitrasin, florfenikol, kanamisin, furazolidon, trimetoprim/sülfametoksazole, eritromisin, nalidiksik asit ve oksasiline dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Altıncı suş; kloramfenikol, nitrofurantoin, sülfametoksazol, flumequine, enrofloksasin, basitrasin, florfenikol, furazolidon ve eritromisine duyarlı olduğu tetrasiklin, amoksisillin, oksitetrasiklin, streptomisin, ampisillin, oksitetrasiklin, streptomisin, ampisillin, kanamisin, trimetoprim/sülfametoksazole, nalidiksik asit ve oksasiline dirençli olduğu bulunmuştur.

Yedinci suş; kloramfenikol, nitrofurantoin, sülfametoksazol, enrofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, amoksisillin, oksitetrasiklin, streptomisin ve trimetoprim/sülfametoksazole duyarlı iken flumequine, basitrasin, florfenikol, furazolidon, ampisillin, oksitetrasiklin, streptomisin, ampisillin, kanamisin, nalidiksik asit ve oksasiline dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Sekizinci suş; kloramfenikol, sülfametoksazol, enrofloksasin, oksitetrasikline duyarlı nitrofurantoin, eritromisin, tetrasiklin, amoksisillin, streptomisin, trimetoprim/sülfametoksazol, flumequine, basitrasin, florfenikol, furazolidon,

ampisillin, oksitetrasiklin, streptomisin, ampisillin, kanamisin, nalidiksik asit ve oksasiline direnç gösterdiği gözlemlenmiştir.

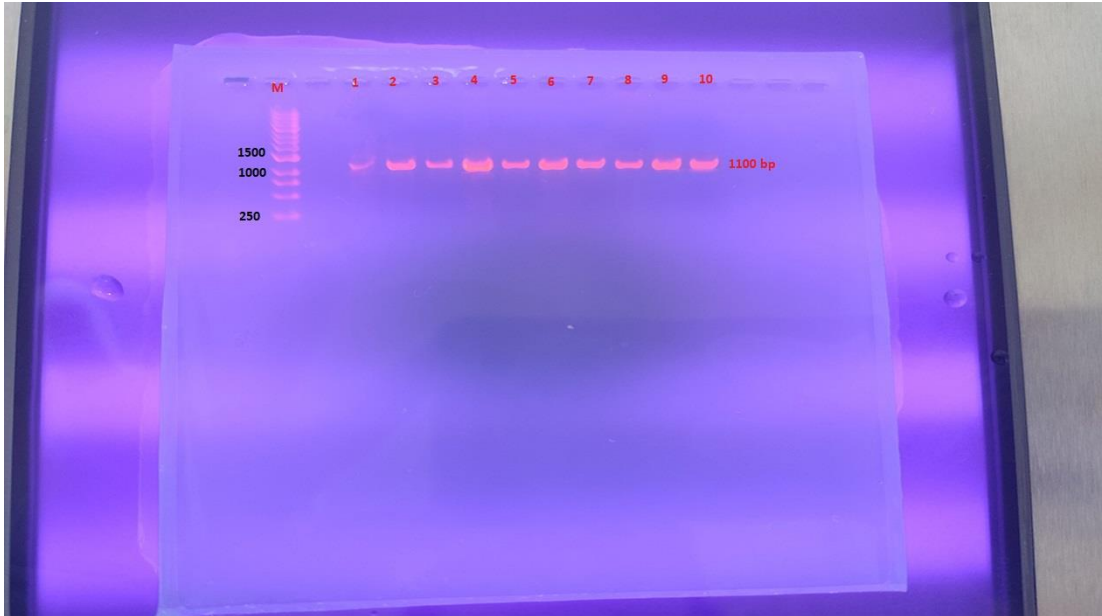
Dokuzuncu suş; kloramfenikol, enrofloksasin, nitrofurantoin, tetrasiklin, flumequin kanamisin ve nalidiksik asite hassas iken sülfametoksazol, oksitetrasiklin, eritromisin, amoksisillin, streptomisin, trimetoprim/sülfametoksazol, basitrasin, florfenikol, furazolidon, ampisillin, oksitetrasiklin, ampisillin ve oksasiline dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Onuncu suş; kloramfenikol, enrofloksasin, nitrofurantoin, tetrasiklin, sülfametoksazol, oksitetrasiklin, florfenikol, ampisillin, oksitetrasiklin ve streptomisine duyarlı flumequin, kanamisin, nalidiksik asit, eritromisin, amoksisillin, trimetoprim/sülfametoksazol, basitrasin, furazolidon, ampisillin ve oksasiline dirençli olduğu bulunmuştur.

4.3. Moleküler Çalışma Bulguları

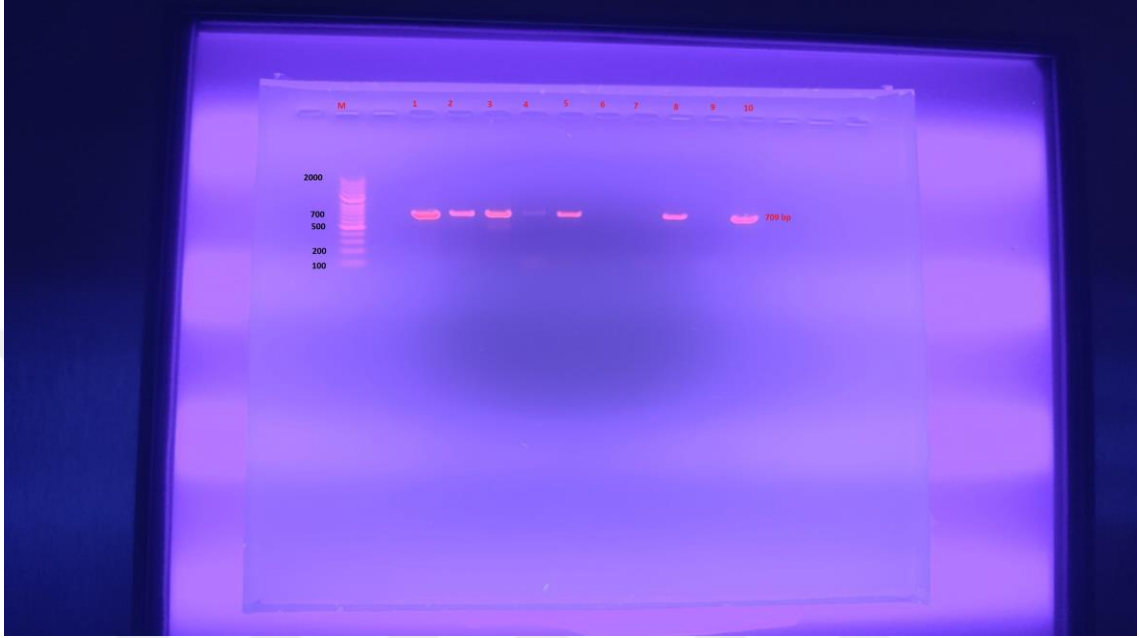
4.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) bulguları

Suşlar fenotipik özelliklerine göre *Lactococcus garvieae* olarak tanımlanmıştır. PZR tekniği uygulanarak çoğaltılan bakteriyel DNA örnekleri jel elektroforez de yürütülmüştür. Jelde yürütme sonunda çalışmada kullanılan 10 suştan 10'u pozitif sonuç vererek PLG-1 ve PLG-2 primer çifti için 1100 bp'lık amplifikasyon tespit edilmiştir. (Şekil 4.16). PZR çalışma sonuçlarına göre suşlar *L. garvieae* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.16. *L. garvieae* suşlarının PLG primerleri ile tanımlanması

Çalışmada *L. garvieae*'nin tanısında PLG-1 ve PLG-2 primer çifti kullanılmıştır. PLG-1 ve PLG-2 primerlerinin tür tespitinde doğruluğunu teyit etmek amacı ile toplam 10 suşa SA1B10-F ile SA1B10-R primer çifti kullanılmıştır. PZR çalışma sonuçlarına göre 7 suş pozitif sonuç vererek 709 bp'lik amplifikasyon oluşturarak *L. garvieae* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.17). Üç bakteri suşu ise negatif sonuç vermiştir.



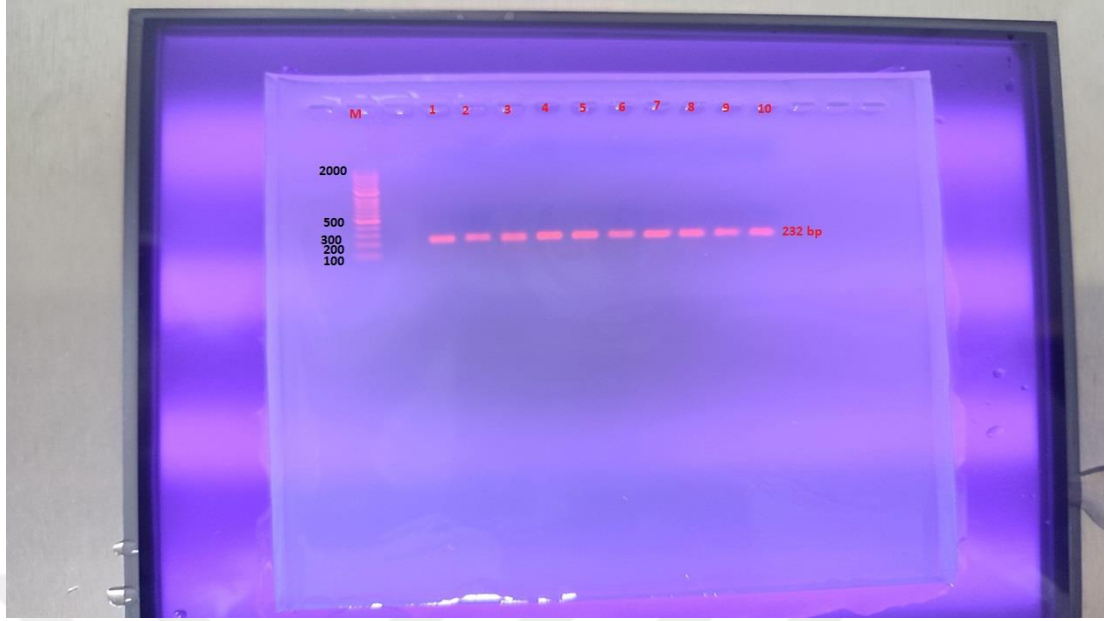
Şekil 4.17. SA1B10 primer çifti kullanılarak yapılan PZR çalışması

4.3.2. Virülans Genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Bulguları

Çalışmada kullanılan 10 *L. garvieae* suşunun hepsinin *hlyII*, *hlyIII*, *adhPav* ve *adhPsaA* virülans genlerini taşıdığı, suşların bazılarında *SOD*, *LPXTG-1*, *LPXTG-3*, *fbp* ve *hlyI* virülans genlerinin bulunduğu ancak çalışılan tüm suşlarda ise *LPXTG-2* ve *LPXTG-4* virülans genlerinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

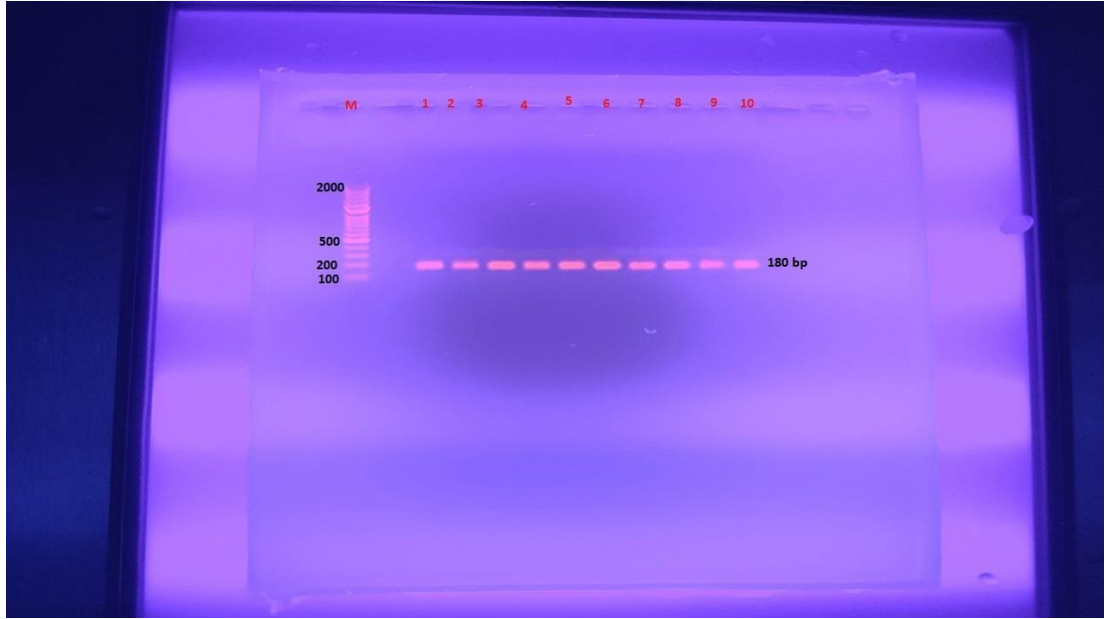
4.3.2.1. Adezyon virülans genleri bulguları

10 suşun hepsinde AdhesinPav (*adhPav*) virülans geni pozitif sonuç vererek 232 bp'lik amplifikasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



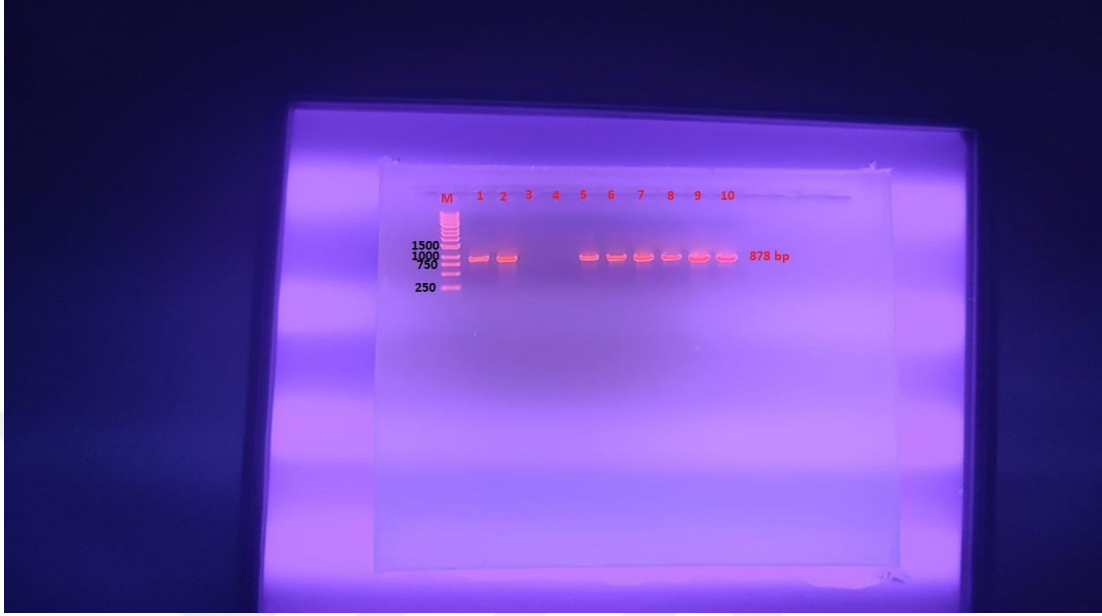
Şekil 4.18. AdhesinPav virölans geninin tespit edildiği *L. garvieae* suşları

10 suşun hepsi AdhesinPsaA (*adhPsaA*) virölans geni pozitif sonuç vererek 180 bç'lik amplifikasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



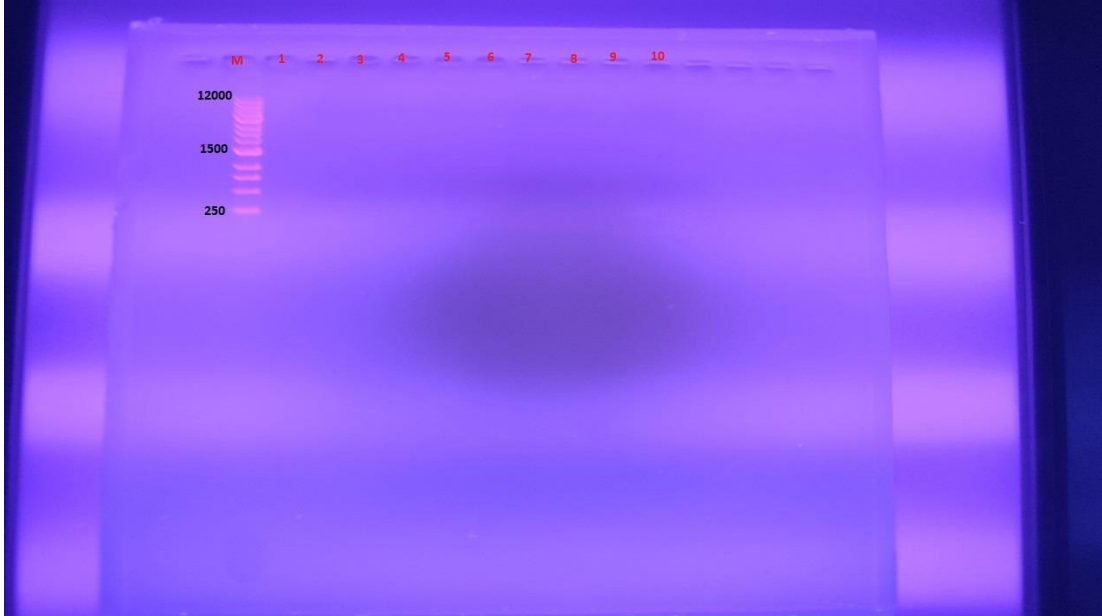
Şekil 4.19. AdhesinPsaA virölans geninin varlığının tespit edildiği *L. garvieae* suşları

LPXTG gen kümesinin varlığının tespitinde *LPXTG-1* geni için 10 suştan 9'u pozitif iken 1 tanesi negatif sonuç vererek 878 bp'lık amplifikasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



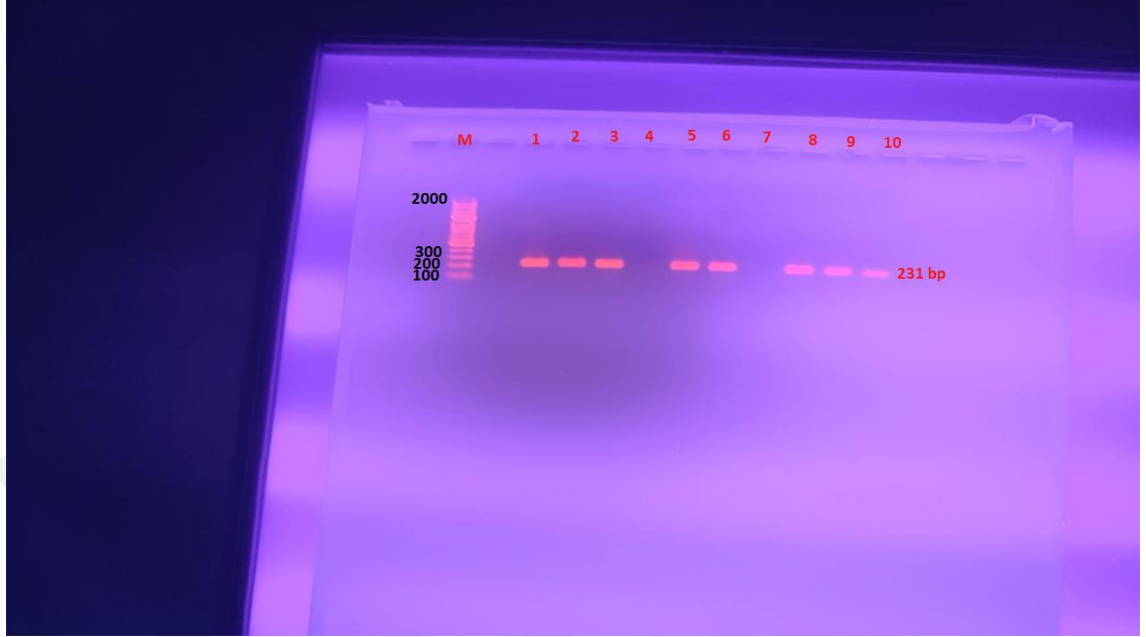
Şekil 4.20. *LPXTG-1* geni için yapılan PZR sonuçları

LPXTG-2 geni için çalışmada kullanılan 10 suşun hepsi negatif sonuç vermiştir (Şekil 4.21).



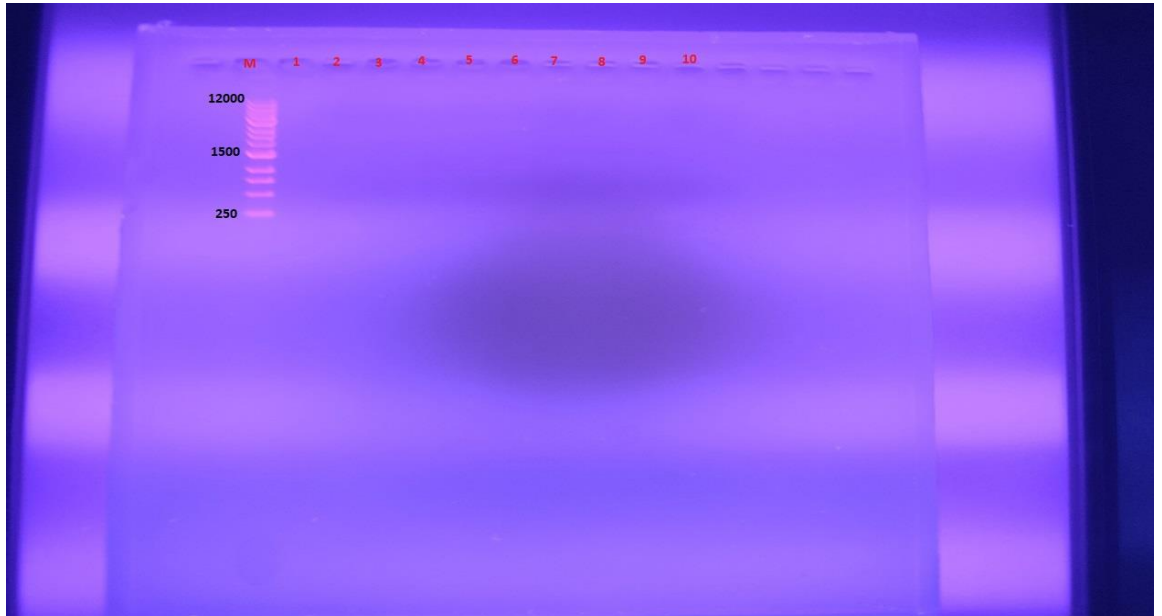
Şekil 4.21. *LPXTG-2* geni için yapılan PZR sonuçları

LPXTG-3 virölans geninde ise 10 tane suşun 8'i pozitif 2'si negatif sonuç vererek 231 bç'lik amplifikasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *LPXTG-3* genin tespiti için yapılan PZR çalışmasının sonuçları

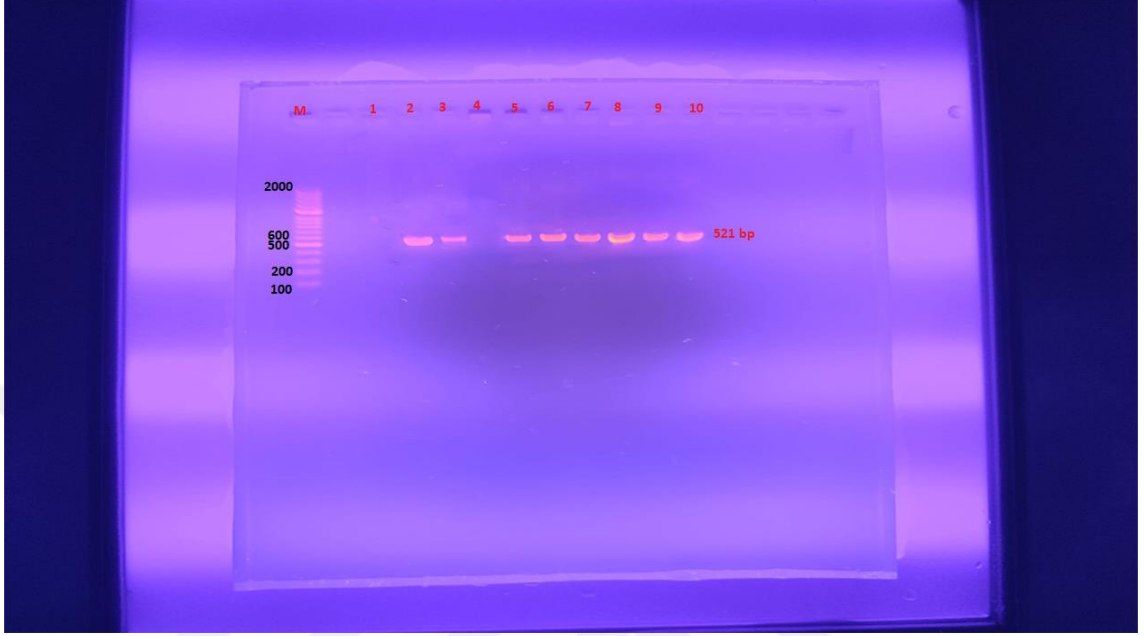
LPXTG-4 virölans geninde ise yapılan PZR sonuçlarına göre 10 suşun hepsinde negatif amplifikasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. *LPXTG-4* virölans geni için yapılan PZR çalışması

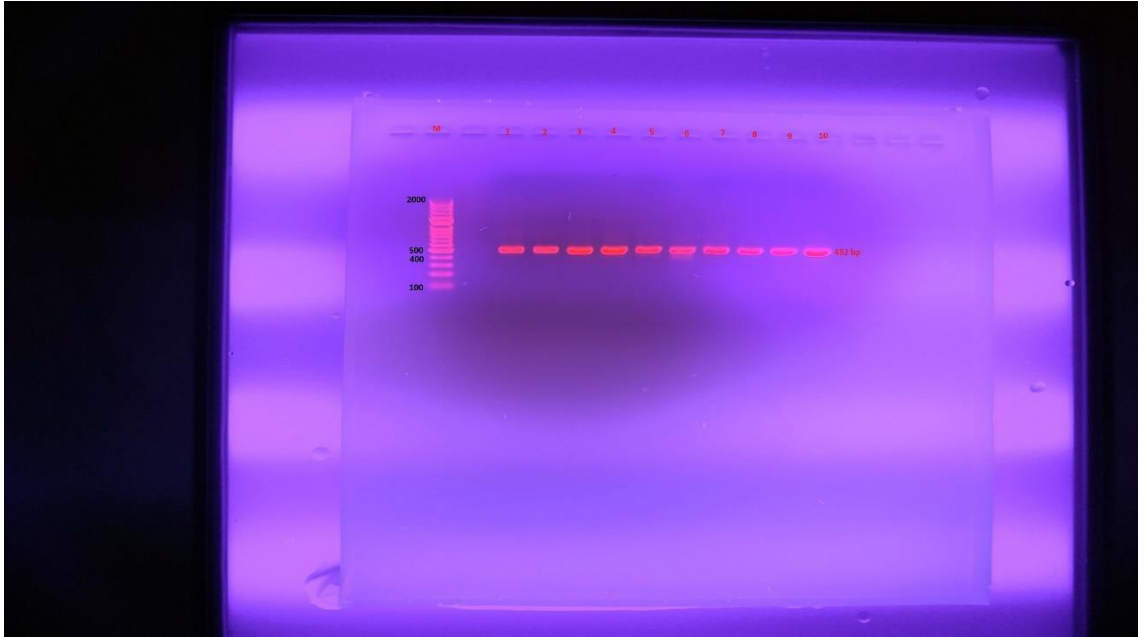
4.3.2.2. Hemolizin virölans genleri bulguları

Hemolizin-1 geni (*hlyI*) için 10 *L. garvieae* suşundan 8'i pozitif 2'si negatif sonuç vererek 521 bç'lik amplifikasyon gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.24).



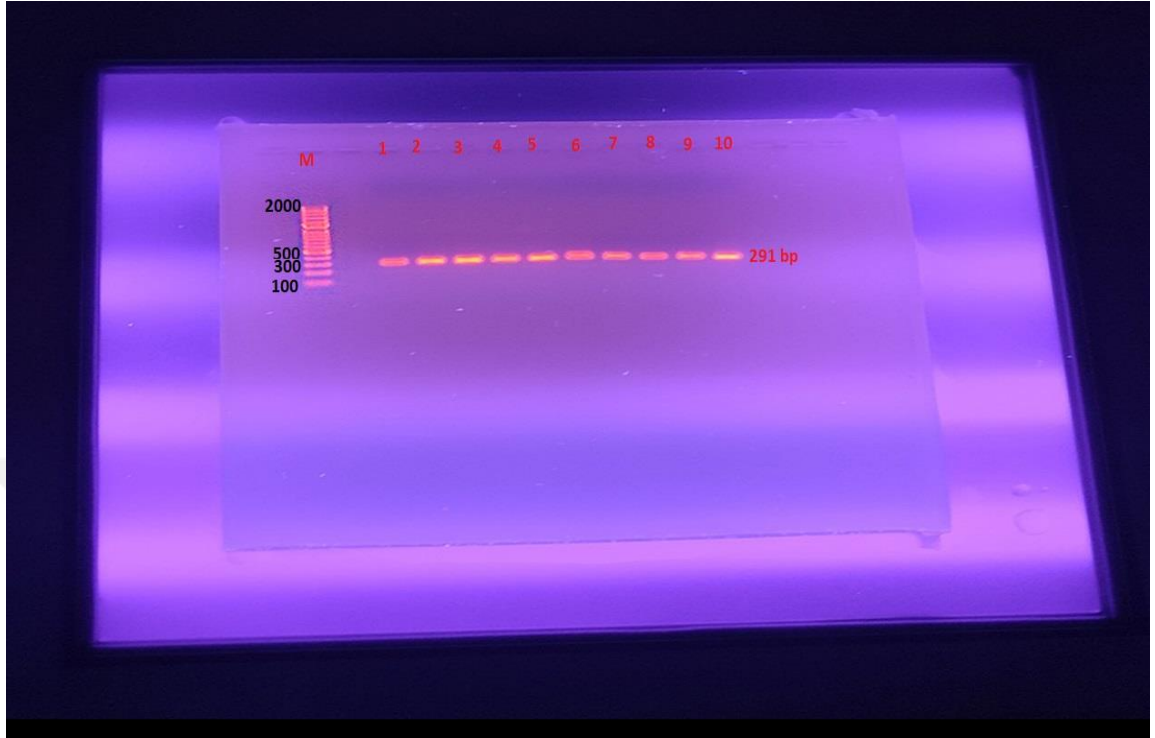
Şekil 4.24. Hemolizin-1 (*hlyI*) için PZR sonuçları

Hemolizin-2 geni (*hlyII*) için 10 *L. garvieae* suşunun hepsi 492 bç'lik amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Hemolizin-2 (*hlyII*) geni için PZR sonuçları

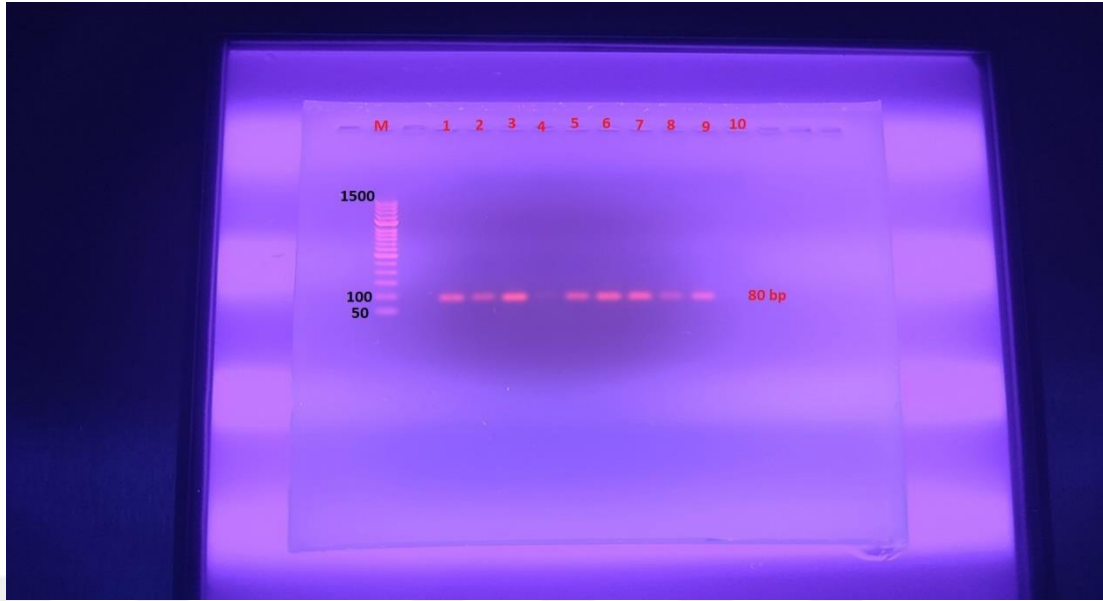
Hemolizin-3 geni (*hlyIII*) için 10 *L. garvieae* suşunun hepsi 291 bç'lik amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Hemolizin-3 (*hlyIII*) geni için yapılan PZR sonuçları

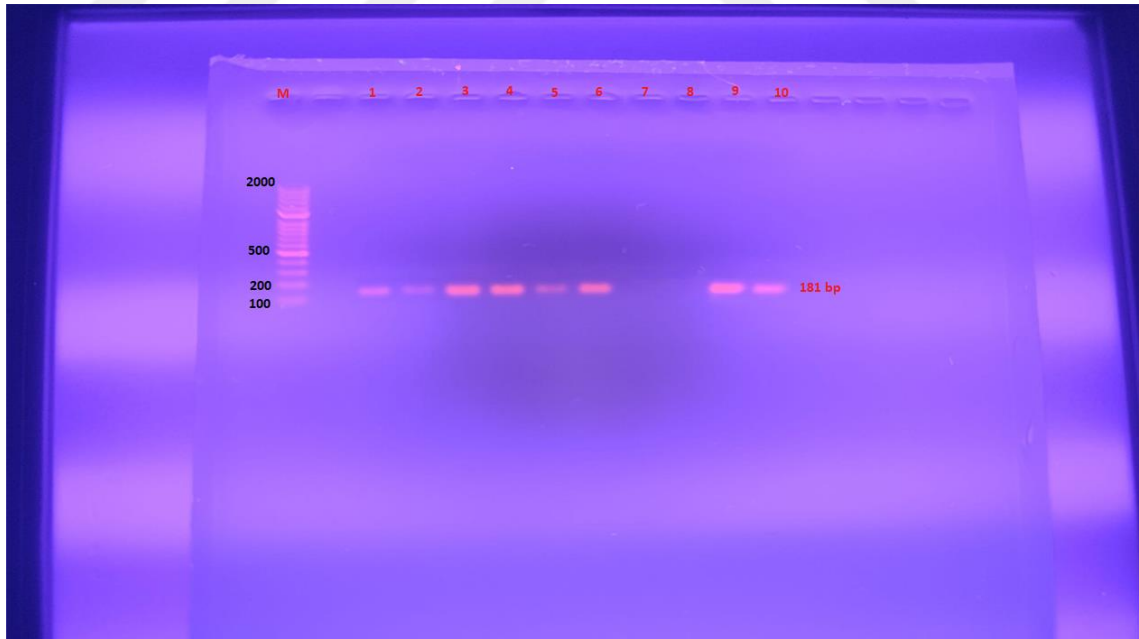
4.3.2.3. Diğer virülans genlerinin bulguları

Süperoksit dizmutaz (SOD) geninin tespiti için 10 *L. garvieae* suşuna yapılan PZR çalışması sonuçlarına göre 9 suş pozitif 1 suş ise negatif sonuç vererek 80 bç'lik amplifikasyon gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Süperoksit dizmutaz (SOD) geninin varlığının tespiti için yapılan PZR sonuçları

Fibronektin bağlayıcı protein (*fbp*) geninin varlığı belirlemek amacı ile 10 *L. garvieae* suşlarına yapılan PZR sonuçlarına göre 8 suş pozitif 2 suş negatif sonuç vererek 181 bç'lik amplifikasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Fibronektin bağlayıcı protein (*fbp*) geninin tespiti için yapılan PZR sonuçları

Çizelge 4.3. *L. garvieae* suşlarında *adhPav*, *adhPsaA*, *SOD*, *hlyI*, *hlyII*, *hlyIII*, *LPXTG-1*, *LPXTG-2*, *LPXTG-3*, *LPXTG-4*, *fbp* virülans genlerinin varlığı

Suş	<i>hlyI</i>	<i>hlyII</i>	<i>hlyIII</i>	<i>SOD</i>	<i>adhPav</i>	<i>adhPsaA</i>	<i>LPXTG-1</i>	<i>LPXTG-2</i>	<i>LPXTG-3</i>	<i>LPXTG-4</i>	<i>fbp</i>
A1D(1)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
A11B(2)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
A11K(3)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
A8B(4)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
A7G(5)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
A2D(6)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
A12D(7)	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
A3K(8)	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
A1B(9)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
A4D(10)	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+

+ : gen var; - : gen yok

5. TARTIŞMA

Laktokokkozis gökkuşağı alabalığı kültürünü etkileyen önemli bakteriyel enfeksiyonlar arasında yer alır. Bu çalışma ile daha önceki proje çalışmasından izole edilen ve *L. garvieae* olarak tanımlanan 10 suşun yeniden tatımlanması yapılarak, bu 10 suşta bazı virülans genlerinin bulunup bulunmadığını ortaya koyulması amaçlanmıştır.

L. garvieae suşlarını tanımlamak için fenotipik, moleküler ve proteomik yöntemler gibi tanı yöntemleri kullanılmaktadır (Gibello vd. 2016).

Durmaz ve Kılıçoğlu (2015) yaptıkları çalışmada *L. garvieae* suşlarının besiyerinde yuvarlak, 1 mm'den küçük çaplı ve beyaz renkli koloniler şeklinde gelişme gösterdiğini, Gram pozitif, oval şekilli, 2-9 koktan oluşan kısa zincirler oluşturduğunu suşların hareketsiz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif olduğunu ve %5 koyun kanlı vasatta alfa hemoliz oluşum gösterdiğini bildirmiştir.

Kurtoğlu ve Korun (2018) Fethiye'de yer alan gökkuşağı alabalık işletmelerindeki hasta balıklardan *L. garvieae* suşlarını izole ederek tanımlamıştır. İzole edilen suşların Gram-pozitif, hareketsiz, yuvarlak ve beyaz renkli koloniler oluşturduğu, suşların fermentatif, arjinin dihidrolaz pozitif iken lizin ve ornitin dekarboksilaz negatif olduğunu, kanlı vasatta alfa hemoliz oluşturduğunu rapor etmiştir. Suşların ONPG pozitif, amilazı hidrolize etmediği, farklı oranda NaCl (%0-8) içeren sıvı besiyerinde ve 4°C- 35°C arası sıcaklıklarda gelişme gösterdiğini bildirmiştir.

Ortega vd. (2020) yaptıkları çalışmada Meksika ve Michoacán Eyaletindeki alabalık işletmelerinden izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının beyaz renkli, düz yuvarlak koloni oluşturduğunu, suşların Gram-pozitif, hareketsiz, katalaz ve oksidaz reaksiyonlarının negatif olduğunu, tiyosülfat-sitrat-safra tuzları-sükroz (TCBS) ve MacConkey agarda gelişme göstermediğini tespit etmiştir.

Korun vd. (2021) 82 tane *L. garvieae* suşunu izole ve tanımlamıştır. Bakteri kolonilerinin beyaz renkli olduğunu ve suşların Gram-pozitif, oval-kok şeklinde olup, fermentatif ve sitokrom oksidaz ve katalaz testlerinin ise negatif olduğunu bildirmiştir. Suşlarının farklı sıcaklık derecelerinde (4-37°C) ve %0, %2, %4 ve %6.5 NaCl gibi farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme gösterdiğini suşların metil kırmızısı (MR) test sonuçları pozitif iken indol, H₂S, amilaz, jelatinaz ve Voges Proskauer (VP) test sonuçlarının negatif olduğunu bildirmiştir.

Çalışmada liyofilize durumdaki *L. garvieae* suşlarının canlandırma işlemleri sonucunda BHIA da 25 ± 2°C de 24-72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0.5-1 mm çapında, beyaz renkli ve yuvarlak koloniler oluşturduğu tespit edilmiştir. *L. garvieae* suşları Gram-pozitif kok şekilli, hareketsiz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, fermentatif olduğu tespit edilmiştir. Suşlar kanlı vasatta α -hemolitik iken MacConkey besi ortamında gelişme göstermediği bulunmuştur. MR ve VP pozitif, nitrat indirgeme

negatif, H₂S negatif, indol üretmediği, amilaz ve jelatinaz enzimlerini üretmedikleri, 4 ila 37 °C sıcaklıklarda gelişebildikleri, %0 ila %6 NaCl dahil farklı tuzluluk oranlarında gelişme gösterdikleri belirlenmiştir. Suşlar arjinini dihidrolize ederken lizin ve ornitini dekarboksile etmediği, glukoz, galaktoz, mannitol, sorbitol, D-mannoz gibi şekerlerden asit üretirken laktoz, sükroz, arabinoz gibi şekerlerden asit üretmediği tespit edilmiştir.

Mevcut çalışmada kullanılan bakteri suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçlarına göre, *L. garvieae* olarak tanımlanmıştır. Suşların fenotipik özellikleri yukarıda belirtilen araştırmacıların *L. garvieae* suşu için bildirdikleri fenotipik özelliklere benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır.

Dolgun (2015) çalışmasında *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre suşların amoksisilin-klavulanik asit, florfenikole duyarlı olduğunu ancak oksasilin, sefaperazon, ampisilin, penisilin G, gentamisin, kloksasilin, eritromisin ve metisiline direnç gösterdiklerini tespit etmiştir.

Hancı ve Onuk (2018) çalışmalarında tüm *L. garvieae* suşlarının flumekuın, oksolonik asit, gentamisin, neomisine dirençli olduğunu florfenikol, sefoperazon, amoksisiline ise duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Korun vd. (2018) çalışmalarında izole ettikleri 55 *L. garvieae* suşunun trimetoprim, flumekuın, kanamisin, streptomisin, basitrasin, ampisilin, oksitetrasiklin ve furazolidona karşı dirençli olduğunu tespit etmiştir.

Altan ve Korun (2021) 75 *L. garvieae* suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre ampisiline dirençli iken tetrasiklin ve basitrasine ise duyarlı olduğunu rapor etmiştir.

Korun vd. (2021) yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri *L. garvieae* suşlarının ampisilin, nalidiksik asit, nitrofurantoin, oksolinik asit ve sülfametoksazole karşı dirençli olduğunu ancak suşların hepsinin amoksisilin, enrofloksasin, florfenikol ve kloramfenikole duyarlı olduğunu bildirmiştir.

Mevcut çalışmada *L. garvieae* suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde, tüm suşların oksasilline dirençli olduğu ancak enrofloksasine duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Suşların oksasillin ve enrofloksasin dışındaki diğer antibiyotiklere duyarlılıkları suşa bağlı olarak değişiklik göstermiştir.

Dolgun (2015) tarafından bildirilen bulgulara benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Hancı ve Onuk (2018), Korun vd. (2018), Korun vd. (2021), Altan ve Korun (2021) tarafından bildirilen bulgulardan farklı olduğu tespit edilmiştir.

Balıklar için patojen bakterilerin varlığı, enfekte olan balıkların iç ve dış organlarından ya da dokularından besiyeri yüzeyine ekim yapılarak tespit edilir. Ekim

sonrası birkaç günü bulan inkübasyon sonunda gelişme gösteren bakterilerin fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılır. Bu yöntem yoğun iş gücü ve zaman almakla birlikte sonuçların elde edilmesi uzun süreli olmaktadır. Mikroorganizmaların genetik özelliklerini belirleyen teknikler geliştirilmiştir. PZR tekniği bu yöntemler arasında hızlı sonuç vermektedir. PZR yöntemi patojenik bakterilerin belirlenmesinde kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (Altan 2019).

Dolgun (2015) çalışmasında gökkuşağı alabalığından *L. garvieae* suşlarını izole etmiştir. PLG-1 ve PLG-2 primer çiftinin kullanıldığı PZR çalışması sonucunda 100 balığın 34'ünde *L. garvieae* suşunu identifiye edildiğini bildirmiştir.

Hancı ve Onuk (2018) çalışmasında Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalığı işletmelerinden 25 *L. garvieae* suşunu identifiye etmiştir. Suşları identifiye etmek amacı ile PLG-1 ve PLG-2 primer çiftini kullanarak *L. garvieae* için PZR yöntemini kullanmışlardır. PZR sonuçlarına göre suşların 1100 bç'lik amplifikasyon verdiğini tespit etmiştir.

Altan ve Korun (2021) yaptıkları çalışmada 47 bakteri suşunu klasik biyokimyasal testleri kullanarak *L. garvieae* olarak tanımlamıştır. Biyokimyasal testlerin doğruluğunu teyit etmek için PLG-1 ve PLG-2 primer çiftini kullanmıştır. Yapılan PZR çalışması sonucunda 1100 bç'lik tek bir bant oluşumu gözlenmiştir.

Aynı araştırmacılar, *L. garvieae* suşlarının tanımlanmasında PLG-1 ve PLG-2 primer çiftinin tanımlamadaki doğruluğunu ortaya koymak amacı ile 25 suşa SA1B10-F ve SA1B10-R primerlerini kullanarak PZR tekniğini uygulamıştır. Yapılan PZR çalışmasında 3'ü negatif 22'si pozitif sonuç elde edilmiştir. Çalışmada negatif sonuç veren suşların PLG-1 ve PLG-2 primer çiftinin kullanıldığı PZR çalışmasında ise pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir.

Bu çalışmada 10 suşa PZR tekniği uygulanarak çoğaltılan DNA örnekleri jel elektroforez de yürütülmüştür. PLG-1 ve PLG-2 primer çiftinin kullanıldığı PZR çalışması sonucunda agaroz jel de 10 suş 1100 bç'lik amplifikasyon vermiştir. SA1B10-F ve SA1B10-R primerleri ile yapılan PZR sonuçlarına göre 3 suş için negatif 7 suş için pozitif sonuç elde edilmiştir. Mevcut çalışmada *L. garvieae*'nin PLG-1 ve PLG-2 primer çifti ile SA1B10-F ve SA1B10-R primerleri kullanılarak yapılan PZR çalışması sonuçları Aoki vd. (2000) ve Altan ve Korun (2021) tarafından bildirilen bulgularına benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Virülanstan sorumlu genler, hastalık oluşturma ve patojeniteyi etkilemektedir. Hemoliziner bakterilerin virülanlarında etkilidir. *HyII*, *hyIII*, *hyIII* genleri hemolitik etkinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Miyauchi vd. 2012; Türe ve Altınok 2016).

Türe ve Altınok (2016) yaptıkları bir çalışmada farklı kaynaklardan ve lokasyonlardan izole ettikleri toplam 34 *L. garvieae* suşunda *hlyI*, *hlyII* ve *hlyIII* genlerinin taşıdığını bildirmiştir.

Teker vd. (2018) çalışmasında toplam 21 *L. garvieae* suşu kullanmıştır. Daha önceki çalışmalardan hasta gökkuşağı alabalığının kalp, karaciğer, böbrek, kan ve dalak örneklerinden 19 suş ve enfekte bir insandan 1 suş izole edip kemdi tez çalışmasında kullanmıştır. Subklinik mastitisli mandalardan izole edilen *L. garvieae* suşu ile Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC 43921)'ndan temin edilen 1 suşu çalışmalarına dahil etmiştir. Çalışmada 20 *L. garvieae* suşundan 522 bç büyüklüğünde *hlyI* genini amplifiye etmiştir. Ayrıca tüm suşların 796 bç uzunluğunda *hlyII* genini taşıdığı tespit etmiştir. Beş suş dışındaki 16 suşun 549 bç uzunluğunda olan *hlyIII* genini taşıdığını bildirmiştir.

Yapılan bu çalışmada 10 *L. garvieae* suşunun *hlyII* ve *hlyIII* genlerini taşıdığı belirlenmiştir. 8 *L. garvieae* suşunun *hlyI* genini taşıdığı belirlenmiştir. İki suşun *hlyI* genini taşıması boş alel (null allele) eldesinden ya da primer bağlanma bölgesindeki varyasyon nedeniyle PZR ürününün olmadığını düşündürmektedir. Çalışma sonuçları Türe ve Altınok (2016) ve Teker vd. (2018) tarafından bildirilen bulgulara benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Hemolizden sorumlu *hlyII* geninin Türe ve Altınok (2016) tarafından bakteri virulansı ile ilişkili olabileceği bildirilmiş olup mevcut çalışmada da önceden laktokokkozisden etkilenen balıklardan izole edilen ve çalışma mataryelini oluşturan 10 *L. garvieae* suşunun 8'inden bu virülans geninin tespiti Türe ve Altınok (2016) tarafından bildirilen bulguyla desteklediği anlaşılmıştır.

Gram-pozitif bakteriler, çok katmanlı peptidoglikan yapıda kalın bir hücre duvarına sahiptir. Bu yapı peptidoglikana doğrudan bağlı olan teikoik ve lipoteikoik asitlerden oluşur (Marraffini vd. 2006; Türe ve Altınok 2016). *LPXTG* genleri *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *L. garvieae* gibi birçok Gram-pozitif bakteriden izole edilen peptidoglikana kovalent olarak bağlanan bir yüzey proteinidir. Bakteriyel virülans *LPXTG* proteinlerinin önemli etkileri vardır (Mariscotti vd. 2012; Miyauchi vd. 2012; Perez-Dorado vd 2012).

Türe ve Altınok (2016) yaptıkları çalışmada 34 *L. garvieae* suşunun *adhPav*, *adhCI*, *adhCII* ve *adhPsaA* genlerine sahip olduğunu ancak 3 suşun *adh* genini taşımadığını bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar çalışmalarında suşların %37'sinde *LPXTG-1* ve *LPXTG-4* genlerinin bulunduğunu, tüm suşlarda ise *LPXTG-2* ve *LPXTG-3* genlerinin bulunduğunu belirterek 4 tip *LPXTG* genini tanımlamıştır.

Teker vd. (2020) *L. garvieae* suşlarında *adhPsaA*, *LPXTG-2*, *LPXTG-3* ve *LPXTG-4* genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında 21 suştan 15'inin *adhPsaA* genini, 6'sının *LPXTG-2* genini, 20'sinin *LPXTG-3* genini taşıdığını ve tüm suşlarda *LPXTG-4* geninin bulunduğunu bildirmiştir.

Bakteriler tarafından üretilen adezin genleri konak-patojen ilişkisini etkileyen virulans faktörlerinden birisidir. *L. garvieae*'nin adezyon ile ilişkili altı geni (*adhPsaA*, *adhPav*, *LPxTG-1*, *LPxTG-2*, *LPxTG-3*, *LPxTG-4*) mevcut çalışmada kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına 10 suşun *adhPsaA* ve *adhPav* virülans genlerini taşıdığı ancak bazı suşların ise *LPxTG-1* ve *LPxTG-3* genlerini taşımadıkları belirlenmiştir. *LPxTG-2* ve *LPxTG-4* ise tüm suşlarda çoğaltılamamıştır. Çalışma sonuçları Türe ve Altınok (2016) ve Teker vd. (2020) tarafından bildirilen bulgular ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Süperoksit dismutazlar (SOD); süperoksit radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalize eden enzimlerdir (Türe ve Altınok 2016). Türe ve Altınok (2016) yaptıkları çalışmada 34 *L. garvieae* suşunda SOD virülans geninin varlığını araştırmıştır. Araştırma sonucuna göre 34 suşun hepsinde SOD geninin bulunduğunu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *L. garvieae* suşlarında SOD geninin varlığı çalışılmış olup toplam 10 izolatin 9'unun bu geni taşıdığı ancak 1 tanesinin ise taşımadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Türe ve Altınok (2016)'un bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Fibronektin bağlayıcı proteinler (*fbp*), esas olarak Gram-pozitif kok yüzeyinde bulunan hücre dışı matrisin (ECM) yüzey reseptörleri olarak tanımlanır (Abdelfatah vd. 2015; Eraclio vd. 2018). Abdelfatah vd. (2015) çalışmalarında süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri *L. garvieae* suşlarında *fbp* geninin varlığını araştırmıştır. Çalışma sonuçlarına göre 6 *L. garvieae* suşundan 4 suşun bu geni taşıdığını tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında 10 *L. garvieae* suşundan 8'inin *fbp* genini taşıdığı ancak 4 suşun bu genden yoksun olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Abdelfatah vd. (2015)'in bulgularına benzerlik göstermektedir.

6. SONUÇLAR

L. garvieae'de bazı virülans genlerinin tespitinin amaçlandığı bu tez çalışmasında aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

- 1- Çalışmada kullanılan 10 suş fenotipik yönden homojenlik göstermiştir.
- 2- Çalışmada kullanılan 10 *L. garvieae* suşlarına PLG-1 ve PLG-2 primer çifti kullanılarak PZR tekniği uygulanmıştır. Suşların hepsi pozitif sonuç vermiştir.
- 3- SA1B10-1-F ve SA1B10-1-R primer çiftinin kullanıldığı PZR tekniğinde 10 suştan 4'ü negatif, 6'sı pozitif amplifikasyon vermiştir.
- 4- Suşların antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde tüm suşlar oksasilline dirençli olduğu, enrofloksasine duyarlı olduğu, bunların dışındaki antibiyotiklere ise duyarlılık ve direnç durumlarının değiştiği sonuçları elde edilmiştir.
- 5- Adezyon gen kümesi incelendiğinde tüm suşların *adhPav* (adhesinPav) ve *adhPsaA* (adhesinPsaA) genlerini taşıdığı tespit edilmiştir.
- 6- *LPXTG-1* geni için 9'u pozitif 1'i negatif, *LPXTG-2* ve *LPXTG-4* için tüm sular negatif, *LPXTG-3* içinse 8 suş pozitif iken 2 suş negatif olduğu bulunmuştur.
- 7- Hemolizin virülans genleri için 8 *L. garvieae* suşunda *hlyI* pozitif iken 2 suşta *hlyI* virülans geninin bulunmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm suşların ise *hlyII* ve *hlyIII* virülans genlerini taşıdığı belirlenmiştir.
- 8- Çalışmada kullanılan 10 *L. garvieae* suşundan 8'inde fibronektin bağlayıcı protein (*fbp*) genini taşıdığı tespit edilmiştir.
- 9- Çoklu virülans faktörlerinin kombinasyonu *L. garvieae* izolatlarının belki de daha yüksek patojenite göstermesine olanak vermektedir.

7. KAYNAKLAR

- Abdelfatah, N.E. Badr, A. and Tahoun, B.M. 2015. Identification of lactic acid bacteria in raw milk and kariesh cheese with special reference to *Lactococcus garvieae*. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 3(6): 203-208.
- Altan, E. 2019. Antalya İli Civarındaki Bazı Alabalık Çiftliklerinden *Lactococcus garvieae*'nin izolasyonu. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı. Antalya 62 sayfa.
- Altan, E. and Korun, J. 2021. *Lactococcus garvieae* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.) compared by PLG and SA1B10 PCR primer pairs. *Jurnal Ilmiah Platax*, 9(1): 18-28.
- Aoki, T. Park, C-I. Yamashita, H. and Hirono, I. 2000. Species-specific polymerase chain reaction primers for *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis*. 23: 1-6.
- Austin, B. and Austin, D.A. 2016. Bacterial fish pathogens disease of farmed and wild. 6th edition. Fish. UK: Springer, 732 p.
- Avcı, H. Aydoğan, A. Tanrikul, T.T.S. and Birincioğlu, S. 2010. Pathological and microbiological investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) naturally infected with *Lactococcus garvieae*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(B): 313-318.
- Buller, B.N. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals a practical identification manual. 1st edition. CABI; CAB International UK. 361 p.
- Buller, B.N. 2015. Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals. 2nd edition. CABI; CAB International UK. 881 p.
- Call, K.E. and Klaenhammer, R.T. 2013. Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology Food Microbiology*. 4(73): 1-10.
- Chang, P.H. Lin, C. W. and Lee, Y.C. 2002. *Lactococcus garvieae* infection of cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Taiwan and associated biophysical characteristics and histopathology. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 22(5): 319-327.
- Chhatwal, G.S. 2002. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends in Microbiology*, 10(5): 205-208. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02351-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02351-X)
- Comfort, D. and Clubb, T.R. 2004. A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria. *Infection and Immunity*, 72(5): 2710–2722.
- Deisingh, K.A. and Thompson, M. 2002. Detection of infectious and toxigenic bacteria. *Analyst*, 127, 567–581.
- Desvaux, M. Dumas, E. Chafsey, I. and Hebraud, M. 2006. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters*, 256(1): 1-15.

- Didinen, B.I. Yardımcı, B. Onuk, E.E. Metin, S. and Yıldırım, P. 2014. Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): new histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *Revue. Méd.Vét*, 165(1-2):12-19.
- Diler, Ö. Altun, S. Adiloglu, A. K. Kubilay, A. and Işıklı, B. 2002. First occurrence of streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 22(1): 21-26.
- Dinçtürk, E. 2019. Alabalıklarda Bakteriyel Balık Patojenlerinin Teşhisinde Yeni İzolasyon Ve İdentifikasyon Yöntemlerinin Uygulanması. İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı, İzmir, 183 sayfa.
- Dirican, S. Musul, H. and Çilek, S. 2009. Some physico-chemical characteristic and rotifers of Camligoze dam lake, Susehri, Sivas, Turkey. *J. Anim. Vet. Adv*, 8(4): 715-719.
- Dolgun, O. 2015. Gökkuşığı Alabalıklarından *Lactococcus garvieae* İdentifikasyonu Ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın 49 sayfa.
- Durmaz, Y. ve Kılıçoğlu, Y. 2015. Bir alabalık çiftliğinde doğal enfekte gökkuşığı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) *Lactococcus garvieae*'nin kültür ve PCR ile saptanması ve etkenin antibiyotik duyarlılık profillerinin belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 10(2): 109-115.
- Eraclio, G. Ricci, G. Quarrrini, M. Moroni, P. and Fortina, G.M. 2018. Detection of virulence-related genes in *Lactococcus garvieae* and their expression in response to different conditions. *Folia Microbiologica*, 63: 291–298.
- EUCAST, 2022. European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
- Fortina, M.G. Ricci G. Foschino, R. Picozzi, C. Dolci, P. Zeppa, G. Cocolin, L. and Manachini, P.L. 2006. Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 445–453.
- Gibello, A. Galán-Sánchez, F. Mar Blanco, M. Rodríguez-Iglesias, M. Domínguez, L. and Fernández-Garayzabal, J.F. 2016. The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overviewon microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Research in Veterinary Science*. 109: 59–70.
- Gomes, S. Afonso, A. and Gartner, F. 2006. Fish vaccination against infections by Streptococcal species and the particular case of Lactococcosis. *RPCV*, 101(557-558): 25-35.
- Hancı, İ. ve Onuk, E.E. 2018. *Lactococcus garvieae* izolatlarının antimikrobiyal direnç profillerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 29 (2): 94-103.

- Kleerebezem, M. Hols, P. Bernard, E. Rolain, T. Zhou, M. Siezen, R. J. and Bron, P. A. 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS*, 34(2): 199-230. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00208.x>
- Klemm, P. Vejborg, M.R. and Hancock, V. 2010. Prevention of bacterial adhesion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88: 451–459.
- Korun, J. Timur, G. Yardımcı, R.E. ve Balcı, B.A. 2018. Kültür gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W.)’nda bazı kok türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tespiti üzerine bir çalışma. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*, 13(2): 149-158.
- Korun, J. Altan, E. Teker, S. and Ulutaş, A. 2021. A study on the antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae*. *Acta Aquatica*. 8 (1): 23-30.
- Kurtoğlu, M. ve Korun, J. 2018. Yavru gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, W.)’ndan *Lactococcus garvieae*’nin izolasyonu ve plazmit profilleri üzerine bir çalışma. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 3(1): 11-22.
- Lányi, B. 1988. Methods in Microbiology. In: Colwell, R.R.; Grigorova, R. (Eds.), Elsevier. 19, 67 p.
- Mariscotti, J.F. Quereda, J.J. and Pucciarelli, M.G. 2012. Contribution of sortase a to the regulation of *Listeria monocytogenes* LPXTG surface proteins. *Int Microbiol*, 15: 43–51.
- Marraffini, L.A. DeDent, A.C. and Schneewind, O. 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70:192–221.
- Meyburgh, M.C. Bragg, R.R. and Boucher, E.C. 2017. *Lactococcus garvieae*: an emerging-bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Org*, 123: 67–79.
- Meyburgh, C.M. Bragg, R.R. and Bouche, C.E. 2018. Detection of virulence factors of South African *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Vet. Res*, 34 (6): 483–487.
- Miyauchi, E. Toh, H. Nakano, A. Tanabe, S. and Morita, H. 2012. Comparative genomic analysis of *Lactococcus garvieae* strains isolated from different sources reveals candidate virulence genes. *International Journal of Microbiology*. Article ID 728276, page 7.
- Morita, H. Toh, H. Oshima, K. Yoshizaki, M. Kawanishi, M. Nakaya, K. Suzuki, T. Miyauchi, E. Ishii, Y. Tanabe, S. Murakami, M. and Hattori, M. 2011. Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *PLoS One* 6 (8), e23184. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0023184>.
- Ortega, C. Irgang, R. Valladares-Carranza, Collarte, C. and Avendaño-Herrera, R. 2020. First identification and characterization of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Mexico. *Animals*, 10, 1609:1-15. doi:10.3390/ani10091609.

- Perez-Dorado, I. Galan-Bartual, S. and Hermoso, J.A. 2012 Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol*, 27: 221–245.
- Plumb, J.A. and Hanson, L.A. 2011. Health maintance and princibal microbial diseases of cultured fish. Third ed. *Wiley-Blackwell*, Iowa, USA. 244 pp doi: 10.1002/9780470958353.ch11.
- Ravelo, C. Magariños, B. Romalde, J.L. and Toranzo, E.A. 2001. Conventional versus miniaturized systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 21(4): 136.
- Sánchez, T.P. Balcázar, J.L. Merrifield, D.L. Carnevali, O. Gioacchini, G. Blas, I. and Zarzuela, I.R. 2011. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 196-201.
- Savvidis, G.K. Anatoliotis, C. Kanaki, C. and Vafeas, G. 2007. Epizootic outbreaks of lactococcosis disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), culture in Greece. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 27(6): 223- 228.
- Shahi, N. Mallik, S.K. Sahoo, M. Chandra, S. and Singh, A.K. 2018. First report on characterization and pathogenicity study of emerging *Lactococcus garvieae* infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), from India. *Transbound Emerg Dis*, (65): 1039–1048.
- Teker, T. 2017. *Lactococcus garvieae*'de Virulans Genlerinin Moleküler Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı. İstanbul 52 sayfa.
- Teker, T. Albayrak, G. Akaylı, T. and Ürkü, Ç. 2018. Detection of haemolysin genes as genetic determinants of virulence in *Lactococcus garvieae*. *Turk. J. Fish.& Aquat. Sci*, 19 (7): 625-634.
- Teker, T. Albayrak, G. Akaylı, T. and Ürkü, Ç. 2020. Screening of Lactococcal adhesion genes and two Pneumococcal genes as genetic determinants of virulence in *Lactococcus garvieae* strains. *GenAqua*, (4): 61-67.
- Temizkan, G. ve Arda, N. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. BİYOGEN Yayın No: 2. Nobel Tıp Kitapevleri. 151 s.
- Temiz, A. 2000. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatiboğlu Yayınevi, Ankara. 291 s.
- Timur, G. ve Timur, M. 2003. Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Rektörlük Yayını No. 4426. 588 s.
- Timur, G. Yardımcı, E.R. Ürkü Ç. ve Çanak Ö. 2011. Marmara Bölgesi kültür gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* L.) Lactococcosis'in bakteriyolojik ve histopatolojik metodlarla teşhisi. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*. 26: 63-81.

- Tiwari, P.R. Hoondal, G.S. and Tewari, R. 2009. Laboratory techniques in microbiology & biotechnology. 1st edition. Shushan, B. (Ed.), Abhlshek Publications, *Chandigarh (India)*, 189 p.
- Toranzo, E.A. Magariños, B. and Herrera, A.R. 2017. Fish viruses and bacteria pathobiology and protection. In: Woo, T.K.P and Cipriano, C.R. (Eds.), CAB International, UK, pp. 314-333.
- TÜİK. 2021. Türkiye İstatistik Kurumu. Su Ürünleri İstatistikleri, www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf (02.11.2021).
- Türe, M. Haliloğlu, H.I. Altuntaş, C. Boran, H. and Kutlu, I. 2014. Comparison of experimental susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), turbot (*Psetta maxima*), Black Sea trout (*Salmo trutta labrax*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Lactococcus garvieae*, *Turkish journal of fisheries and aquatic sciences*, 14: 507–513.
- Türe, M. and Altınok, İ. 2016. Detection of putative virulence genes of *Lactococcus garvieae*. *Dis Aquat Org*, 119: 59–66.
- Vendrell, D. Balcazar, J.L. Ruiz-Zarzuela, I. Blas, I. Girone's, O. and Mu'zquiz, J.L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect*, 29: 177–198.
- Wiley, J. Sherwood, L.M. and Woolverton, C.J. 2008. Pathogenicity of Microorganisms, Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, In: Wiley, J., Sherwood, L.M., Woolverton. (ed.), Chapter 7, McGraw-Hill Higher Education, New York, 821 pp.
- Zlotkin, A. Eldar, A. Ghittino, C. and Bercovier, H. 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 36 (4): 983-985.

ÖZGEÇMİŞ

Ayca ULUTAŞ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2019- 2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2018	Su Ürünleri Fakültesi, Antalya

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

Korun, J. Altan, E. Teker, S. **Ulutaş, A.** 2021. A study on the antimicrobial resistance of *Lactococcus garvieae*. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 8(1): 23-30

Ulutaş, A. Korun, J. 2021. Detection of antibacterial effects of various fruit species on motile *Aeromonas* species. *Acta Aquatica: Aquatic Sciences Journal*, 8(1): 08-12.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

Korun, J. **Ulutaş, A.** Gökoğlu, M. 2019. Tıbbi sülük (*Hirudo verbana*)’den izole edilen *Aeromonas* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeks sonuçları. *J Adv VetBio Sci Tech*, 4(2): 59-66.

Korun, J. Okudan, E.Ş. Yardımcı, R.E. Timur, G. **Ulutaş, A.** Gökoğlu, M. Çelik, Y.S. Balcı, B.A. 2019. Investigation of antibacterial activities of ethanol and methanol extracts of some marine algae species on *Yersinia ruckeri*. *Kocatepe Vet J*, 12(3): 1-9.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Korun, J. **Ulutaş, A.** 2018. Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and goldfish (*Carassius auratus*). *HydroMedit 2018*, Volos, Yunanistan, 8 - 11 Kasım 2018, ss.24.