



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü



**Akdeniz`de Bulunan İstilacı Balon Balığı *Lagocephalus sceleratus* Türünde  
Bulunan *Vibrio* spp.`nin Kültürel Yöntemlerle Saptanması**

**Yüksek Lisans Tezi**

Burcu ALKIŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2022



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**Akdeniz`de bulunan istilacı balon balığı *Lagocephalus sceleratus* türünde  
bulunan *Vibrio* spp.`nin kültürel yöntemlerle saptanması**

**Burcu ALKIŞ**

**Tez Danışmanı:**

**Doç. Dr. İnci TÜNEY KIZILKAYA**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Zooloji Yüksek Lisans Programı**

**Sunuş Tarihi:**

**2022 İzmir**



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Akdeniz’de Bulunan İstilacı Balon Balığı *Lagocephalus scalaratus* Türünde bulunan *Vibrio spp.*’nin Kültürel Yöntemlerle Saptanması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

01/04/2022

Burcu ALKIŞ



## ÖZET

### **Akdeniz`de bulunan istilacı balon balığı *Lagocephalus sceleratus* türünde bulunan *Vibrio* spp.`nin kültürel yöntemlerle saptanması**

**Burcu ALKIŞ**

**Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: İnci TÜNEY KIZILKAYA**

Akdeniz, Kızıldeniz'den gelen çok sayıda istilacı türün akınına uğramaktadır. 2003 yılında ilk kaydı Türkiye sularında verilen balon balığı, (*Lagocephalus sceleratus*), kısa bir süre içerisinde çoğalarak Akdeniz tarihinde bilinen en zararlı istilacı balık türü olmuştur. Etçil bir tür olduğu için ekonomik ve ekoloji önemi olan birçok besini hızla tüketmektedir. Birleşmiş Milletler FAO East Med Projesi kapsamında hazırlanan raporda Akdeniz'de yakalanan biyokütlesi en fazla olan 10 balık türünden birisi olduğu belirtilmiştir.

Balon balığının tek zararı balıkçılık sektörüne ve ekosisteme değildir. Dokularında ve organlarında bulunan Tetrotodoxin (TTX) adlı toksin siyanürden 1200 kat daha zehirlidir ve insanların tüketmesi durumunda ölümcül tehlikeler içermektedir. Balığın içerdiği toksinin besin zincirinden gelen *Vibrio* sp. Türüne ait birkaç tür bakteriden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Türkiye denizlerinde bulunan *Lagocephalus* sp. türlerinde TTX üretiminde etkili olan *Vibrio* sp. türü bakterilerin hangi türe ait olduğu araştırılmıştır. Bu amaçla Göcek körfezinden toplanan balıkların biyolojik özellikleri incelenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Lagocephalus sceleratus*, *Vibrio* sp., Tetradotoksin



**ABSTRACT****Identification of *Vibrio* spp. from the invasive puffer fish *Lagocephalus sceleratus* from the Mediterranean Sea by cultural methods****Burcu ALKIŞ****İnci TÜNEY KIZILKAYA****Master's Thesis, Department of Biology**

The Mediterranean is subject to an influx of numerous invasive species from the Red Sea. The balloon fish (*Lagocephalus sceleratus*), first recorded in Turkish waters in 2003, has been the most harmful invasive fish known in the history of the Mediterranean, multiplying in a short period of time. Because it is a carnivorous species, it quickly consumes many nutrients of economic and ecological importance. The report, prepared within the scope of the United Nations FAO East Med project, stated that it is one of the 10 fish species with the most biomass caught in the Mediterranean Sea.

Balloon fish is not the only harm to the fishing sector and ecosystem. The toxin tetrodotoxin (TTX), found in their tissues and organs, is 1200 times more toxic than cyanide and contains deadly dangers if consumed by humans. *Vibrio* sp, which comes from the food chain of the toxin contained in the fish. It is thought to be caused by several species of bacteria belonging to the species.

In this study, *Lagocephalus* sp., *Vibrio* sp, which is effective in the production of TTX in its types. Bacteria which belong to the type species investigated. For this purpose, the biological properties of fish collected from the Gulf of Gocek were studied.

**Key words:** *Lagocephalus sceleratus*, *Vibrio* sp., Tetratodoksin



## ÖNSÖZ

Danışmanım Doç. Dr. İnci Tüney KIZILKAYA aracılığı ile lisans öğrenimim süresinde tanıştım. İskenderun'a gidişlerimde balon balığı sorununu çok fazla insandan duydum ve bu konu ile ilgili bir araştırma yapmak istediğime karar verdim.

Literatüre olan katkısının dışında, tez projemiz arazi çalışmasının yer alıyor olması teorik bilgilerimizin pratiğe dönüşümü açısından oldukça yardımcı olmuştur.

Çalışma süresince elde ettiğim bilginin, tecrübenin ve arkadaşlıklarımın detseklerinin paha biçilmez değeri vardır. Bunun için emeği geçen herkese sonsuz teşekkürler.

İZMİR

01/03/2022

Burcu Alkış



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ .....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvi
TABLO DİZİNİ.....	xx
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xxi
1 GİRİŞ .....	1
2 LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 DENİZEL İSTİLACI BALIKLAR.....	5
2.1.1 İstilacı tür .....	5
2.1.2 İstilacı Türlerin Yayılma Yolları .....	8
2.2 Türkiye Denizlerindeki İstilacı Balıklar .....	8
2.3 Akdeniz’deki Balon Balığı Türleri ve Özellikleri .....	12
2.3.1 <i>Torquigener flavimaculosus</i> .....	12
2.3.2 <i>Lagocephalus spadiceus</i> (Richardson, 1845) .....	13
2.3.3 <i>Lagocephalus suezensis</i> .....	14
2.3.4 <i>Lagocephalus sceleratus</i> (Gmelin, 1789) .....	15
2.4 Akdeniz’deki <i>Lagocephalus sceleratus</i> Türünün Dağılımı ve Özellikleri .....	16
2.5 Denizel Toksinler.....	17

**İÇİNDEKİLER (DEVAM)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.5.1 Tetrodotoksin .....	20
2.5.2 TTX Üreten Bakteriler .....	23
2.5.2.1. <i>Vibrio alginolyticus</i> .....	25
2.5.2.2. <i>Pseudomonas</i> sp. ....	26
3 MATERYAL VE METOD.....	27
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri .....	27
3.1.1 Alkalın Pepton Water (APW) .....	27
3.1.1.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) .....	27
3.1.3. Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS).....	27
3.1.4. Emerson Agar .....	27
3.2 Kullanılan Başlıca Cihazlar.....	27
3.3 Balık Materyalinin Toplanması.....	28
3.4 Bakteri Kültürü ve İzolasyonu .....	29
3.5 Bakterilerin Morfolojik Tayini.....	31
3.5.1 Gram Boyama (Temiz, 2010) .....	31
3.6 Moleküler Bakteri Tayini .....	31
3.6.1 DNA izolasyonu.....	31
3.6.2 PCR Analizi .....	33
3.7 Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturma.....	34

**İÇİNDEKİLER (DEVAM)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4 BULGULAR.....	34
4.1 Balık Materyali .....	34
4.2 Bakteri İzolasyonu ve Kültürü .....	38
4.3 DNA izolasyonu ve PCR analizi sonuçları.....	50
4.4 Dizi Analizi Sonuçları ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması .....	54
5 TARTIŞMA VE SONUÇ .....	59
KAYNAKLAR .....	64
TEŞEKKÜR .....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	81

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İstilacı tür oluşumu (Colautti ve MacIsaac, 2004'ten uyarlanılmıştır).....	10
2.2. <i>Torquigener flavimaculosus</i> (Zenetos, A. et al., 2007) .....	13
2.3. <i>Lagocephalus spadiceus</i> (Tuncer ve Aslan, 2008).....	14
2.4. <i>Lagocephalus suezensis</i> (www.fishbase.org) .....	15
2.5. <i>Lagocephalus sceleratus</i> (Fotoğraf: İnci Tüney Kızılkaya).....	16
2.6. <i>Lagocephalus sceleratus</i> türünün dünyadaki dağılımı (Özbay, 2015). .....	16
2.7. Tetrodotoksinin kimyasal yapısı (Neagu et. al., 2006).....	20
2.8. Ekosistemde tetrodotoksin birikim mekanizması (Hwang and Noguchi, 2003).....	21
2.9. Tetrodotoksin üreten bakteri grupları (Magarlamov et al., 2017) .....	24
3.1. Örneklerin toplandığı alan. ( <a href="https://www.bluecruise.org/English/gocekbay.html">https://www.bluecruise.org/English/gocekbay.html</a> ) .....	28
3.2. Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen diseksiyon işlemi (Fotoğraf: Yezdan Kıvılcım).....	29
3.3. Alkalın pepton water içerisine inkübe edilen doku örnekleri (Fotoğraf: Burcu Alkış).....	30
3.4. Doku örneklerinin bakteri kültürü için hazırlanması. Örnekler 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Morfolojik olarak <i>Vibrio</i> sp. olduğundan şüphelenilen büyük sarı koloniler tip tür kullanarak belirlenmiştir. ....	30
4.1. Mevsim ve cinsiyete göre balıkların total ağırlıkları (g) .....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2. Mevsim ve cinsiyete göre balıkların total boyları (cm) .....	37
4.3. Mevsim ve cinsiyete göre balıkların gonad ağırlıkları (g) .....	37
4.4. Mevsim ve cinsiyete göre balıkların karaciğer ağırlıkları (g) .....	38
4.5. İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (1: Tip tür; 2: Yaz Dişi Karaciğer 2; 3: Yaz Dişi Gonad 1; 4: Yaz Dişi Gonad 2; 5: Yaz Erkek Karaciğer 1; 6: Yaz Erkek Karaciğer 2; 7: Yaz Erkek Gonad 1; 8: Yaz Erkek Gonad 2; 9: Yaz Dişi Karaciğer 1.) .....	41
4.6. İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (10: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 11: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-1; 12: İlkbahar Dişi Karaciğer (MBA), 13: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-2; 14: İlkbahar Dişi Karaciğer (VAL broth); 15: İlkbahar Dişi Karaciğer 2-2; 16: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-3; 17: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-4; 18: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 19: İlkbahar Erkek Gonad 1).....	45
4.7. İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (20: Kış Dişi Gonad 1-2; 21: Kış Dişi Gonad 1-2-2; 22: Kış Erkek Karaciğer 2; 23: Kış Dişi Karaciğer 1; 24: Kış Erkek Karaciğer 1, 25: Kış Erkek Karaciğer 2).....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (26: Sonbahar Dişi Gonad 1; 27: Sonbahar Dişi Karaciğer 1; 28: Sonbahar Dişi Gonad 2; 29: Sonbahar Dişi Karaciğer 2; 30: Sonbahar Erkek Gonad 1; 31: Sonbahar Erkek Karaciğer 1; 32: Sonbahar Erkek Karaciğer 2; 33: Sonbahar Erkek Gonad 2).....	50
4.9. PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: Tip tür; 2: Yaz Dişi Karaciğer 2; 3: Yaz Dişi Gonad 1; 4: Yaz Dişi Gonad 2; 5: Yaz Erkek Karaciğer 1; 6: Yaz Erkek Karaciğer 2; 7: Yaz Erkek Gonad 1).....	52
4.10. PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (8: Yaz Erkek Gonad 2; 9: Yaz Dişi Karaciğer 1; 10: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 11: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-1; 12: İlkbahar Dişi Karaciğer (MBA), 13: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-2; 14: İlkbahar Dişi Karaciğer (VAL broth); 15: İlkbahar Dişi Karaciğer 2-2; 16: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-3; 17: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-4; 18: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 19: İlkbahar Erkek Gonad 1; 20: Kış Dişi Gonad 1-2; 21: Kış Dişi Gonad 1-2-2; 22: Kış Erkek Karaciğer 2).....	53

**ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.11. PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (23: Kış Dişi Karaciğer 1; 24: Kış Erkek Karaciğer 1, 25: Kış Erkek Karaciğer 2; 26: Sonbahar Dişi Gonad 1; 27: Sonbahar Dişi Karaciğer 1; 28: Sonbahar Dişi Gonad 2; 29: Sonbahar Dişi Karaciğer 2; 30: Sonbahar Erkek Gonad 1; 31: Sonbahar Erkek Karaciğer 1).....	53
4.12. PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: Tip tür; 32: Sonbahar Erkek Karaciğer 2; 33: Sonbahar Erkek Gonad 2).....	54
4.13. <i>Lagocephalus sceleratus</i> balon balığından mevsimsel olarak karaciğer ve gonadlardan izole edilen bakterilerin 16S rDNA gen dizilerine filogenetik ağaç oluşumu.....	58

## TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İstilacı tür oluşumu (Colautti and MacIssac, 2004) .....	7
2.2. İstilacı tür oluşumunda kullanılan terimler ve safhaları (Colautti and MacIssac, 2004) .....	7
2.3. Paralitik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi (Paralytic Shellfish Poisoning-PSP) (Terzi, G., 2008) .....	18
2.4. Balıkların neden olduğu zehirlenmeler (Terzi, G., 2008) .....	19
3.1. Primerler ve çoğaltacakları gen bölgesi uzunlukları .....	33
4.1. Sonbahar mevsiminde temin edilen <i>Lagocephalus scleratus</i> türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri .....	35
4.2. Kış mevsiminde temin edilen <i>Lagocephalus scleratus</i> türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri .....	35
4.3. İlkbahar mevsiminde temin edilen <i>Lagocephalus scleratus</i> türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri .....	35
4.4. Yaz mevsiminde temin edilen <i>Lagocephalus scleratus</i> türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri .....	36
4.5. İzole edilen bakteri DNA'larının miktar ve saflıkları .....	51
4.6. İzole edilen bakterilere ait 16S rDNA dizilerinin Blast sonuçları .....	54
4.7. İzole edilen bakterilerin mevsimlere göre dağılımı .....	56
4.8. İzole edilen bakterilerin cinsiyete göre dağılımı .....	56
4.9. İzole edilen bakterilerin organlara göre dağılımı .....	57

**SİMGE VE KISALTMALAR**

TTX	: Tetradotoksin
MU	: Mouse unit
CM	: Santimetre
PSP	: Paralirik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi
DSP	: Diyaretik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi
NSP	: Nörotoksik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi
ASP	: Amnezik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi
Mg	: Miligram
G	: Gram
Gr	: Gram
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
APW	: Alkalin pepton water
TCSB	: Thiosulfate citrate bile sucrose
TE	: Tris-EDTA



# 1 GİRİŞ

1869 yılında Süveyş Kanalı ve 1970 yılında Nil Nehri üzerine kurulan Avsan Barajı inşaatı ile insanların Akdeniz ekosistemi üzerine bilinen en önemli etkisi başlamıştır. Bazı parametreler bakımından birbirine yakın özellikler gösteren Akdeniz ile Kızıldeniz arasındaki coğrafik engeller bu kanal aracılığıyla ortadan kalkmıştır. Bu durum Kızıldeniz'den Akdeniz'e göçlerin başlamasına sebep olmuştur (Wu et al., 2005).

Yabancı türlerin Akdeniz'e girişleri genellikle Süveyş kanalı yoluyla gerçekleşmektedir. Kızıldeniz'den Akdeniz'e doğru yapılan Lessepsiyen göç Süveyş kanalının tamamlanmasında önemli rolü olan Fransız diplomat Ferdinand Marie Vicomte de Lesseps'e ithafen ilk defa Por (1964) tarafından adlandırılmıştır, bu yolla göç eden türler ise –Lessepsiyen türler olarak adlandırılmıştır. Lessepsiyen türlerin bazılarının ekonomik değeri bulunurken, bazılarının da ekolojik etkilerinden dolayı zararlı, istilacı türler adını alırlar (Streftaris and Zenetos, 2006; Galil, 2000; Zenetos et al., 2012; Galil and Zenetos, 2002;).

Değişen ekosistemler, yabancı toplumların yerel ekosistemler ve ekonomiler üzerinde etkilerini değerlendirmede bilimsel topluluklardan ve uluslararası kuruluşlardan yoğun ilgi görmüştür. Egzotik türlerin biyolojik istilaları, dünya çapında artan bir endişe sorununu temsil etmektedir (Katsanevakis et al., 2014). Coğrafi bariyerlerin yıkılması gibi iklim değişikliğinin sonuçları ile birlikte antropojenik değişiklikler, hayvan türlerinin ve patojenlerin yeni çevrelerde yayılmasını desteklemiştir (Kalogirou, 2013). Bu durum Süveyş Kanalı ("Lessepsian" göçü) içine giren Hint-Pasifik balık türlerinin yayılmasının küresel ısınmanın sonuçları tarafından tercih edildiği Akdeniz'de (Zenetos et al., 2012) de görülmektedir.

Lessepsiyen göçü ile Akdeniz'e giren türlerden biri olan *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) Süveyş Kanalı yoluyla girmiştir ve istilacı bir tür olarak kabul edilmektedir. *L. scelaratus*, Şubat 2003'te Akdeniz'de Gökova Körfezi'nde (Güney Ege Denizi, Türkiye) (Akyol ve ark., 2005) Kasım 2004'te İsrail kıyıları boyunca Jaffa'da (Golani and Levy, 2005) ve Temmuz 2005'te Yunanistan,

Kıbrıs, Malta, Cezayir ve Türkiye’de artan sıklıkta kaydedildi ve en hızlı büyüyen lesepsiye türlerinden biri olarak kabul edilmiştir.

Genel olarak, Akdeniz’de 111.079 balıktan 110.237’ün *L. sceleratus* (2003’ten beri), 126’sının *Lagocephalus lagocephalus* (1878-2017) ve 716’sının *Sphoeroides pachygaster* (1979-2017) türlerine ait olduğu bilinmektedir. Bunların arasında, asıl endişe kaynağı olan tür *L. sceleratus* türü balon balığıdır (Guardone et al., 2018). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı 2 Aralık 2020 tarihinde yayınlanan Resmi Gazete’de balon balığı avcılığının desteklenmesine dair tebliğ yayınlamıştır. Bu tebliğin amacı; denizlerimizdeki biyolojik çeşitliliğe ve balıkçıların av araçlarına zarar veren balon balığının (*L. sceleratus*) ekosistemdeki yoğunluğunu ve stoklarını azaltarak balon balığının avlanmasını teşvik etmek amacıyla balıkçılara verilecek desteklemeye ilişkin iş ve işlemlerle ilgili usul ve esasları düzenlemektir (T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020). Yüksek derecede istilacı ve zehirli bir lesepsiye göçmeni olan *L. sceleratus*, 2003 yılında Kızıldeniz’den Akdeniz havzasına göç etmiştir. İlk olarak 2003 yılında kayıt edilen bu balon balığı, kısa bir süre içerisinde çoğalmış ve Akdeniz tarihinde bilinen en zararlı istilacı balık türü olmuştur (Guardone et al., 2018).

Dokularında ve organlarında yüksek miktarda tetradotoksin (TTX) adlı toksin olduğu bilinmektedir (Iverson and Truelove, 1994). En güçlü nörotoksinlerden biri olan TTX toksininin sadece balon balıklarında bulunduğu düşünülmekteydi. Ancak 1965’ten beri TTX ve analoglarının dağılımı çeşitli hayvanlara tespit edilmiştir (Miyazawa and Noguchi, 2001). Daha sonra yapılan çalışmalar TTX’in sadece balon balıklarında değil daha geniş alana yayılan türlerde bulunduğu gözlemlenmiştir. Örneğin; kaya balığı *Gobius criniger* (Noguchi and Hashimoto, 1973), mavi halkalı ahtapot *Octopus maculosus* (Sheumack et al., 1978), Kalifornia semenderi *Tarichi totosa* (Mosher et al., 1964), gastropod mollusklardan *Cahronia sauliae* (Narita et al., 1981) ve *Babylonia japonica* (Narita et al., 1981), denizyıldızı *Astropecten* sp. (Maruyama et al., 1984) ve küçük gastropod mollusklardan *Zeuxis siquijorensis* (Narita et al., 1948) ve *Niotha clathrata* (Jeon et al., 1984) türlerinde de TTX bulunduğu bilinmektedir.

TTX, bilinen en güçlü deniz kökenli organik zehir türü olarak bilinmektedir (Fernandez-Ortega et al., 2010). Bu toksine ilk olarak Tetradontia familyası

üyeleri olan balon balıklarında karşılaşılmışından dolayı Japon bir bilim insanı olan Tahara tarafından 1909 yılında bu familyadan türetilmiş bir isim olan tetradotoksin olarak adlandırılmıştır (Hwang and Noguchi, 2007; Miyazawa and Noguchi, 2001). Protein yapıya sahip olmayan organik bir bileşik olan TTX denizel ortamdaki en güçlü felç edici toksin olarak bilinmektedir (Hanifin, 2010). Şimdiye kadar birçok TTX zehirlenmesi vakaları kaydedilmiştir (Bentur et. al., 2008; Kheifets et. al., 2012; Chamandi et. al., 2009; Eisenman et. al., 2008;) Öldürücü özelliği olan bu toksin özellikle hücrelerde sodyum kanallarını bloke ederek etki etmektedir. TTX konsantrasyonunun organizma bünyesindeki dağılımı bireylere, bölgelere ve mevsime göre değişkenlik gösterebilir. Yapılan araştırmalarla TTX'in balon balığı ovaryum ve akciğerlerindeki miktarlarının diğer organlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Akboru, 2018). Dişi balon balıkları erkeklere göre daha zehirlidir çünkü ovaryumlar testislere göre daha fazla TTX içermektedir. TTX'in insanlar için en düşük öldürücü dozu yaklaşık olarak 10.000 MU yani yaklaşık 2 mg düzeyindedir (Hwang and Noguchi, 2007).

TTX toksinini balon balıklarının üretmediği, balığın bünyesine besin zincirinden geçtiği ve bakteriler tarafından üretildiği ve bu bakterilerin gram (-) olduğu bilinmektedir.

Balığın beslendiği canlılar Akdeniz'de değiştiğinden ve çoğunlukla kabuklular ve yumuşakçalarla beslendiğinden, TTX birikimini sağlayan bakterilerin balığın vücudunda daha az veya bazı dönemlerde hiç girmediği gibi bir varsayım yapılmaktadır. Ancak hipotezle ilgili olarak Akdeniz'de yapılmış geniş kapsamlı bir araştırma henüz yoktur.

Son yıllarda araştırmalara TTX molekülünün farmakolojik alanda kullanımı üzerine ağırlık verilmiştir. TTX'in durumu kritik hastalarda ağrı kesici etkisi olduğu, anti-tümör etkisinin olduğu ve uyuşturucu bağımlılığı tedavisinde diğer opioidlere (morfin benzeri etki gösteren kimyasal madde) alternatif bağımlılık yapmayan etki mekanizması üzerindeki çalışmalar büyük ilgi görmüştür (Saoudi et al., 2010; Schwartz et al., 1998; Bragadeeswaran et al., 2010; Yu, 2008). TTX molekülü 20. yy. başlarında Japonya'da romatizma tedavilerinde uygulanmıştır (Noguchi and Arakawa, 2008). Çin Halk Cumhuriyeti'nde kanser hastalarında terminal safha aşamalarında ağrı kesici olarak kullanımı mevcuttur (Saoudi et al., 2010). TTX'in sinirsel iletim üzerine olası engelleyici etkisi nedeniyle özellikle

anestezi alanında yeni ilaçlar üretiminde olası bir kaynak durumundadır (Schwartz et al., 1998). Yapılan bazı çalışmalar TTX'in anelijezik etkisinden yararlanarak orta ve ileri düzey kanser hastalarında ağrı azaltmak için denenmiş, kanserli hastalarda ağrının azaldığını tespit etmişlerdir.

Ülkemiz sularında istilacı bir tür olarak bilinen *L. scelaratus* türü balon balıklarının balıkçılığa ve ekosisteme zararı büyüktür. Balıkçı ağlarına takılarak ağları koparmakta ve maddi değeri olan balıkları tüketerek ekosisteme zarar vermektedir. Balığın yenmesi durumunda bulundurduğu toksinden kaynaklı zehirlenme ve ölüm vakaları görülmektedir.

Bu çalışma ile Akdeniz ekosisteminde büyük ekonomik ve ekolojik zarar sebep olan *L. sceleratus* balon balığı türünün toksin üretiminden sorumlu olan bakterilerinin izolasyonu ve tanımlanması hedeflenmiştir. İleride yapılacak olan bakteriden TTX eldesi ve üretimi çalışmaları için çalışmamızın zemin oluşturması amaçlanmıştır.

## 2 LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 DENİZEL İSTİLACI BALIKLAR

#### 2.1.1 İstilacı tür

Belli bir ekosistemde bulunmayan, farklı yöntemlerle o çevreye dışarıdan gelen yeni türler istilacı türler adını almaktadır. Yabancı türler yerel türlerin yaşama alanlarını işgal ettikçe (biyoistila), bu rekabette yerel türlerin nesli tükenmeye başlamıştır (Özdemir ve Ceylan, 2007).

Yeni alanlara yerleşen, üreyen ve canlı çeşitliliğinde azalmaya neden olan istilacı türler insan hayatını da olumsuz yönde etkilemektedirler. Bunlar; havyanlar, parazitler, bitkiler, mikroorganizmalar, herbivorlar ve omnivorlardan oluşabilmektedir. Bu türler yerleştikleri yeni ekosistemlere zarar vermişlerdir. Dışarıdan gelen türlerin yeni alanlara uyum sağlamaları, popülasyonlar ve yerel türler üzerindeki etkileri büyük derecede bilinmektedir ve bu türler büyük ölçüde yerel türlerin neslinin tükenmesine neden olmaktadır (Lodge, 1993; Coblenz, 1990).

Yapılan araştırmalarda genel olarak farklı bitki türlerinin sebep oldukları istilalar üzerinde yoğunlaşmaktadır ve aynı zamanda balık türlerinin de ortaya çıkardıkları yıkıcı sonuçlar büyük derecede önem arz etmektedir. Günümüzde yaşanan küresel ısınma canlıların yaşam alanlarını değiştirmelerine, kendilerine yeni habitat aramalarına sebep olmaktadır. Ayrıca iklim değişikliklerinin neden olduğu olumsuz etkiler, istilacılar yerli canlıların yerlerine geçmektedir. Bunlar dağılımda iklimin etkisi çok büyüktür. Denizel habitatlarda görülen bunlar iklim değişikliğinin en az olan kısımlarını oluşturmaktadır (Occhipinti-Ambrogi and Savini, 2003).

Bazı bilim insanları türlerin yeni habitat arayışlarının ve bu habitatlara uyum sağlamalarının kötü sonuçlara sebep olacağını belirtmişlerdir (Vermeij, 1996). Ancak bazı bilim insanları ise bu durumların normal olduğunu düşünmektedir. Araştırmacıların açıklamakta zorlandığı değişimlerin çeşitli değişimlere neden olan durum istilacı türlerin yeni yaşam alanlarına ulaşmalarıdır.

Çeşitli kaynaklardan istilacı tanımları yapılırsa;

- 1) Yerli olmayan türlerin tanımlanmasında (Radford and Cousens, 2000; Goodwin et al., 1999),
- 2) Doğal olan ortamlarda bir topluluk oluşturan yerli ve yabancı türler için bir sıfat olarak (Burke and Grime, 1996),
- 3) Çeşitli ortamlarda bulunan yabancı türlerin, doğal ortamlarında bulunan türlerden ayrımını sağlamada (Reichard and Hamilton, 1997),
- 4) Geniş habitatlara yayılan türleri belirlemede (van Clef and Stiles, 2001),
- 5) Tahrip gören habitatlar üzerinde oluşturduğu etki ve geniş bir yayılım alanına sahip olan, yabancı türler için (Davis and Thamsom, 2000) istilacı ifadesi kullanılmaktadır (Colautti and MacIssac, 2004).

Fakat tanımlarda bulunan sorunlar bu ifadelerle sınırlı değildir. Ayrıca yapılan araştırmalarda birbirleriyle aynı özellik göstermeyen türler için de aynı ifadelerin kullanıldığı belirtilmektedir. Örneğin; bir tür ortamda az sayıda bulunmakla birlikte geniş bir dağılım alanına sahip olabilir (*Carassius auratus*) (Fuller et al., 1999), bazıları (*Cervus unicolor unicolor*) ise yayılım açısından sınırlı alanlarda fakat sayıca fazla miktarda bulunabilirler (King, 1990).

Dünya genelinde; acısu ekosistemleri, tatlı su bölgeleri ve Akdeniz iklimine sahip bölgeler en çok dışarıdan göçe elverişli olan istilacı bölgeler olarak değerlendirilmiştir (Polat vd., 2011)

Günümüzde halen istilacı türlerin adlandırılmasında fikir birliği sağlanamamıştır. İstilacı tür terminolojisinde araştırmacıların ortak kanaati açısından, istilacı türlerin zorlu süreçlerden geçmesi ve bu süreçler esnasında yumurtlama miktarı göz önünde bulundurularak bir istila şablonu kullanılmaktadır (Colautti and MacIssac, 2004). Ortamda bulunan canlıların istilacı mı yoksa yerli bir tür mü olduğunun belirlenmesi bu aşamalar dikkate alınmak suretiyle gerçekleştirilmektedir. Sözü edilen aşamalar Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de gösterilmektedir.

**Tablo 2.1.** İstilacı tür oluşumu\_(Colautti and MacIssac, 2004)

<b>0 Safha</b>	Donor bölgede bulunan türler (yumurtalarını bıraktıkları safha)
<b>1. Safha</b>	Kendi doğal habitatlarından ayrılmış olan ve hareket halindeki türler
<b>2. Safha</b>	Yerleştikleri habitatlarda belirmeye başlayan türler
<b>3. Safha</b>	Lokalize olmuş ve sayı olarak nadir türler
<b>4. Safha A</b>	Geniş bir dağılıma sahip olan fakat nadir olan türler
<b>Safha B</b>	Lokalize olmuş fakat dominant olan türler
<b>5. Safha</b>	Geniş bir dağılım alanına sahip olan ve dominant hale gelmiş türler

**Tablo 2.2.** İstilacı tür oluşumunda kullanılan terimler ve safhaları (Colautti and MacIssac, 2004)

<b>TERİM</b>	<b>SAFHA</b>
Yabancı (alien)	Safha 1-5
Kolonileşen (colonizing)	Safha 4a
Geçici (temporary)	Safha 2
Yayılan (spreading)	Safha 4a
Egzotik (exotic)	Safha 1-5
Göçmen (immigrant)	Safha 1-5
İstilacı (invasive)	Safha 4a, 4b, 5
İthal (imported)	Safha 1-5

### 2.1.2 İstilacı Türlerin Yayılma Yolları

Coğrafi bariyerlerle ayrılmış olan su ortamları iklim, tuzluluk vb. gibi parametreler açısından değişiklik göstermeleri nedeniyle farklı türleri bulundurlar. Fakat bu engel kaldırıldığında her iki yönden de canlı türleri geçişi meydana gelebilir. Yeni habitatlara uyum sağlayan canlılar bu habitatlara yerleşerek yerel türlerle rekabete girerler ve genellikle istilacı türler olur. Süveyş Kanalı kullanılmaya başlandıktan sonra Akdeniz'e 250'den fazla tür, 34 yeni cins ve 13 yeni familya ya ait daha önceden Kızıldeniz'de yaşayan balıklar ve yaklaşık bu balıklar kadar omurgasız canlı türü geçmiş olup bu durum halen devam etmektedir (Mooney and Cleland, 2001; Lasram et al., 2008).

Denizlerde artan gemi trafiğinden dolayı birçok canlının yumurta ve larvaları gemilerin su ile temas eden yüzeylerinin altına yapışarak başka noktalara yolculuk edebilmektedir. Bu metodla farklı bir alanlara taşınan yumurta ve larvalar, eğer hayatta kalabilmişlerse ve yeni çevreye uyum sağlayabilmişlerse, hızla bir şekilde artış gösterirler. Örneğin *Neogobius melanostomus* (Pallas, 1814) türü gösterilebilir. *N. melanostomus* Azak Denizi'nde, Hazar Denizi'nde, Karadeniz'de ve Marmara Denizi'nde bulunmaktadır (Charlobois et al., 1997). Bu tür Azak Denizi'nden barbun depoları ile taşınmıştır. Bu balıkların denizlerin tuzluluk sebebinin artması nedeniyle 1980'lerin sonlarında nesli tükenmiştir. Bunun sebebi yüksek buharlaşma oranı ve denize dökülen akarsuların sulama çalışmalarında kullanımıdır. Daha sonra tür Volga Nehri'nde ve sonrasında tüm Moskova Nehri'nde görülmüş ve hızlı bir şekilde sayısını arttırmış, bu bölgelerde istilaya sebep olmuştur.

Ticari olarak üretilen bazı yerel olmayan kültür balıkları üretildikleri işletmelerden kaçarak veya kaçırılarak etraftaki doğal sulara uyum sağlayabilir. Pekçok tür amaç dışı olarak yeni habitatlarda sorunlara sebep olmuştur. Diğer türlerle karışık olması, aşılama veya stoklama materyalinin temiz olmaması gibi durumlar bu sonucu meydana getiren faktörlerdir.

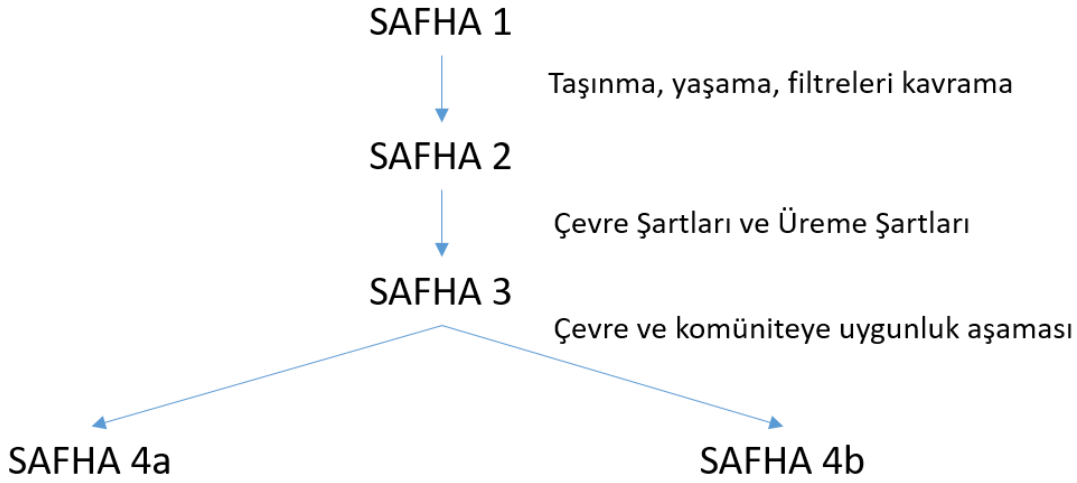
## 2.2 Türkiye Denizlerindeki İstilacı Balıklar

İstilacı türler yeni habitatlarına yerleştiklerinde hemen baskın hale gelmezler. Bu türlerin sayıları zamanla artar ve sonrasında yayılış alanları ve sayı olarak çoğalırlar. İstilacı türlerin ilk başlarda az sayıda bulunup daha sonra

sayılarının arttığı bu evre lag fazı olarak isimlendirilir. Lag fazında türler arasında hibridizasyon ve adaptasyon gerçekleşmektedir. Hibridizasyonla birlikte istilacı türler aynı türün yerel popülasyonlarından daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olurlar. Gözlenen istilacı tür sayısı az olmasına rağmen bu türün yerel türler üzerindeki genetik etkisi oldukça önemlidir (Echelle and Echelle, 1997).

Crooks ve Soule (1999) türlerin istilacı olmadan önce uzun süre bile sayıca az olarak bu habitatlarda bulduklarını belirtmişlerdir ve bu türlerin sayılarını az tutmalarını sağlayan birtakım mekanizmaların varlığından bahsetmişlerdir. Bu mekanizmalar türlerin yeni geldikleri ortamlara uyum sağlamalarını sağlar ve böylelikle istilacı türler ortamın olumsuz şartlarından en az seviyede etkilenirler. Kısacası bu habitatlarda ilk önce az sayılarda bulunurlar ve ortam koşullarına alıştıktan sonra sayıca artarlar. İstilacı türlerin sayılarını en az seviyede tutmalarına sebep olan bazı faktörler vardır. Bunlar, adaptasyon, genetik, biyotik ve abiyotik faktörler, değişiklikler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.1).

İstilacı türler yeni habitatlarında öncelikle az ve nadir bulunmaları daha sonraları ise baskın hale gelmeleri yapılan safha aşamalarının önemini belirtmektedir. Bu nedenle istilacı türün bu aşamaların hangisine dâhil olduğunun belirlenmesi yapılan çalışmalara kolaylık sağlamaktadır. Bu sayede yeni türün istilacı olup olmadığı kolayca belirlenebilir. İstilacı türlerin zaman içerisinde sayılarındaki artış ve baskın hale geldikten sonra buldukları bölgeye ağırlıklarını koymaları birtakım aşamalardan geçtikten sonra gerçekleşmektedir.



Çevre ve Komünite Aşaması

Lokal Dağılım Aşaması

Şekil 2.1. İstilacı tür oluşumu (Colautti ve MacIsaac, 2004'ten uyarlanılmıştır)

Bu türlerin yaşam döngülerinde görülen tolerans, geniş coğrafik alanlara dağılmaları ve buldukları ortamlardaki diğer türler ile aralarındaki mutualistik ilişkileri bu türlerin yeni habitatlarında başarılı bir hayat sürdürmelerine yardımcı olur. Biyoçeşitlilik sayısının azalması ve bazı türlerin neslinin tükenmesi biyolojik kaynakları güçsüz hale getirir. Fakat genetik açıdan konuya bakıldığında canlı çeşitliliği önem kazanmaktadır. Gelecekte insanlar ve ekosistemlerine yararı olacak olan biyoteknolojik gelişmeler biyolojik kaynakların gen havuzlarının sayılarındaki artışa bağlıdır. Biyoçeşitlilik ve ekosistem sürdürülebilirliğinin sağlanması açısından büyük bir tehdit olarak gözlemlenen istilacı balık türleri, tatlı su ekosistemleri üzerinde de büyük bir baskı oluşturmaktadır (Welcomme, 1988; Mack et al., 2000; Vitousek et al., 1997). Habitatta farklı türlerin görülmesi ortamın çeşitli ekolojik özelliklerinin değişebileceğinin bir öngörüsü olarak ifade edilir. Örneğin; bir istilacı balık türü olan *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844) doğal vejetasyon sayısının azalmasına neden olmaktadır. Yeni habitatlara göç eden bireylerin sayısında gün geçtikçe bir artış söz konusudur.

İstilacı balık türlerinde birbirlerine benzer bazı özellikler gözlenir ve bu türler diğer türlerden sahip oldukları bu benzerlikleri sayesinde ayırt edilir.

Aynı çevrede bulunan yabancı ve yerel türler birbirlerine zıt özellikler göstermektedirler. Bu özellikler; uzun ömürlü olmaları, kısa sürede üremeleri, erken olgunlaşma, vücut boyutları, yılda birden fazla yumurtlayabilme özellikleri, habitat esneklikleri vb. olarak sınıflandırılabilir. İstilacı balık türleri bu şekilde yerel türlerden ayırt edilebilir (Polat, vd., 2011)

İstilacı türlerin başarısı yerel alandaki sayıları ve dağılıma oranına bağlıdır. Sayılarında bulunan yoğunluk bu noktada anahtar olarak değerlendirilebilir. İstilacı ve yerel türler birbirlerinin tersi özellikler göstermektedir. Verimlilik, yaşam döngüsü istilacı ve yerel türlerin kıyaslanmasında en fazla kullanılan özelliklerdendir (Polat, vd., 2011).

İstilacı ve yerel türler arasındaki farklılıkların anlaşılması bilimsel açıdan önemli bilgilerin ortaya çıkmasına yardımcı olur. Üreme mevsimi, istilacı ve yerel türler arasında farklılık gösteren farklı bir parametredir (Ricciardi and Rasmussen, 1998; Williamson, 1996; Lockwood, 1999).

İstilacı balık türleri yerel türlerin alanına yayıldıkça, bu yayılma ile başa çıkamayan yerli türlerin nesli tükenmektedir. Egzotik canlılar küresel biyoçeşitliliğe zarar vermekte ve ekonomik sorunlara sebep olmaktadır. Bu nedenle bu türlerin bilinmesi biyolojik mücadele ve ekonomi için oldukça önemlidir. Bu türlerin yayılım alanlarının daraltılması ve popülasyonlarının azaltılmasına yönelik oluşturulacak eylem planları oldukça önemlidir. Hangi yolla gelirse gelsin yeni gelen istilacı türler yerli türler üzerinde çok sayıda olumsuz etkiler oluşturur. Yabancı türler hızlıca üreyebildikleri için kısa sürede popülasyonları artar ve o habitatta bulunan yerel türler ile ciddi bir besin ve alan rekabetine girerler. Bazı egzotik canlılar yeni habitata uyum sağlamada zorlanabilir fakat yine de sayıca maksimum seviyeye ulaşırlar. Eğer gelen istilacı tür avcı bir tür ise (genellikle iç sularda olan bir durumdur); besin zincirinde en üst halkada bulunduğu ve doğal düşmanlarının olmamasından dolayı hızlı bir şekilde üreyip, ortamdaki yerel türleri hızla tüketerek ekolojik bir çöküntüye neden olur (Polat, N. vd., 2011).

## 2.3 Akdeniz'deki Balon Balığı Türleri ve Özellikleri

Süveyş Körfezi ve Kızıldeniz'de genellikle tropik sularda yaşayan 120 tür balon balığı bulunmaktadır (Sabrah et al., 2006). Akdeniz'de bu türe ait; *L. lagocephalus* (L., 1758), *Lagocephalus spadiceus* (Richardson, 1845), *L. sceleratus* (Gmelin, 1789), *Torquigener flavimaculosus* (Hardy & Randall, 1983) *Lagocephalus suezensis* (Clark & Gohar, 1953), *Ephippion guttiferum* (Bennett, 1831), *S. pachygaster* (Muller & Troschel, 1848), *Sphoeroides marmoratus* (Lowe, 1838), *Sphoeroides spengleri* (Bloch, 1785), ve *Tylerius spinosissimus* (Regan, 1908) olmak üzere 10 türü belirtilmiştir. Bu türler balon balığı isminin dışında küre balığı, domuz balığı, kurbağa balığı, cüce balon balığı (Can ve Bilecenoğlu, 2003) ve benekli balon balığı (Tüzün, 2012) olarak da bilinmektedir. Böyle adlandırılmalarının nedeni, tehdit ve stres altındayken su veya hava yolu ile ventral kısımlarını şişirip predatörlerine daha büyük görünerek av olmayı engellemek için bir strateji yarattıkları olarak düşünülmektedir (Sabrah et al., 2006).

Balon balıkları, Tetraodontidae familyası altında bulunmaktadır. Çeneleri birbirine yapışmış durumda olup iki diş üstte, iki diş ise alttadır. Familyanın ismi de bu durumu izah etmektedir. (Tetra=dört, odon=diş). Bu familyanın en belirgin özelliği stres ve tehlike altındayken vücudunun karın kısmının ön yarısını suyla şişirebilmesidir. Bu nedenle, balon balığı adını almıştır. Familyanın bazı üyeleri herbivor, bazıları omnivor olabilirler. Bu türler çoğu şeyi tüketirler ancak bazı türler omurgasızları (sünger, ekinoderm, karides, yengeç, yumuşakça, mercan, gastropod), balıkları ve algleri tercih ederler (Kulbicki et al., 2005).

### 2.3.1 *Torquigener flavimaculosus*

*Torquigener flavimaculosus* batı Kızıldeniz'de kuzey Kızıl Deniz'den Basra Körfezi'ne ve güneyden Kenya'ya, Seyşeller ve Madagaskar'a kadar bulunduğu bilinmektedir. 3-57 metre arasında değişen derinliklerde bulunmaktadır. Mevcut popülasyon verileri, çok az habitat bilgisi ve ekoloji bilgisi bulunmamakla birlikte, önemli bir tehdidin olmadığı şüphesi yoktur.

*T. flavimaculosus* genellikle resiflerin yakınında bulunmaktadır ve deniz otu yataklarında yaygındır. Bu tür için bilinen maksimum toplam uzunluk 13 cm veya 130 mm erkek/çift cinsiyetlidir (Randall, 1995).



Şekil 2.2. *Torquigener flavimaculosus* (Zenetos, A. et al., 2007)

### 2.3.2 *Lagocephalus spadiceus* (Richardson, 1845)

*L. spadiceus*, Kızıl Deniz ve Hint-Pasifik'te yaygın olarak bulunan bir *Lessepsian* tür göçmenidir. 3-200 metre arasındaki derinliklerde çeşitli kıyı ve açık deniz habitatlarında bulunur. Ticari açıdan önemli olan *L. gloveri* türüyle karışık yakalamalarda gözükmektedir. *L. spadiceus* için koruma önlemleri *bulunmamaktadır*. Bununla birlikte, dağılımı, aralığının bazı bölümlerinde birkaç deniz rezerviyle örtüşmektedir. Aralığının bazı kısımlarında çok fazla avlanmış olmasına ve büyük olasılıkla nüfusun azalmasına rağmen, geniş kapsamlı bir türdür.

*L. spadiceus* tipik olarak deniz sularında yaşayan bir türdür ve aynı zamanda haliçlerde bir kısmında bulunabilir (Talwhar and Jhingran 1991). Genellikle sığ sularda ve kumlu diplerde 50 m'den az derinliklerde bulunur (Golani 1998, Tuncer *et al.*, 2008). Bu türün Tayland'da toksik olmadığı gözlemlenmiştir. Balıklar, yumuşakçalar ve kabuklular ile beslenir.

Doğu Asya'nın bazı bölgelerinde balon balığı kaynaklarının tükenmesinde, aşırı avlanma çabası yerine, modifiyeli uzun hatlar, küçük ağ ölçülerine sahip ağlar dahil olmak üzere son derece etkili olta takımları etkili olmuştur. Japonya'da, 2000'lerin ortasında balıkçılığı düzenlemeye yönelik

çalışmalar 2010 yılına kadar istenen sonuçları elde edememiş ve sonradan yeniden değerlendirilmiştir.



Şekil 2.3. *Lagocephalus spadiceus* (Tuncer ve Aslan, 2008)

### 2.3.3 *Lagocephalus suezensis*

Güney, Ege, Akdeniz`de yaşayan bir örnektir. Derinliği 40 metreye kadar olan sularda, kumlu ve çamurlu zeminlerde rastlanır. En fazla 18 cm boyuna ulaşmaktadır. Hint-Büyük Okyanus göçmeni bir türüdür. Üst ve alt çenesinde 2 adet gaga şeklinde dişleri mevcuttur. Vücudunda ağızdan başlayıp kuyruğa kadar uzanan gümüş renkli bant bulunur.

Genellikle yaz aylarında ürerler, larvaları planktoniktir. Ekonomik değeri yoktur. İç organlarında bulunan zehir yüzünden tüketilmesi tehlikeli olabilir ancak Uzakdoğu ve Japonya`da özel uygulamalarla zehrinden arındırılarak yenmektedir.

En irisi 90 cm olan ve çoğunun derisi dikenlerle kaplı olduğundan, şiştikleri zaman bir kirpiyi anımsatırlar. TTX adı verilen çok güçlü zehirleri mevcuttur. Bu zehir balığın özellikle karaciğerinde, bağırsaklarında ve kanında yoğunlaşmıştır.

Dişleri birbirleriyle kaynaşarak gaga şeklini oluşturur. Bu yüzden yumuşakçaların ve kabukluların kabuğunu kırabilmekte, mercan öbeklerini parçalayabilmektedir. Bu balıklar daha çok haliçlerin sığ ve ılık sularında, mercan kayalıklarının yakınlarında, deniz diplerindeki bitkilerin arasında görülür.



Şekil 2.4 *Lagocephalus suezensis* (www.fishbase.org)

#### 2.3.4 *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789)

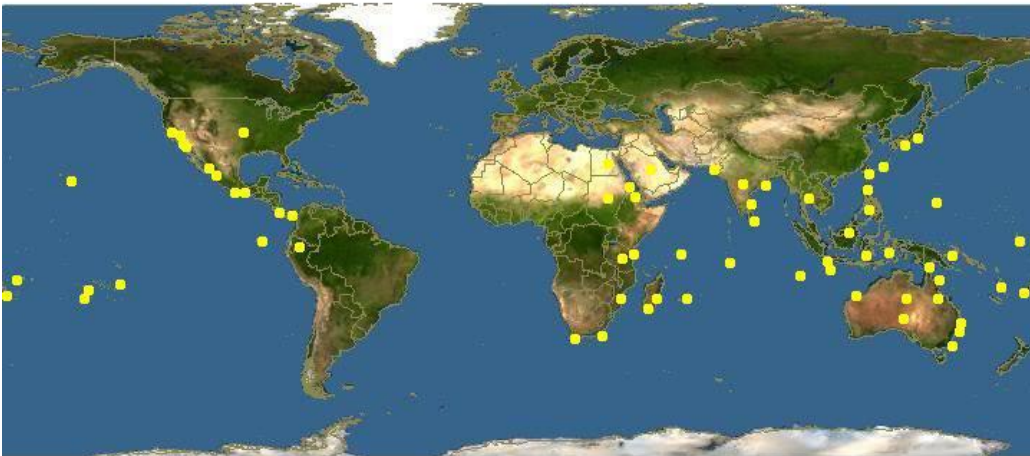
Tetraodontidae familyasının üyesi olan bu türün vücut şekli torpile benzemektedir. Vücutta deri pullara çok rastlanmaz fakat karın bölgesinden anüse kadar yanlarda da pektoral yüzgeçlere kadar kısa dikencikler mevcuttur. Vücudun yan taraflarında ağzın gerisinden kuyruk sapına kadar uzanan gümüş şerit vardır. Karın kısmı beyazdır. Ağız başın ucuna yerleşmiş, çenede bulunan dişler 4 adetten oluşmuş ve kuş gagasını anımsatan bir hal almıştır. Oldukça güçlü olan bu dişler sayesinde sert mercanlar ve omurgasızların kabuklarını rahatlıkla tüketebilirler. İndopasifik bölgelerde oldukça yaygın bir türdür (Froese and Pauly, 2010). Akdeniz'e Süveyş Kanalı yolu ile geçen bu türün ilk kaydı, Türkiye'nin Ege Deniz'i kıyısında yer alan Gökova'da Akyol ve ark. (2005) tarafından tespit edilmiştir. Bu tür ürettiği TTX ile bilinir. TTX oldukça zehirli bir nörotoksindir ve indo-pasifik bölgelerde ölüm vakalarına sebep olmuştur (Sabrah et al., 2006). Ticari değeri yoktur daha çok denizin kayalık ve bitkilerle kaplı zeminlerini tercih ederler. Kumluk ve çamurluk gevşek zeminlerde trol, gırgır ve oltalar ile yakalanırlar (Golani et al., 2010a).



Şekil 2.5. *Lagocephalus sceleratus* (Fotoğraf: İnci Tüney Kızılkaya)

#### 2.4 Akdeniz’ deki *Lagocephalus sceleratus* Türünün Dağılımı ve Özellikleri

Atlas, Hint ve Pasifik Okyanusu’nda, genellikle 18-20 m derinliklerde, tropikal ve subtropikal alanlarda bulunurlar (Nelson, 2006). Fakat daha sonrasında Süveyş Kanalı varlığıyla sularımıza gelerek yeni bir habitat bulmuş ve yayılma göstermişlerdir.



Şekil 2.6. *Lagocephalus sceleratus* türünün dünyadaki dağılımı (Özbay, 2015).

2009 yılında Kıbrıs'ın yabancı türlerini inceleyen bir araştırmada ve Türkiye'de 2010 yılında Akdeniz havzasının yerli olmayan balık türlerini inceleyen bir araştırmada da *L. sceleratus* türü gözlemlenmiştir (Katsenevakis et al., 2009; Oral, 2010).

Bulunduğu çevreye hızlı bir şekilde uyum sağlaması ve değişik bölgelerde görülüyor olması *L. sceleratus* türünün farklı çevresel koşullara çok iyi uyum sağladığını ve yerel türlerin çeşitliliğini veya sayılarının fazlalığı yakın gelecekte etkileyebilme ihtimalinin bir göstergesi olarak gösterilmektedir (Katikou et al., 2009). Libya'da 2005–2006 yılları arasında yapılan bir çalışma sonucuna göre; Türkiye'deki ilk kaydından sonra *L. sceleratus* Doğu Akdeniz de en fazla karşılaşılan lessepsiye balık olduğu bildirilmiştir (Shakman et al., 2007).

## 2.5 Denizel Toksinler

Deniz ürünleri tüketiminde bazı zehirlenmeler meydana gelebilir. Bunlara sebep olan etmenlerin başında virüsler (Hepatit A, Poliovirus), bakteriler (*Vibrio* sp.), parazitler (*Diphyllobothrium latum*, *Pseudoterranova decipiens*, *Anisakis simplex*) ve bazı toksinler (saksitoksin, yessotoksin, domoik asit, tetradotoksin, maitotoksin) bulunmaktadır (Terzi, G., 2008).

Bu toksinlerin çoğu ısıya direnç gösterdiğinden dolayı pişirme işlemlerinde inaktive olmazlar. Denizel toksinler kabuklu su ürünlerinin neden olduğu zehirlenmeler ve balıkların neden olduğu zehirlenmeler olarak ikiye ayrılmaktadır.

Kabuklu su ürünleri zehirlenmeleri toksik dinoflagellatların tüketilmesiyle ortaya çıkar. Paralitik kabuklu su ürünleri zehirlenmesine (Paralytic Shellfish Poisoning-PSP) sebep olan toksinleri algler bünyelerinde bulundurur ve çift kabuklu yumuşakçalar tarafından tüketilmesi sonucu bu canlıların sindirim organlarında ve yumuşak dokularında depo edilir (Terzi, G., 2008).

Bu Dinoflagellatlar sıcağa ve aside dirençli 12 toksin üretirler. PSP toksinleri karbamat toksinleri, sülfokarbamil toksinleri ve dekorbomil toksinleri olmak üzere üç farklı gruba ayrılır (Tablo 2.3). En toksik özellik gösteren grup saksitoksin, neosaksitoksin ve gonyatoksini bünyelerinde bulunduran karbamat toksinleridir (Terzi, 2008).

**Tablo 2.3.** Paralitik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi (Paralytic Shellfish Poisoning-PSP)  
(Terzi, G., 2008)

<b>Karbamat toksinleri</b>	<b>Sülfokarbamil toksinleri</b>	<b>Dekarbamil toksinleri</b>
Saksitoksin	Gonyatoksin 5, 6	Adlandırılmamış
Neosaksitoksin		
Gonyatoksin 1, 2, 3, 4		

Diyaretik kabuklu su ürünleri zehirlenmesi (Diarrhetic Shellfish Poisoning-DSP), bazı dinoflagellatlar tarafından üretilen toksinlerdir. Okadaik asit, dinofisis toksin, yessotoksin ve peptonotoksin bunların başlıcalarıdır. Bu toksinler yağda çözülebilen polieter yapıdadır (Terzi, G., 2008).

Nörotoksik kabuklu su ürünleri zehirlenmesine (Neurotoxic Shellfish Poisoning-NSP), *Karenim brevis* adı verilen bir dinoflagellat sebep olmaktadır. NSP proteoin olmayan yapıda olup ısıya ve aside dirençli, yağda çözülebilen polieter yapıdadır (Terzi, G., 2008)

Amnezik kabuklu su ürünü zehirlenmesine (Amnesic Shellfish Poisoning-ASP), diatomlar tarafından üretilen domoik asit sebep olmaktadır. Domoik asit suda çözünen bir yapıda olup, dondurma işlemine dayanıklı ve aside duyarlıdır.

Balıkların neden olduğu zehirlenmelerden biri olan Cigutera balık zehirlenmesi tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan mercan kaya balıklarının tüketilmesi sonucu oluşan bir zehirlenme türüdür. Zehirlenmeye sebep olan ciguatoksin ve maitotoksin *Gambrierdiscus toxicus* adında bir flagellat tarafından üretilmektedir. *G. Toxicus* ilk olarak herbivor balıklar tarafından alınmaktadır daha sonra besin zinciri ile karnivor türlere geçmektedir. Bu toksin yağda eriyen, renksiz, kokusuz ve tatsız bir toksindir. Pişirme, dondurma ve aside karşı dirençlidir. Bu toksini içeren balıklar yenildiğinde ilk olarak ağızda uyuşukluk ve yanma oluşur. Daha sonra kol ve bacaklara yayılır. Semptomlar kardiovasküler, nörolojik ve gastrointestinal olmak üzere üç farklı sistemi etkilemektedir.

Yüksek düzeyde histamin ve diğer vazoaktif aminleri içeren gıdaların tüketilmesiyle Skombroid balık zehirlenmeleri meydana gelmektedir. Diğer adıyla histamin zehirlenmesi olarakta bilinmektedir. Skombrotoksinin kimyasal yapısı

henüz bilinmemektedir. Bu toksin her türlü pişirme işlemlerine karşı dirençlidir. Tadı ve kokusu olmadığından duyularla tespit edilmesi mümkün değildir.

Puffer balık zehirlenmesi, Tetraodontidae familyasına ait balıkların tüketilmesi sonucu ortaya çıkan zehirlenme türüdür. Zehirlenmeden sorumlu olan TTX diğer toksinlerde olduğu gibi algler tarafından üretilmemektedir. Yapılan çalışmalar bu toksini Vibrionaceae familyası üyeleri, *Pseudomonas* sp. Gibi bakteri türleri tarafından sentezlendiği bilinmektedir.

*Pfiesteria piscicida* zehirlenmesine yüzlerce balığın ölümüne sebep olan bir dinoflagellat türü *Pfiesteria piscicida* sebep olmaktadır. *Pfiesteria* sp. Türleri fitoplanktonlarla beslenir ve tek hücreli organizmalardır. Çok çabuk sürede şekil değiştirirler ve yaşam döngüleri boyunca 24 farklı forma dönüşebilirler. *Pfiesteria* türlerinin iki farklı toksini olduğu belirtilmiştir ve yağda çözünenlerin deride, suda çözünenlerin ise nörotoksik etkileri olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 2.4.** Balıkların neden olduğu zehirlenmeler (Terzi, G., 2008)

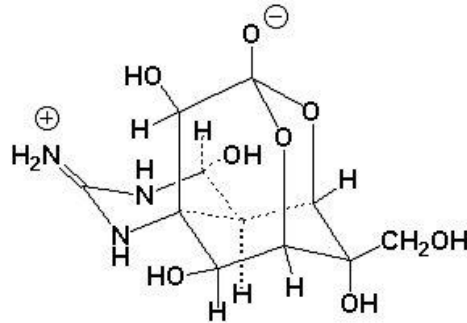
<b>İntoksikasyon</b>	<b>Toksijenik mikroorganizma</b>	<b>Toksin</b>	<b>Sorumlu deniz ürünü</b>
<b>Ciguatera</b>	<i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Ostreopsis lenticularis</i>	Ciguatoksin Maitotoksin Skaritoksin	Kaya balığı
<b>Skombroid</b>	<i>Morganella morgani</i> ve diğer histidin bakteriler	Histamin ve diğer biyojen aminler	Skombroid balık türleri Mahi mahi Lüfer
<b>Puffer balık zehirlenmesi</b>	Vibrionacea <i>Pseudomonas</i> spp <i>Photobacterium phosphoreum</i>	Tetradotoksin	Pufferfish Globefish Toadfish
<b><i>Pfiesteria piscicida</i> zehirlenmesi</b>	<i>P. piscicida</i> <i>P. shumwayae</i>		

### 2.5.1 Tetrodotoksin

Protein bir yapıya sahip olmayan TTX, denizel ortamdaki en güçlü felç edici organik bir bileşiktir (Hanifin, 2010).

TTX ismi balon balıklarından (Tetraodontidae) gelmektedir ve ilk olarak 1950 yıllarında balon balıklarının yumurtalarından izole edilmiştir. Uzun yıllar boyunca TTX'in sadece balon balıklarında bulunduğu düşünülüyordu. Daha sonra bu toksine çok daha geniş alandaki canlılarda da rastlanmıştır örneğin dinoflagellatlardan *Alexandrium tamarense*, kırmızı alg *Jania* sp., planaryalardan *Bipalium adventitium* ve *Bipalium kewense*, yengeçlerden *Atergatis floridus*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, gastropodlardan *Nassarius clathrata*, mavi halkalı ahtapot *Hapalochlaena maculosa*, deniz yıldızı *Astropecten scoparius* ve *A. polyacanthus* (Stokes et al., 2014; Asakawa et al., 2013).

TTX, protein yapıda olmayan, organik, kristal olarak bulunan, renksiz ve kokusuz bir toksik maddedir (Woodward, 1964). Molekül Formülü  $C_{11}H_{17}N_3O_8$ ; molekül ağırlığı (MA) 319.2706 ve CAS numarası 4368-28-9'dır. IUPAC adlandırması Octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9:7,10a-dimethano-10aH[1,3]dioxocino [6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol'dür.



Şekil 2.7. Tetrodotoksinin kimyasal yapısı (Neagu et. al., 2006)

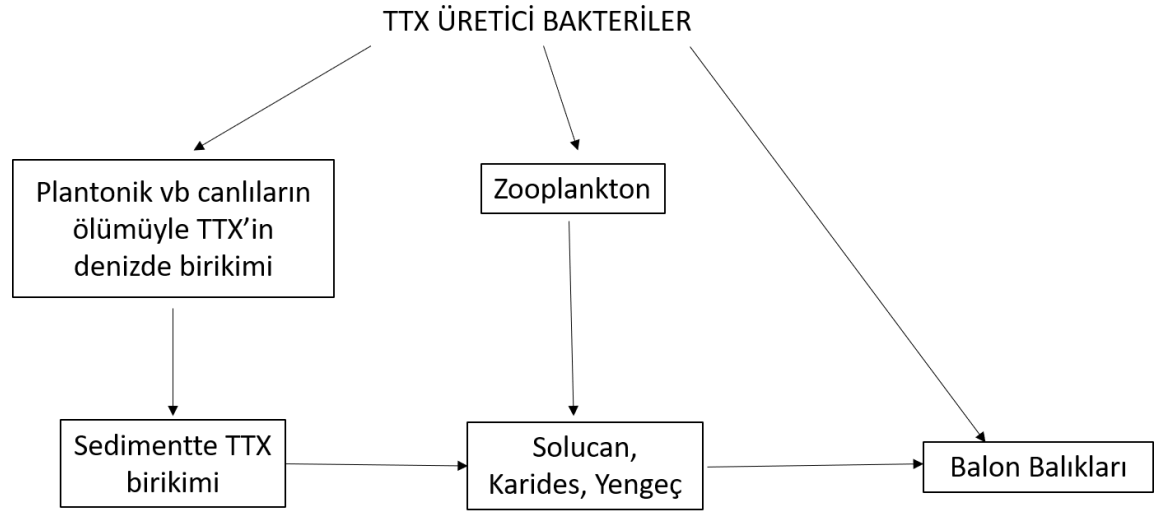
TTX, protein yapıda olmamasından dolayı, ısıya dirençli bir toksindir ve pişirmeyle yapısı bozulmamaktadır (Kao, 1972; Noguchi and Ebesu, 2001; Hwang and Noguchi, 2007; Chua and Chew, 2009). Ancak TTX kristalleri 220°C' üzerinde erimeden koyulaşabilmektedir.

TTX, sinir zarları üzerindeki voltaj kapılı sodyum kanallarına bağlanarak sinir iletimini bloke eder ve motor felci ve nihayetinde boğulma nedeniyle ölüme

neden olur. Siyanüre göre 275 kat daha öldürücüdür (Haque et al., 2008). Bununla birlikte, bazı kaynaklarda insanlar için siyanürden 1200 kat daha zehirli olduğu bildirilmiştir (Nader ve ark., 2012). Bilinen bir panzehiri bulunmamaktadır.

*V. alginolyticus*, *Shewanella alga*, *S. putrefaciens*, *Pseudomonas* sp. ve *Alteromonas tetraodonis* gibi deniz bakterileri tarafından üretilen TTX, ölü planktonik hücrelerin üzerine adsorbe edilen ve çökeltilen deniz suyunda çözülür veya ayrışma yoluyla sedimanda birikir. Besin zinciri yoluyla, küçük zooplankton, detritus besleyici, yassı kurt, şerit kurdu, ok kurdu, ksantit yengeç, küçük gastropod ve iskelet karidesi gibi birincil tüketici, oluşan tortu üzerindeki ölü planktonik hücrelerle beslenir.

İkincil tüketici olarak bilinen balon balığı, tropikal kaya balığı ve karından bacaklılar da vücutlarında TTX'e sahiptirler. İkinci yol, TTX üreten deniz bakterilerinin parazit gibi davranması veya küçük zooplankton, detritus besleyici veya kirpi balığı, tropikal gobiler ve gastropodlar gibi diğer daha büyük deniz hayvanları ile simbiyotik ilişki oluşturmasıdır (Şekil 2.8) (Azhar, 2012).



Şekil 2.8 Ekosistemde tetradotoksin birikim mekanizması (Hwang and Noguchi, 2003)

Balon balıklarının neden toksik olabileceğine dair birkaç teori vardır. Bir teori, bu balıkların diğer avcılara karşı bir tür savunma mekanizması olarak

toksini kendilerinin ürettiğini yönündedir. Başka bir teori, zehirli balon balıklarının içinde doğal olarak yaşayan bakteriler olduğunu ve bu toksinleri yalnızca belirli balon balığı türlerinde ürettiklerini öne sürmektedir.

Araştırılan bir başka olasılık ise diğer çevresel faktörlerin bir rol oynayabileceğidir.

TTX, bir sodyum kanal blokeridir. Toksin, kurbanın uyarılabilir dokularının (kaslar ve sinirler) sodyum kanallarına bağlanır ve kanallar yoluyla sodyum iyonlarının inhibisyonu bu dokuları etkin bir şekilde hareketsiz hale getirir. İnsanlarda TTX zehirlenmesi semptomlarının yutulduktan sonraki başlangıcı ve zehirlenmenin ciddiyeti doza bağlıdır. İlk semptomlar, dilde ve dudaklarda karıncalanmayı (parestezi), ardından baş ağrısı ve kusmayı içerir ve bu durum kas zayıflığına ve ataksiye ilerleyebilir. Ağır vakalarda solunum ve/veya kalp yetmezliği nedeniyle ölüm meydana gelebilir. TTX intoksikasyonunun tek tedavisi gözlem ve uygun destekleyici bakımdır (Bane et al., 2014).

*Takifugu rubripes*, *Lagocephalus wheeleri*, *L. gloveri* ve *Takifugu xanthipterus* gibi balon balığı türleri, TTX içeren organizmaların istilasının tamamen engellendiği su ürünleri yetiştiriciliği gibi bir ortamda TTX içermeyen diyetlerle beslendiklerinde toksik olmadıkları gözlemlenmiştir (Bane et al., 2014).

TTX'in kas doku ve özellikle kanda neredeyse yok olduğu düşünülmektedir. Birkaç balon balığı türü toksik olsa da toksik olmayan veya daha az toksik olan ve insan tüketimine uygun belirli türler vardır.

Balon balığının TTX içeriği, balon balığı türlerinin yapısına ve iç organlarına bağlı olarak 5000 ila 15000 MU/g doku (1-3 mg/g doku) arasında değişebilir. 0,2 µg'a eşdeğer olan 1 MU (mouse unit), intraperitoneal uygulamadan 30 dakika sonra 20 gr'lık bir erkek fareyi (ddY suşu) öldürmek için gereken toksin miktarı olarak tanımlanır (Noguchi and Arakawa, 2008; Arakawa et al., 2010; Azhar, 2012).

Balon balığı TTX'in insanlar için minimum öldürücü dozu sadece yaklaşık 2 µg/kg vücut ağırlığıdır (Hwang ve Noguchi, 2007).

TTX taşıyan organizmalar TTX'in toksik etkilerine karşı dirençlidir. Bunun nedeni, bu hayvanlarda sodyum kanallarındaki alan I'in p-döngü bölgesindeki aromatik amino asit zincirinin yerini aromatik olmayan bir amino asit alması ve bu da bu türlerdeki sodyum kanallarının bloke olmasını engellemesidir. TTX'e direnç, balon balığı, *Takifugu niphobles* ve *Fugu pardalis* türünde bulunan bir TTX bağlayıcı proteinin varlığıyla da ilişkili olabilir (Bane et al., 2014).

### 2.5.2 TTX Üreten Bakteriler

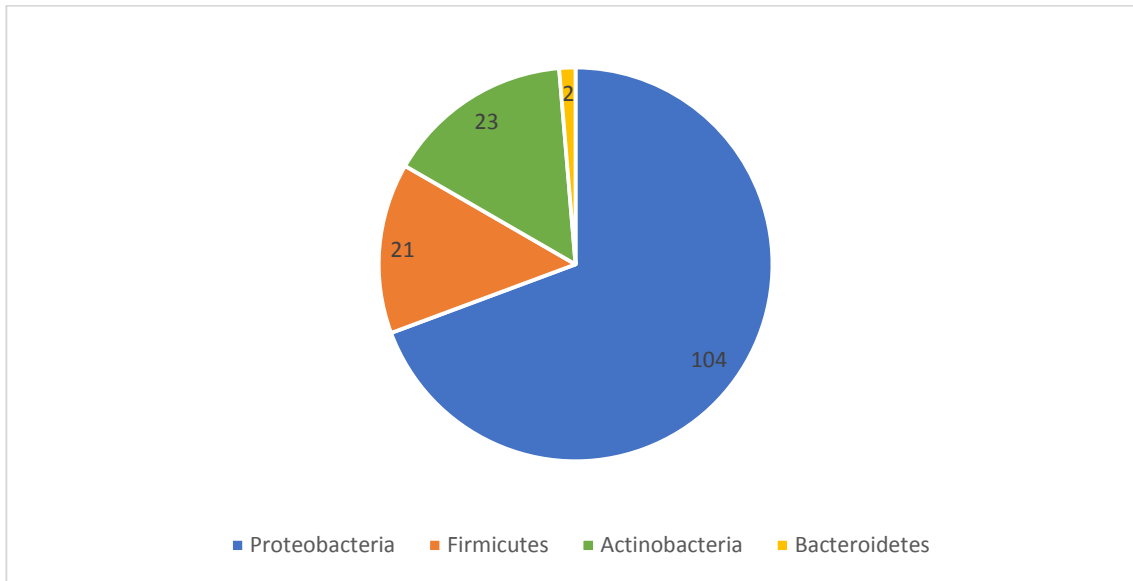
TTX üreten mikroorganizmaların keşfi, genellikle gıda zehirlenmesine neden olan TTX taşıyan hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla doğrudan bağlantılıdır. Noguchi et. al. (1986) ilk olarak TTX taşıyan hayvanlarda TTX üreten simbiyotik mikrofloranın varlığını göstermiştir. *Vibrio* cinsi bakterileri bir yengeç olan *Atergatis floridus* türünün bağırsağından izole etmiş ve HPLC-FLD ve GC-MS yöntemleriyle hücresel bir ekstrakt ve kültür ortamında TTX tespit etmişlerdir. Aynı yıl, TTX üreten suş *Pseudomonas* sp. kırmızı alg *Jania* sp izole edilmiştir (Yasumoto et al., 1986). Son çalışmada, toksik mikroalg *Prorocentrum* tarafından üretilen TTX analogları *Roseobacter* ve *Vibrio* cinslerinden simbiyotik bakterilerle ilişkili olduğu bulunmuştur (Rodriguez et al., 2017).

Sonraki yıllarda, denizdeki TTX taşıyan hayvanların bakteriyel simbiyotlarının araştırılması ve bunların toksin üretme yetenekleri büyük ilgi görmüştür. 1987'den 1995'e kadar, TTX üreten bakteriler, Pasifik Okyanusu'nda toplanan birkaç hayvandan izole edilmiştir: denizyıldızı *Astropecten polycaanthus* türünün (Narita et al., 1987) bağırsağından, birkaç balon balığı türünden (*Takifugu vermicularis vermicularis* (Noguchi et al., 1987), *T. poecilonotus* (Yotsu et al., 1987), *T. niphobles* (Matsui et al., 1989)); *Octopus maculosus* türünün bağırsak, tükürük bezleri ve dokunaçlarından (Hwang et al., 1989), at nalı yengecinin bağırsağından *Carcinoscorpius rotundicauda* (Kungsuwan et al., 1989); deniz gastropodları *Natica lineata* (Hwang et al., 1994) ve *Niotha clathrata* (Ritchie et al., 2000) türlerinin kas ve sindirim bezlerinden izole edilmiştir. Daha sonra, Karayip kıyı

sularındaki deniz kestanesi *Meoma ventricosa* türünde TTX üreten bakteriler bulunmuştur (Ritchie et al., 2000).

1988'de Kogure ve ark. (Kogure et al., 1988), deniz sedimanlarında yüksek TTX konsantrasyonu gözlemlemiş, 10 g sediman örneklerinin, bir fare öldürücü dozda toksin içerdiğini tespit etmişlerdir. Hem derin deniz sedimanları (4.033 m derinlik) hem de kıyı bölgesinden (21 ve 81 m derinlikler) gelen tortuların TTX içerdiği gösterilmiştir. 8 cinsin 28 TTX üreten bakteri suşu, derin su tortu örneklerinden izole edilmiştir (Do et al., 1990; Do et al., 1991). Deniz çökeltilerinden aktinomisetler, basiller ve mikro koklar gibi tipik karasal bakterilerin izolasyonu, mikrobiyal TTX üreticilerinin varlığı için tatlı su çökeltilerinin araştırılmasıyla sonuçlanmıştır.

Hem deniz hem de tatlı su sedimanlarından TTX taşıyan organizmalar üzerinde yapılan araştırmada, 31 bakteri türünün TTX ürettiği belirlenmiştir (Şekil 2.9). İzole edilen suşların çoğunun Proteobacteria filumuna ve Gammaproteobacteria sınıfına ait olduğu tespit edilmiştir (cins *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alteromonas* vb.). Yapılan çalışmalarda Alphaproteobacteria ve Betaproteobacteria, çok az sayıda da Actinobacteria filumlarında TTX üreten bakteriler gözlemlenmiştir.



Şekil 2.9 Tetradotoksin üreten bakteri grupları (Magarlamov et al., 2017)

Çalışmada en az 150 bakteri suşu incelenmiş ve TTX üreten birçok hayvanda *Vibrio* sp. cinsinin temsilcileri %30'dan fazlasını oluşturmaktadır. Çoğu çalışma, suda yaşayan hayvanların mikroflorasında toksin üretimi ile *V. alginolyticus* varlığı arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. *Bacillus* cinsinin temsilcileri, izole edilmiş TTX suşlarının yaklaşık olarak %15'ini oluştururlar. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Streptomyces* ve *Rosebacter* suşları TTX üreten bakterilerin %7'sini oluşturmaktadırlar.

### 2.5.2.1. *Vibrio alginolyticus*

*V. alginolyticus* ilk olarak 1955 yılında hastaneye gelen Japonya'da hastaneye başvuran bir bireyde tespit edilmiştir. Sakazaki ve ark., (1963) ilk olarak *V. parahaemolyticus* tip 2 olarak isimlendirmiş fakat 1968'de yapılan çalışmalarla *V. alginolyticus* isminde yeni bir tür etkeni olarak sınıflandırılmıştır (Sakazaki et al., 1968; Timur and Timur, 2003).

*V. alginolyticus* Türkiye'de ilk olarak Çağırğan tarafından 1993 yılında tespit edilmiştir. İlk olarak balıkların dalak, karaciğer ve böbreklerinden izole edilmiştir. Deniz balığı yetiştirilen tanklardaki sulardan izole edilmiş, bu nedenle enfeksiyonun ortaya çıkmasında kontamine suyun da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Çağırğan, 1993; Yaman et al., 2003; Buller, 2014; Mustapha et al., 2013; Austin and Austin, 2012).

Vibrionaceae familyasına ait, gram negatif, çomak şeklinde, hareketli, guanin ve sitozin (G+C) içeriği %45- 47 olan etkenin 37°C'de %7 NaCl içeren besi yerinde üreyebildiği tuzsuz ve %10 tuz ilave edilmiş ortamda üreyemediği belirtilmiştir. TSA besiyerinde yayılımcı tarz koloni oluşturmasıyla diğer *Vibrio* türlerinden ayrılmaktadır. TCBS agarda geniş sarı koloni oluşturur ve deniz tuzu içeren kanlı agarı hemolize eder. *V. parahaemolyticus* ile oldukça benzer özelliklere sahiptir. Aynı şekilde *V. alginolyticus* ve *V. harveyi* türleri arasında benzerliği yüksektir. Bu iki türü ayırt etmek için VP testi ve glukuronat fermentasyonu testleri kullanılmaktadır (Mustapha et al., 2013; Buller, 2014). *V. Anguillarum* türünde olduğu gibi etkenin virulensi çevresel faktörlere (tuz, sıcaklık gibi) göre değişkenlik göstermektedir (Stickney, 2000).

Japonya’da kontamine deniz ürünlerini çiğ tüketen insanların dışkılarından izole edilmiştir. Ayrıca İngiltere’de 2011 yılında yapılan bir çalışmada yüzeysel yaralanması olan insanlarda etken nedeniyle kontamine deniz suyu temasıyla kulak enfeksiyonu vakaları ile karşılaşmıştır (Korun, 2005).

#### **2.5.2.2. *Pseudomonas* sp.**

*Pseudomonas* genusunun Migula tarafından tanımlanmasından günümüze kadar geçen yüzyıldan fazla sürede bu genusa ait birçok tür tespit edilmiş ve bu türlerin pek çok alana yayıldığı gözlemlenmiştir. Bu genus üyeleri filogenetik çeşitlilik bakımından zengindir. Fenotipik farklılıklar gösterdiklerinden yıllardır pek çok araştırmacının çalışma konusu olmuştur.

*Pseudomonas* genusu üyeleri, yıllar içerisinde Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ve Bergey's Manual of Determinative Bacteriology başta olmak pek çok kaynakta yer almaktadır. Aerob *Pseudomonas* sp. türlerinin karakterizasyonu 1926 yılında den Dooren de Jong tarafından yapılan çalışmalarla başlamıştır. Den Dooren de Jong *Pseudomonas* sp. türlerinin çok büyük bir biyokimyasal çeşitliliğe sahip olduğunu ortaya çıkarmış olsa da bakteriyel biyokimyacıların dikkatini bu konuya çekmekte başarılı olamamıştır. Bakteriyologlar bu genusun taksonomik yapısını açıklamak için çalışmalara ancak 40 yıl sonra başlamışlardır. Bu çalışmaların sonucunda *Pseudomonas* sp. türleri çeşitli organik bileşikleri karbon ya da enerji kaynağı olarak kullanımlarına göre fenotipik karakterleri temel alacak şekilde sınıflandırılmıştır.

### **3 MATERYAL VE METOD**

#### **3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri**

##### **3.1.1 Alkalın Pepton Water (APW)**

1 litre distile su içerisinde 10 gr pepton ve 10 gr sodyum klorid çözdürülür. pH 8.5 olacak şekilde ayarlanır. Otoklavlama işlemi yapılır.

##### **3.1.1. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)**

1 litre distile su içerisinde 8,5 gr NaCl çözdürülür. Otoklavlanması gerekmektedir.

##### **3.1.3. Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS)**

1 litre distile su içerisine 88 gr TCBS (MERCK, 110263) eklenir. Otoklavlama yapılmaz. Bek alevinde düzenli karıştırılarak, kaynatılır ve uygun koşullarda petri kabına dökülür. Rengi koyu yeşildir.

##### **3.1.4. Emerson Agar**

1 litre distile su içerisine 6 gr tripton, 10 gr yeast extract, 20 gr glukoz, 2 gr NaCl ve 20 gr agar çözdürülür. pH 7 olarak ayarlanır. Otoklavlanması gerekmektedir.

#### **3.2 Kullanılan Başlıca Cihazlar**

- Vorteks (Biocote)
- Thermal Cycler (Bio-rad T100)
- Mikroskop (Olympus)
- Otoklav (Hirayama HMC)
- İnkübatör (Infors HT Ecoton)
- Terazi (Sartorius)
- Hassas Terazi (Precisa XB 220A)
- pH Metre (SevenEasy MettlerToledo)
- Manyetik Karıştırıcı (Biosan)
- Sıcak Su Banyosu (Nuve NB 5)
- Jel Elektroforez Görüntüleyici (m.biotech SeeNA LED Illuminator)

### 3.3 Balık Materyalinin Toplanması

Çalışmada kullanılan *L. sceleratus* türü balon balığı örnekleri, mevsimsel olarak Muğla-Göcek (Şekil 3.1) kıyılarında balıkçılık yapan balıkçılardan alınmıştır. Balıkçıların ağlarına takılan bu balıklar ölü olarak temin edilmiştir. Bu balığa özgü herhangi bir yakalama yöntemi kullanılmamıştır, ağlara takılan ıskarta balon balığı örnekleri alınmıştır. Balon balıklarının karaya çıkarılmasının yasak olması nedeniyle çalışmayı gerçekleştirebilmek için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan balon balığı toplama ve karaya çıkarmak için özel izin alınmıştır.



Şekil 3.1 Örneklerin toplandığı alan. (<https://www.bluecruise.org/English/gocekbay.html>)

Balıkçıdan mevsimlik olarak temin edilen örneklerin toplanma tarihleri kayıt edilmiştir. Diseksiyon işlemi öncesinde balığın kuyruk kısmına kadar olan uzunluğu cm (boy) cinsinden, daha sonra kuyruk dahil olarak uzunluğu cm (total boy) cinsinden ölçülmüştür. Hassas el terazisi ile balığın ağırlığı kg cinsinden ölçülmüş ve diseksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Diseksiyon işlemi hava koşullarına bağlı olarak toplandı ve tekne içerisinde yapılmıştır. Kötü hava

koşulları nedeniyle bazı mevsimlerde örneklerin diseksiyon işlemi laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



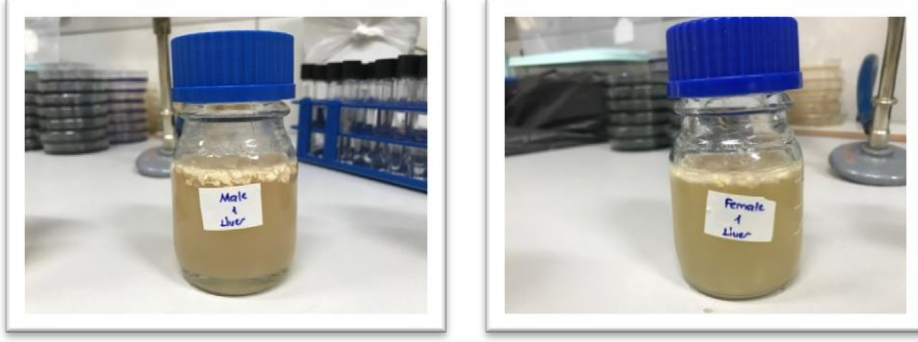
**Şekil 3.2** Laboratuvar ortamında gerçekleştirilen diseksiyon işlemi (Fotoğraf: Yezdan Kıvılcım)

Diseksiyon işlemi yapılan örneklerin cinsiyetleri belirlenmiştir. Gonad ve karaciğerlerin ölçümü g cinsinden kaydedilmiştir. Disekte edilen gonad ve karaciğerler önceden steril edilen ve içerisinde Fizyolojik tuzlu su (FTS) bulunan kapların içine konmuştur.

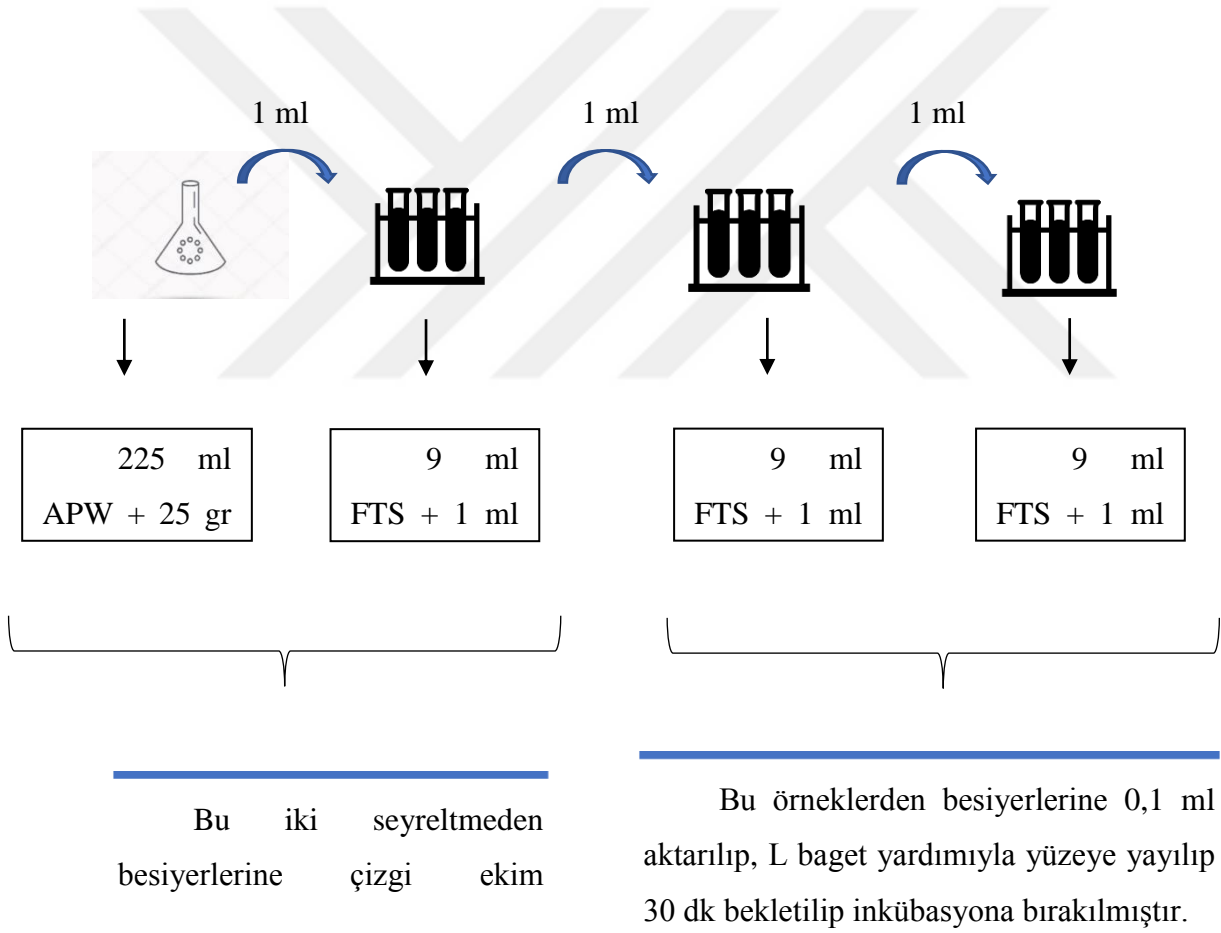
Her mevsim için 2 adet dişi 2 adet erkek olmak üzere toplam olarak 16 *L. sceleratus* örneği çalışmada kullanılmıştır.

### **3.4 Bakteri Kültürü ve İzolasyonu**

FTS içerisinde laboratuvar ortamına getirilen örneklerden 25 g alınıp iyice ezildikten sonra 225 ml alkalın pepton water (APW) içerisine konulmuştur (Şekil 3.3). Bu işlemden sonra örnekler 30°C`de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler ertesi gün alınıp, seyreltme işlemi yapılmıştır ve besiyerlerine ekim işlemine hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3 Alkalın pepton water içerisinde inkübe edilen doku örnekleri (Fotoğraf: Burcu Alkış)



Şekil 3.4 Doku örneklerinin bakteri kültürü için hazırlanması. Örnekler 28°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Morfolojik olarak *Vibrio* sp. olduğundan şüphelenilen büyük sarı koloniler tip tür kullanarak belirlenmiştir.

Morfolojik olarak *Vibrio* sp. olduğu tahmin edilen izolatlar yatık emerson agara ekilmiş ve 28°C`de etüv içerisinde 24 saat inkübe edilmiştir. Üreme olan örnekler +4°C`de saklanmıştır. Stoğa çekilen örnekler, ayda bir kez olmak koşuluyla yeni stok besiyerlerine ekilmiştir. DNA analizleri stoğa çekilen örneklerden yapılmıştır.

### **3.5 Bakterilerin Morfolojik Tayini**

#### **3.5.1 Gram Boyama (Temiz, 2010)**

İzolasyonu yapılan bakteri kolonilerinden steril öze ile numune alınıp lamda fikse edilerek gram boyama işlemi yapılarak bir ön ayırma sağlanmıştır.

Elde edilen örneklerin gram boyama işlemleri aşağıdaki basamaklara göre yapılmıştır.

- Lam üzerine bir damla steril su veya serum fizyolojik konur.
- Örnekten ince bir yayma hazırlanarak lam havada kurutulur.
- Kurutulan lam bek alevinden geçirilerek tespit edilir.
- Boyanmaya hazır, sabitlenmiş lam(lar) bir boya standına yerleştirilir.
- Kristal viyole solüsyonu lam üzerine konur; 30 sn beklenir.
- Kristal viyole akıtılır ve lam çok yumuşak akan çeşme suyu ile yıkanır.
- İyodin solüsyonuyla lam kaplanır; 30 sn beklenir ve çok yumuşak akan çeşme suyu ile yıkanır.
- Renk gidericinin fazlası da yumuşak bir şekilde çeşme suyu ile yıkanır.
- Safranin (zıt boya) ile lamın üzeri kaplanır; 30 sn beklenir.
- Safranin de çok yumuşak akan çeşme suyu ile yıkanır.
- Lam üzerindeki su iyice süzdürülür ve dik konumda havada kurutulur. Mikroskopta incelenir.

### **3.6 Moleküler Bakteri Tayini**

#### **3.6.1 DNA izolasyonu**

Bakteri kolonilerinden DNA izolasyonu, Norgen Cell and Tissue DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Canada) ile gerçekleştirilmiştir. Ticari kit

içerisinde belirtilmiş olan basamaklar aşağıda belirtildiği şekilde uygulanılarak bakteri kolonisinden DNA eldesi sağlanmıştır.

- 1- Steril eppendorf tüpüne aktarılan 20 mg homojenize edilmiş doku üzerine 300 µL Lysis Buffer B ilave edilmiştir.
- 2- Karışım vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
- 3- Üzerine 20 µL Proteinaz K ilave edilerek tekrar vortekslenmiştir.
- 4- Karışımı içeren eppendorf tüpü sıcak su banyosunda 56°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sırasında her yarım saatte bir tüpler ters-yüz edilmiştir.
- 5- İnkübasyonun ardından tüpe 300 µL nuclease-free su eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- 6- Karışımın üzerine 110 µL etanol eklenerek karıştırılmıştır.
- 7- Kit içerisinde bulunan spin column yine kit içerisinden çıkan tüpün üzerine yerleştirilir. Üzerine bir üst basamakta hazırlanmış olan lizattan 750 µL eklenerek 6.000 x g.'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- 8- Santrifüj sonrasında altta kalan sıvı uzaklaştırılır ve filtrenin üzerinde lizat tüpünde kalan lizatın tamamı 750 µL'yi geçmeyecek şekilde eklenerek tekrar 6.000 x g.'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- 9- Altta kalan sıvı uzaklaştırılır. Filtrenin üzerine 500 µL Wash Solution WN eklenerek 6.000 x g.'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 10- Alttaki sıvı faz uzaklaştırılır, üzerine 500 µL Wash Solution A eklenerek 14.000 x g.'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 11- Alttaki faz uzaklaştırılarak 10. adım tekrar edilmiştir.
- 12- Alttaki faz uzaklaştırılır ve filtrenin üzerine birşey eklenmeden 14.000 x g.'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- 13- Filtre, kit içerisinden çıkan 1.7 mL eppendorf tüpüne yerleştirilir ve 200 µL Elution Buffer B ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.
- 14- Önce 6.000 x g.'de 1 dakika ardından 14.000 x g.'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 15- Filtre atılır ve altta kalan DNA çözeltisi -20°C'de PCR analizine kadar saklanmıştır.

### 3.6.2 PCR Analizi

DNA'nın saflığı ve miktarı Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA) cihazı ile ölçülmüştür. PCR basamağına geçmeden önce tüm DNA'lar ultra saf su ile sulandırılarak 20 ng konsantrasyona ayarlanmış ve bu şekilde tüm örneklerden eşik konsantrasyonda DNA PCR analizinde kullanılmıştır.

Saflığı 260/280 oranıyla belirlenmiş ve 1,8 civarında olan DNA'lar PCR analizinde kullanılmıştır. PCR analizi için *Vibrio sp.* türlerine özgü primerler kullanılmıştır. Bu primerler literatür taraması sonucunda önceki çalışmalarda kullanılan primerlerden seçilmiştir (Di Pinto et al., 2005). Kullanılan primerler balon balığı türlerinde en yaygın bulunduğu düşünülen *Vibrio sp.* cinsine ait; *V. alginolyticus* türünün tanımlanmasını sağlamak amacıyla seçilmiştir.

Kullanılan primerler ve çoğaltıkları gen bölgesinin uzunlukları Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Primerler ve çoğaltacakları gen bölgesi uzunlukları

Primer adı	Primer dizisi	Çoğalttığı gen uzunluğu (bp)	Kaynak
VA-F	5'-CGA GTA CAG TCA CTT GAA AGC C-3'	737	Di Pinto et al., 2004
VA-R	5'-CAC AAC AGA ACT CGC GTT ACC-3'		
VP-F	5'-GAA AGT TGA ACA TCA TCA GCA CGA-3'	271	Di Pinto et al., 2004
VP-R	5'-GGT CAG AAT CAA ACG CCG-3'		
VC-F	5'-CGG CGT GGC TGG ATA CAT TG-3'	389	Di Pinto et al., 2004
VC-R	5'-GTC ACA CTT AAA TAG TAG CGT CC-3'		

PCR analizi, 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Bu PCR karışımını hazırlamak için; 2.5 mM dNTPs (Thermo Scientific), 20 mM primer (Forward ve Reverse), 10 × PCR Buffer ve 2 mg DNA kullanılmıştır. PCR analizi Biorad Thermal Cycler ile gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları önceki çalışmalarda belirtilen koşullar altında yapılmıştır (Di Pinto et al., 2004). Bu koşullar; 95°C'de

2 dakika başlangıç denatürasyonu ile başlayıp, 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 57°C’de 30 saniye annealing ve 72°C’de 60 saniyelik uzama döngülerinden oluşan 35 döngü ile sürdürülüp ardından 72°C’de 10 dakikalık final uzama basamağı ile analiz sonlandırılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri %1,5’luk agaroz jelde elektroforezde yürütülmüş ve jel görüntüleme cihazında görüntülenerek ve fotoğrafı çekilmiştir.

### **3.7 Dizi Analizi ve Filogenetik Ağaç Oluşturma**

PCR analiziyle çoğaltılan gen bölgelerinin baz dizilimini belirlemek için ürünler dizi analizini gerçekleştiren yetkili firmaya iletilmiştir.

Elde edilen diziler GeneBank’ta BLAST analiziyle benzer türlerle karşılaştırılıp ve izolasyonunu yaptığımız bakterilerin türü/türleri moleküler düzeyde tanımlanmıştır.

*L. sceleratus* balon balığından mevsimsel olarak karaciğer ve gonadlardan izole edilen bakterilerin 16S rDNA gen dizilerine göre Tamura-Nei metoduyla (1000 bootstrap) oluşturulan Neighbour Joining (NJ) ağacı oluşturulmuştur. Dallar üzerindeki değerler bootstrap değerlerini (%) göstermektedir. İzole edilen örnekler 1-33 arası rakamlarla, Genbankasından alınan diziler kayıt numaralarıyla (Accession number) gösterilmiştir.

## **4 BULGULAR**

### **4.1 Balık Materyali**

Çalışmada kullanılan balıklar Muğla-Göcek Körfezi’nden mevsimsel olarak balıkçılardan temin edilmiştir. Elde edilen balık örneklerinin boy uzunlukları ve ağırlıkları Tablo 4.1-4.4’de sayısal olarak; Şekil 4.1- Şekil 4.2’de karşılaştırmalı olarak grafik halinde verilmiştir.

**Tablo 4.1** Sonbahar mevsiminde temin edilen *Lagocephalus scleratus* türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri

Örnek No	Örnek kodu	Cinsiyet	Mevsim	Toplam Ağırlık (kg)	Total boy (cm)	Standart boy (cm)	Gonad Ağırlığı (gr)	Karaciğer Ağırlığı (gr)
1	A_F_1	Dişi	Sonbahar	1,28	45	40,5	96,61	51
2	A_F_2	Dişi	Sonbahar	2,14	60,4	57,6	102,03	110
3	A_M_1	Erkek	Sonbahar	1,6	56,5	48,5	53,23	61
4	A_M_2	Erkek	Sonbahar	0,78	43,5	41,3	13,20	21,03

**Tablo 4.2** Kış mevsiminde temin edilen *Lagocephalus scleratus* türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri

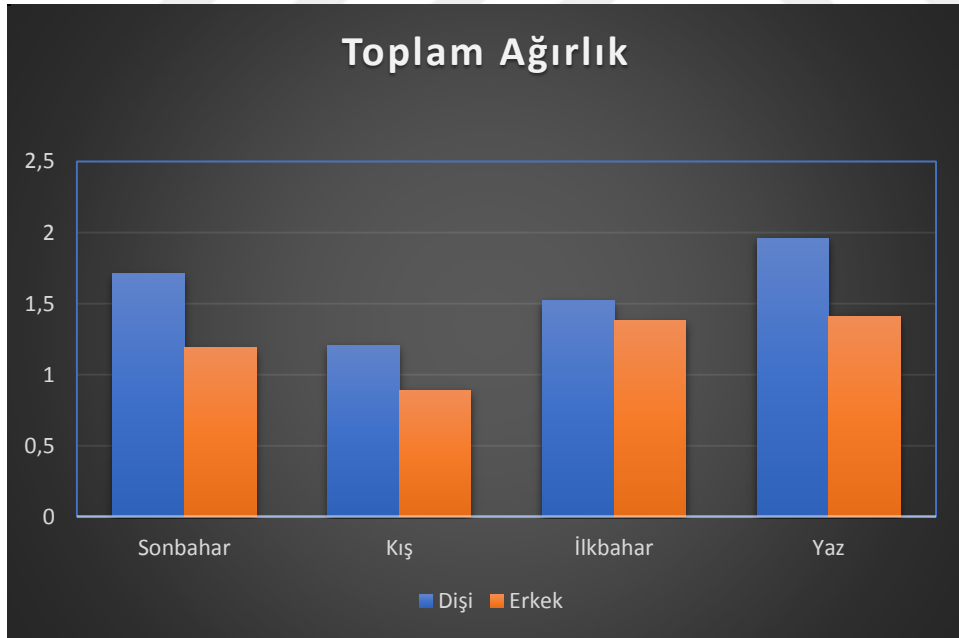
Örnek No	Örnek kodu	Cinsiyet	Mevsim	Toplam Ağırlık (kg)	Total boy (cm)	Standart boy (cm)	Gonad Ağırlığı (gr)	Karaciğer Ağırlığı (gr)
5	W_M_1	Erkek	Kış	0,85	38	44	4,55	7,40
6	W_M_1	Erkek	Kış	0,93	41	47	9,16	22,43
7	W_F_1	Dişi	Kış	1,02	40,5	46	6,61	16,4
8	W_F_2	Dişi	Kış	1,39	51	47	8,92	85,02

**Tablo 4.3** İlkbahar mevsiminde temin edilen *Lagocephalus scleratus* türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri

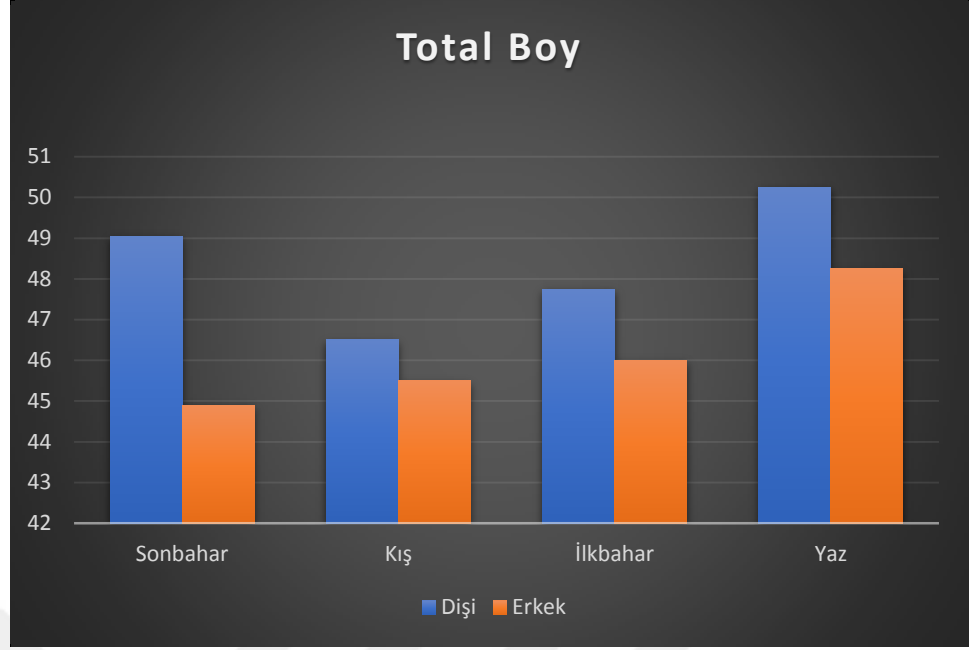
Örnek No	Örnek kodu	Cinsiyet	Mevsim	Toplam Ağırlık (kg)	Total boy (cm)	Standart boy (cm)	Gonad Ağırlığı (gr)	Karaciğer Ağırlığı (gr)
9	Sp_M_1	Erkek	İlkbahar	1,315	48,5	45	81	59
10	Sp_M_2	Erkek	İlkbahar	1,46	50,5	47	112	68
11	Sp_F_1	Dişi	İlkbahar	1,53	51	47	64	82
12	Sp_F_2	Dişi	İlkbahar	1,485	51	48,5	58	96

**Tablo 4.4** Yaz mevsiminde temin edilen *Lagocephalus scleratus* türlerinin boy ve ağırlık ölçümleri

Örnek No	Örnek kodu	Cinsiyet	Mevsim	Toplam Ağırlık (kg)	Total boy (cm)	Standart boy (cm)	Gonad Ağırlığı (gr)	Karaciğer Ağırlığı (gr)
13	Su_M_1	Erkek	Yaz	1,57	53,5	50,5	88	49
14	Su_M_2	Erkek	Yaz	1,25	49,5	46	95	45
15	Su_F_1	Dişi	Yaz	2,02	52,5	50,5	63	81
1	Su_F_2	Dişi	Yaz	1,9	53	50	171	109

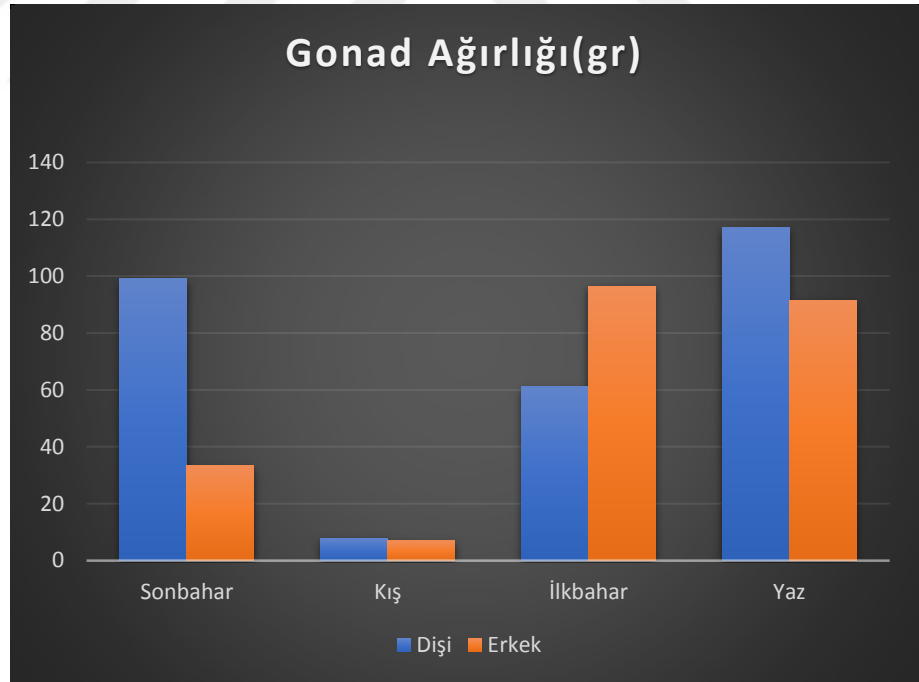


**Şekil 4.1** Mevsim ve cinsiyete göre balıkların total ağırlıkları (g)

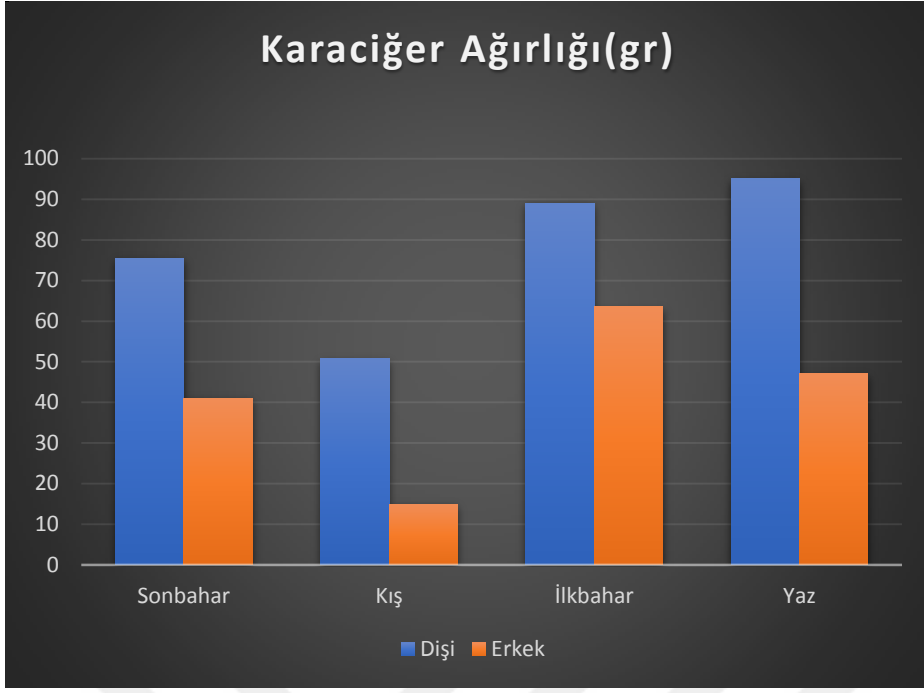


**Şekil 4.2** Mevsim ve cinsiyete göre balıkların total boyları (cm)

Balık boy ve ağırlıkları kaydedildikten sonra disekte edilen gonad ve karaciğerlerin ağırlıkları gram cinsinden kaydedilmiştir (Şekil 4.3; Şekil 4.4).



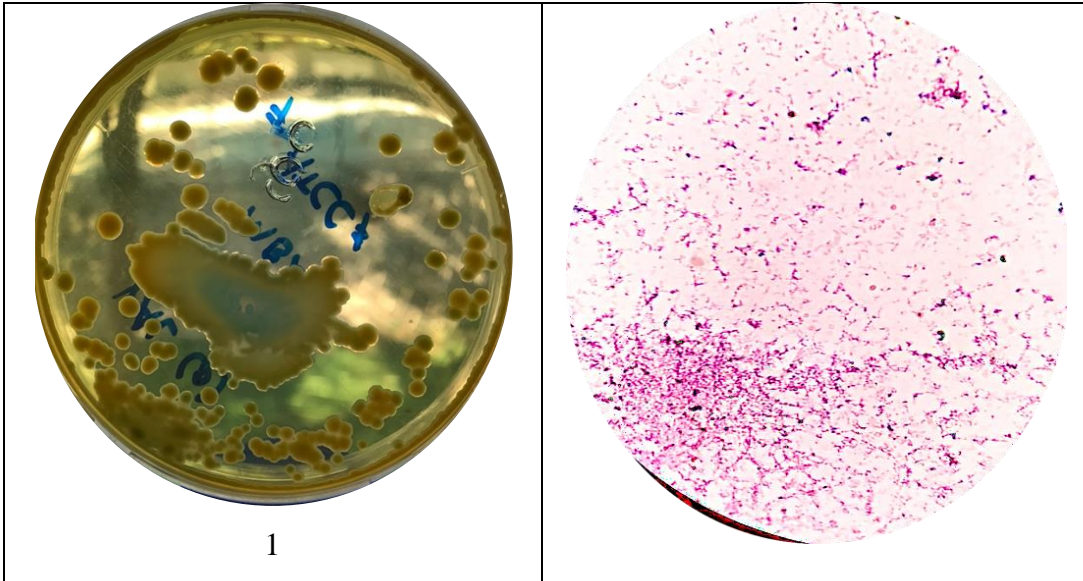
**Şekil 4.3** Mevsim ve cinsiyete göre balıkların gonad ağırlıkları (g)

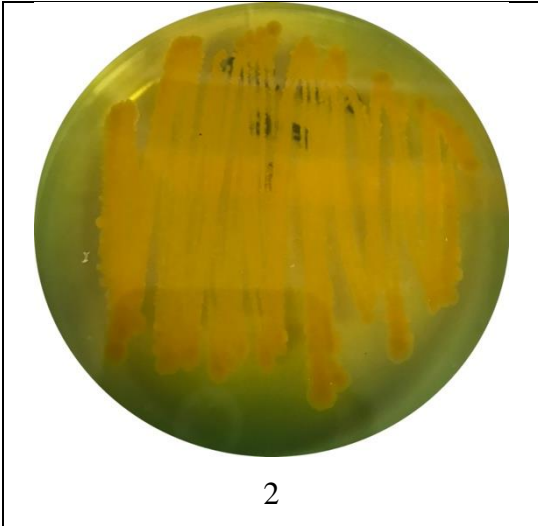


**Şekil 4.4** Mevsim ve cinsiyete göre balıkların karaciğer ağırlıkları (g)

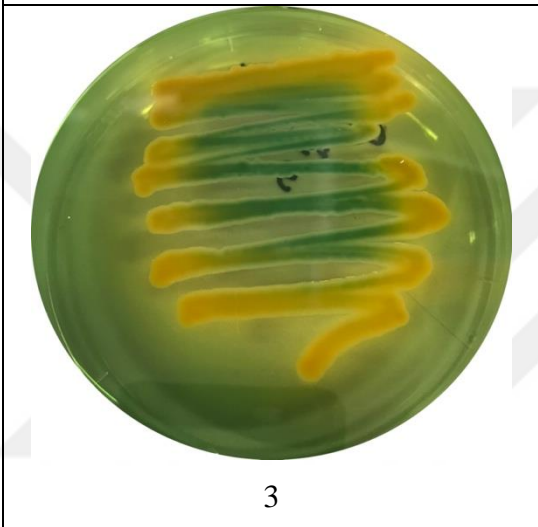
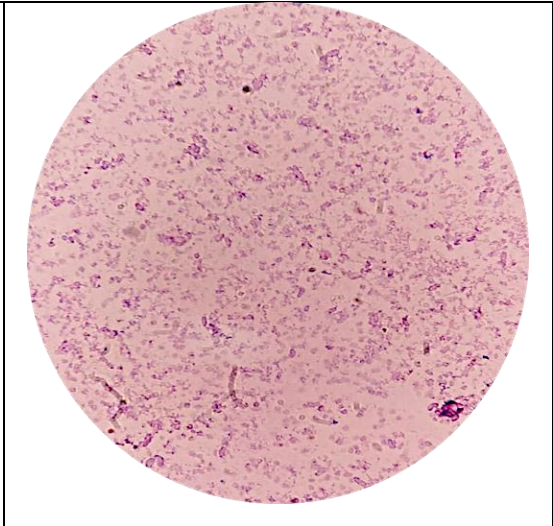
#### 4.2 Bakteri İzolasyonu ve Kültürü

FTS içerisinde alınan APW'de inkübe edilmiş ve TCBS'ye ekilmiş örneklerin 24 saat sonraki görüntüleri Şekil 4.5-4.8'de verilmiştir.

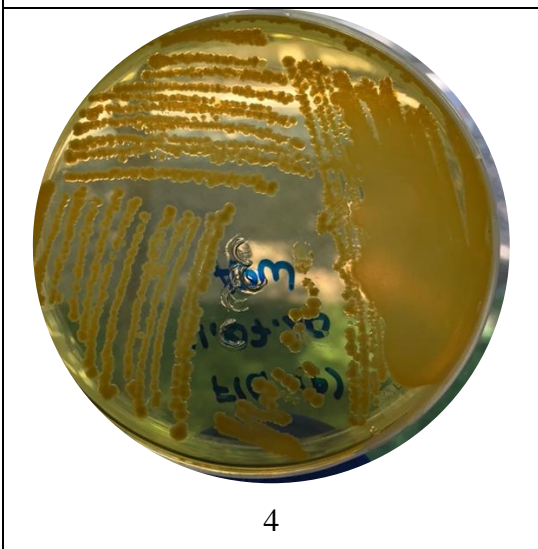
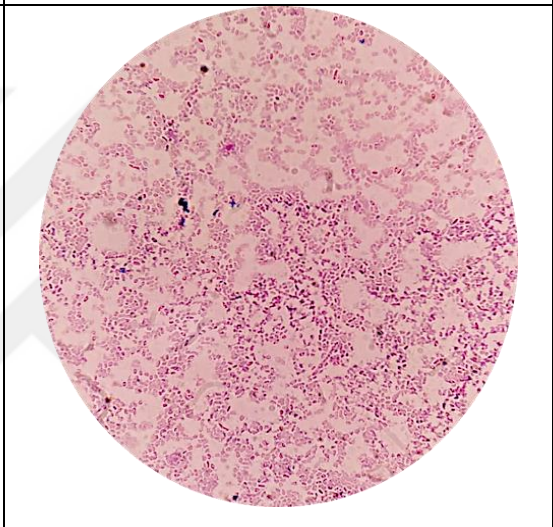




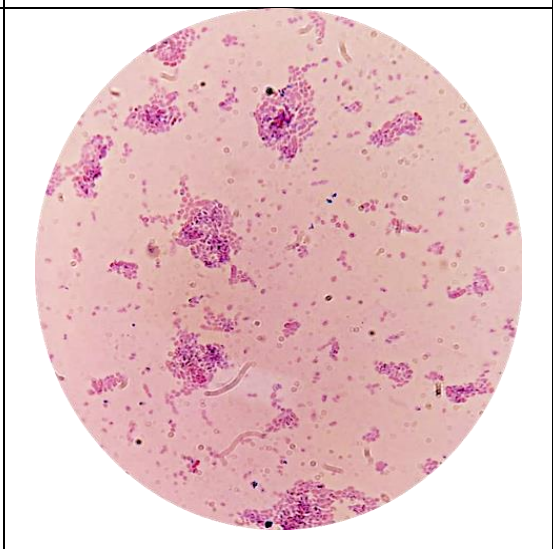
2

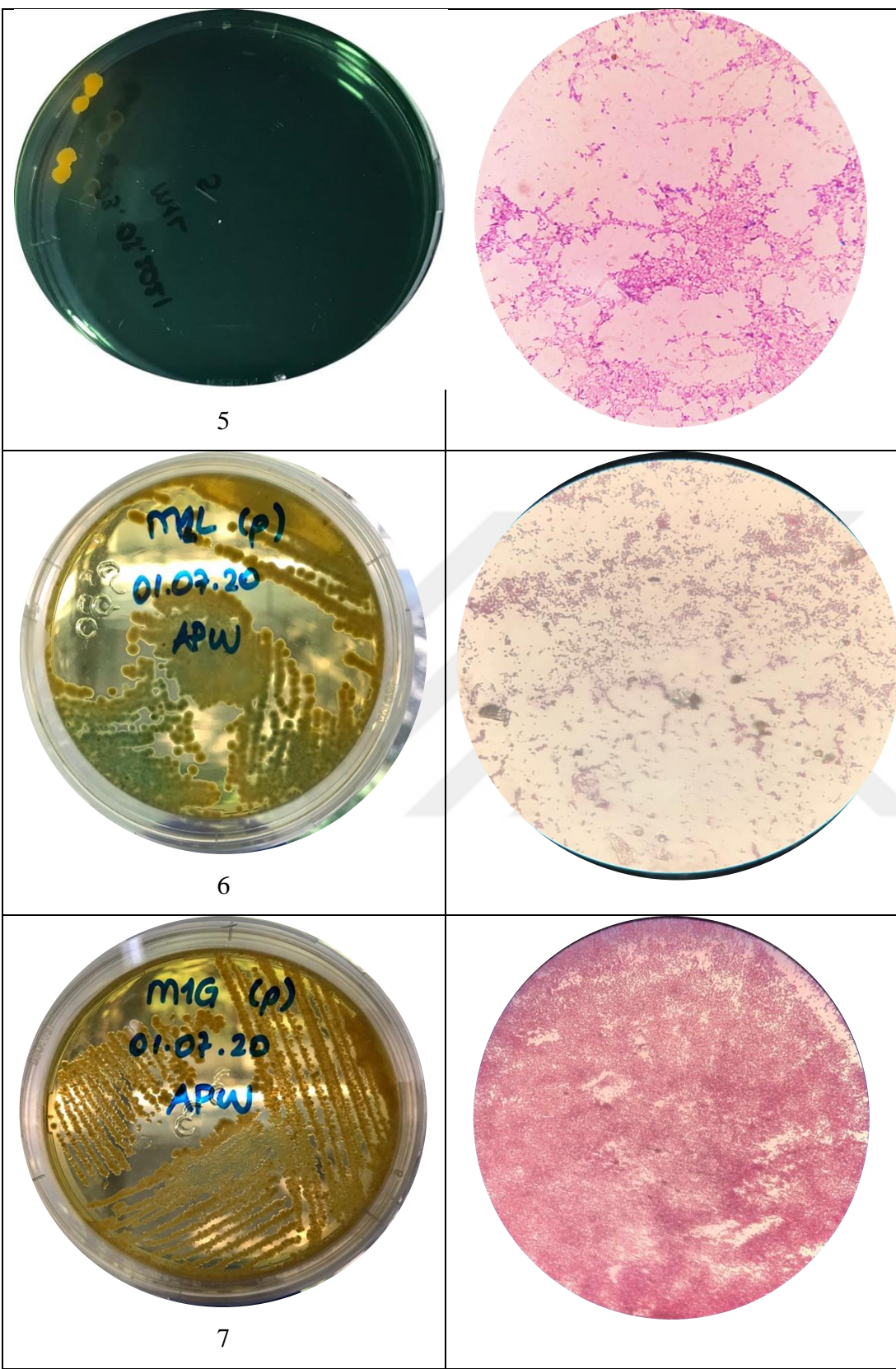


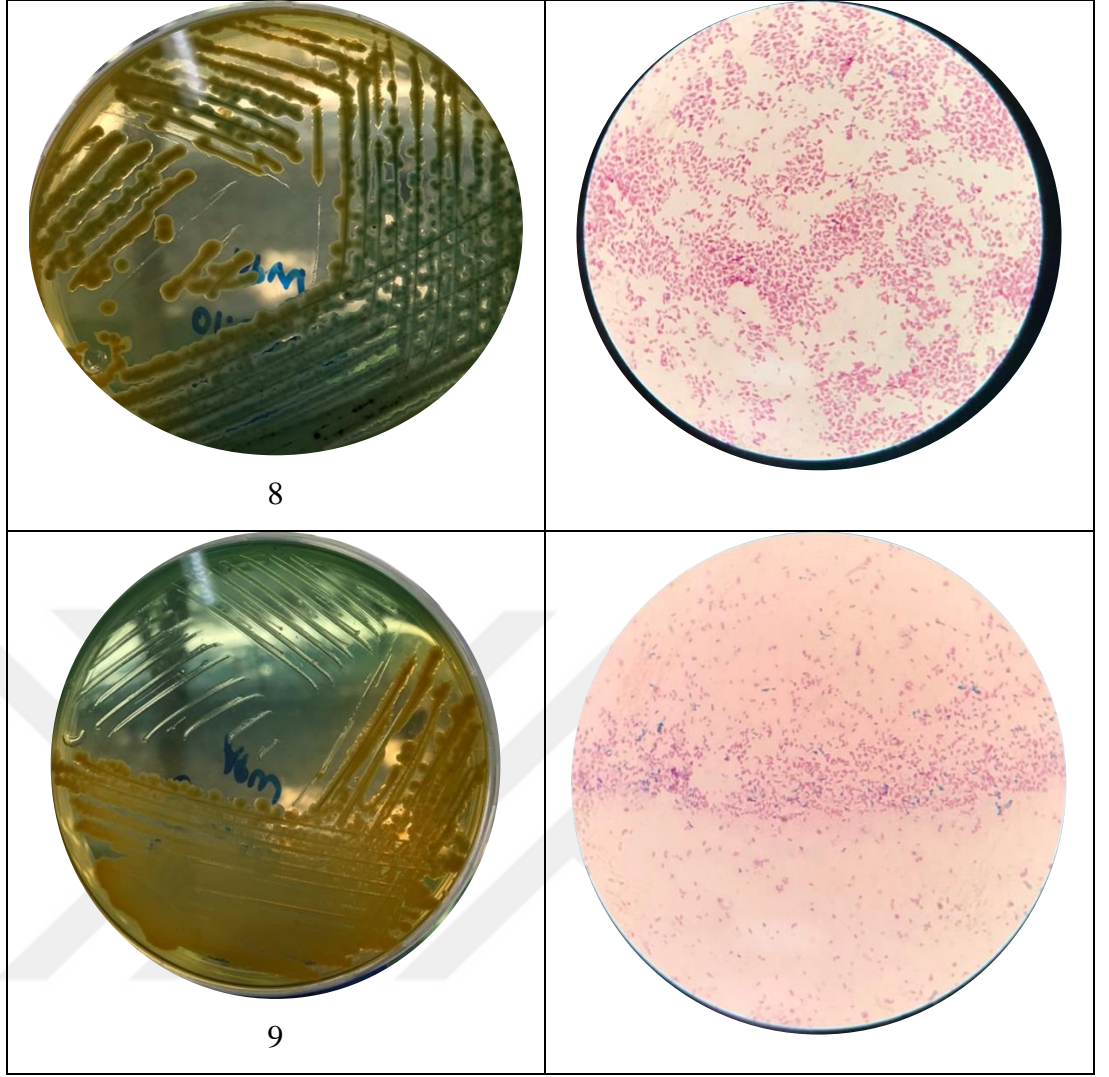
3



4



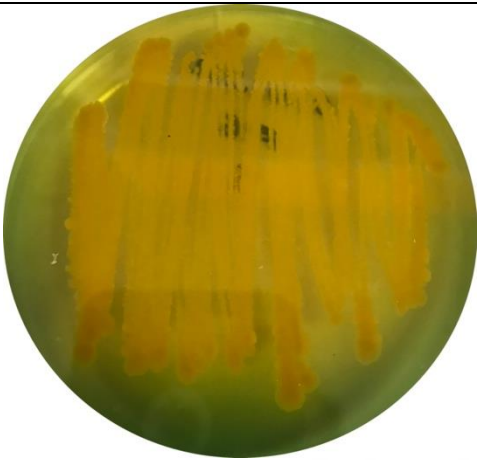
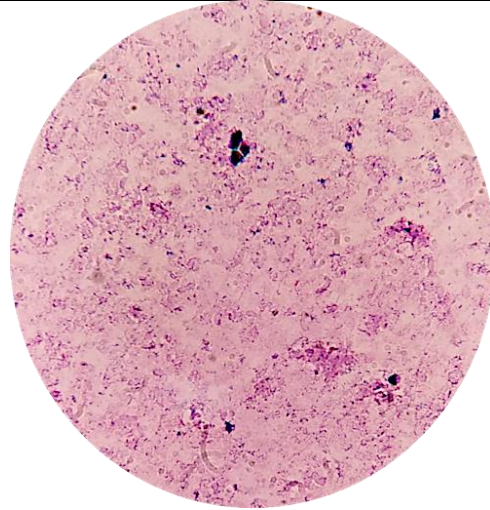




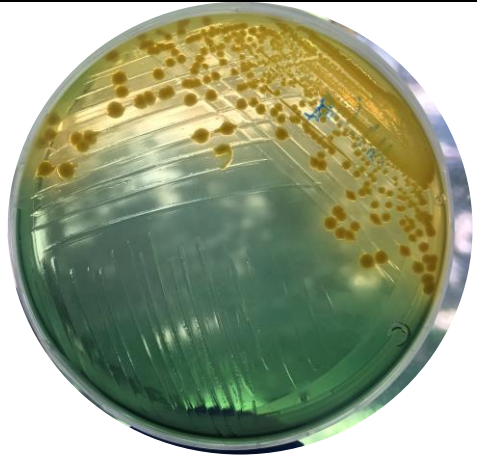
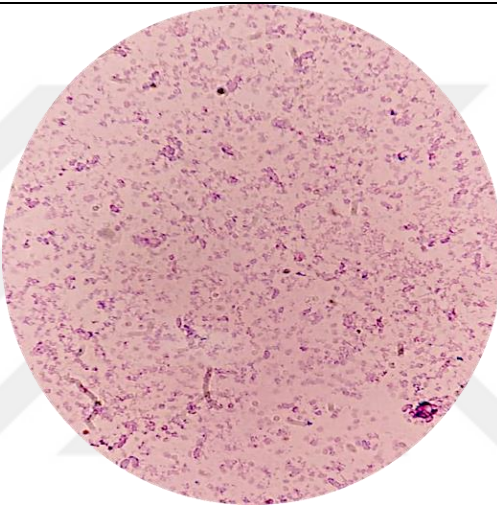
**Şekil 4.5** İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (1: Tıp tür; 2: Yaz Dişi Karaciğer 2; 3: Yaz Dişi Gonad 1; 4: Yaz Dişi Gonad 2; 5: Yaz Erkek Karaciğer 1; 6: Yaz Erkek Karaciğer 2; 7: Yaz Erkek Gonad 1; 8: Yaz Erkek Gonad 2; 9: Yaz Dişi Karaciğer 1.)



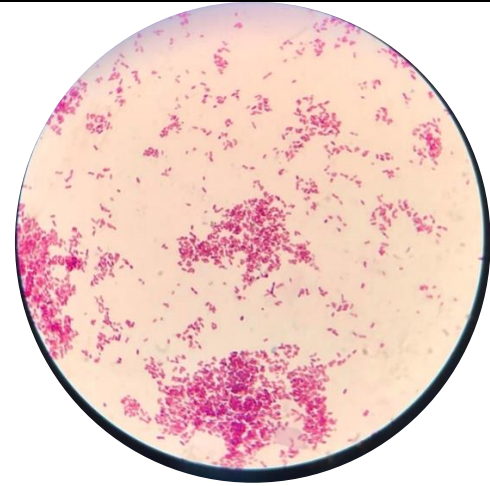
10

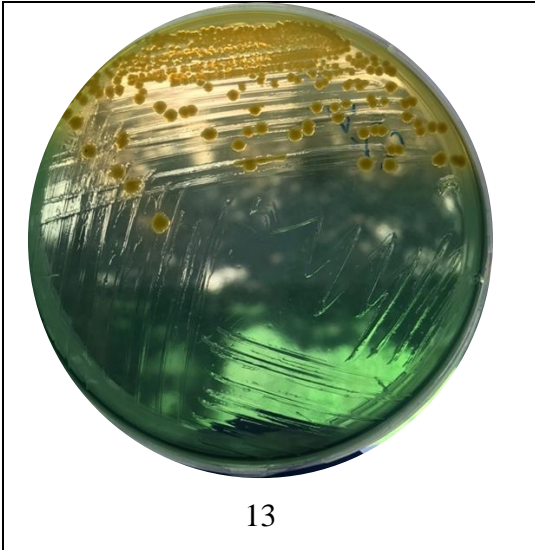


11

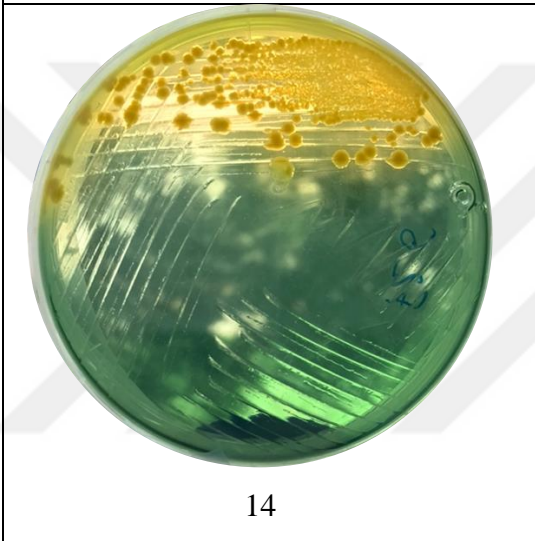
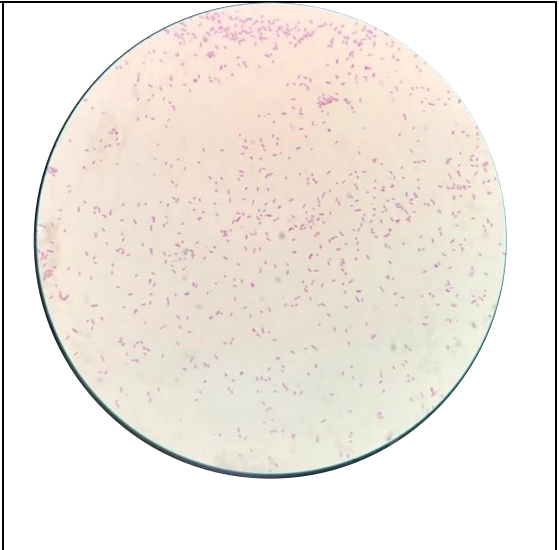


12

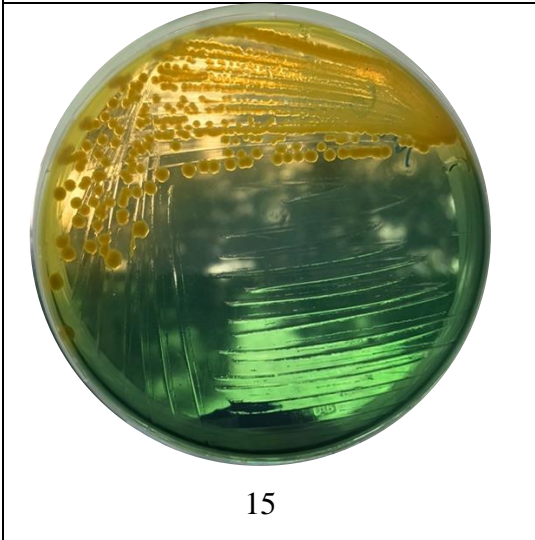
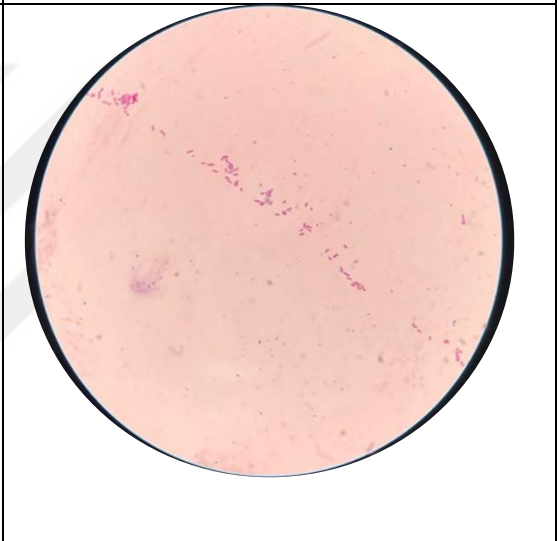




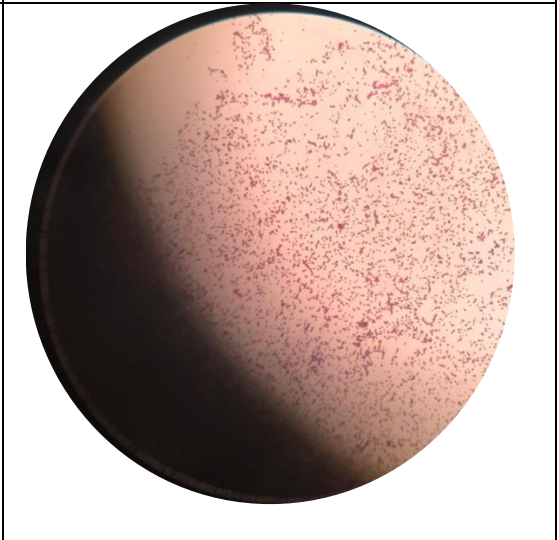
13

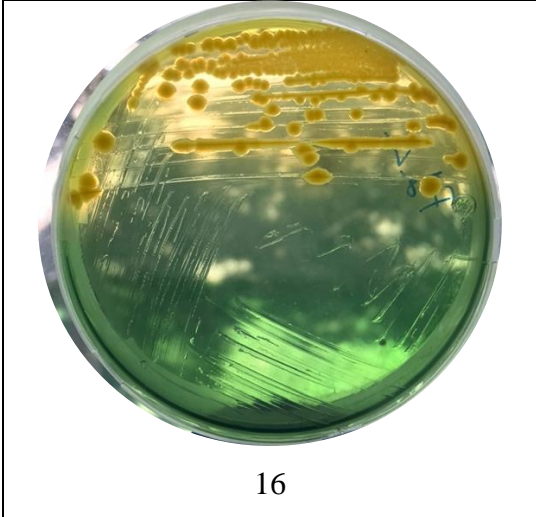


14

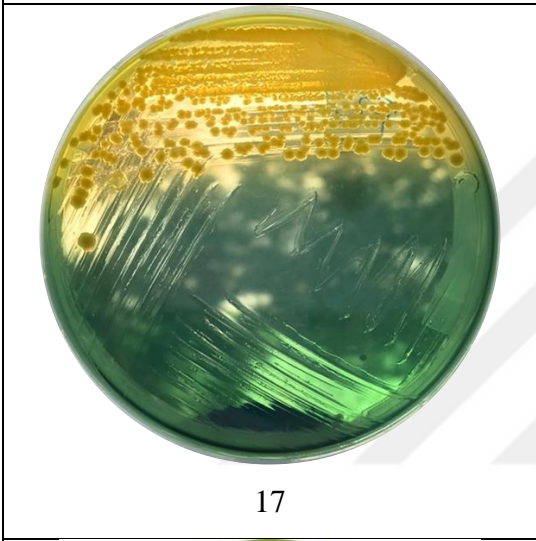
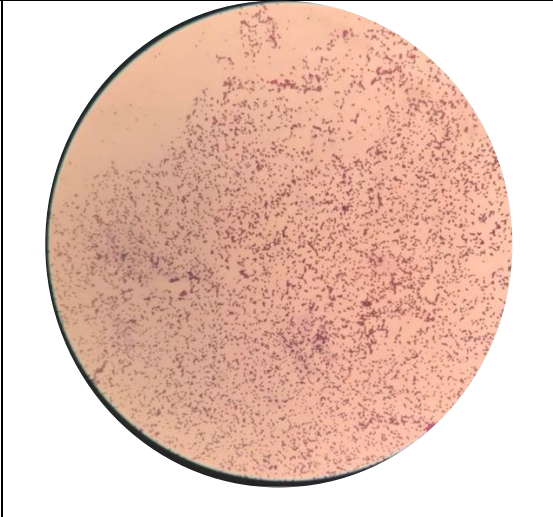


15

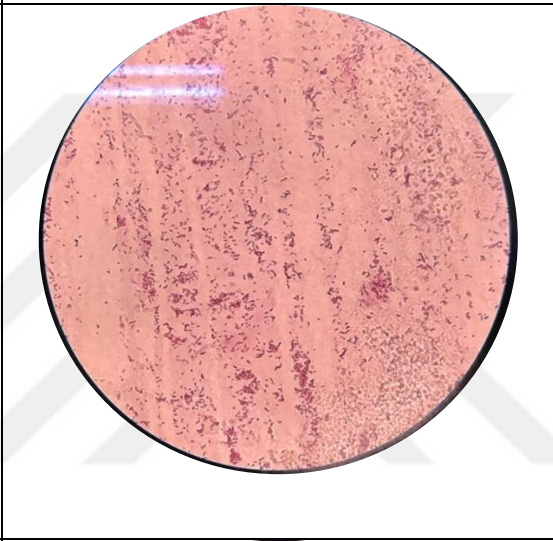




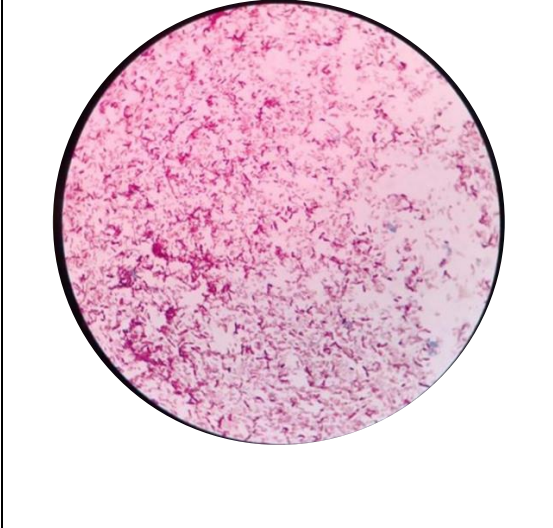
16

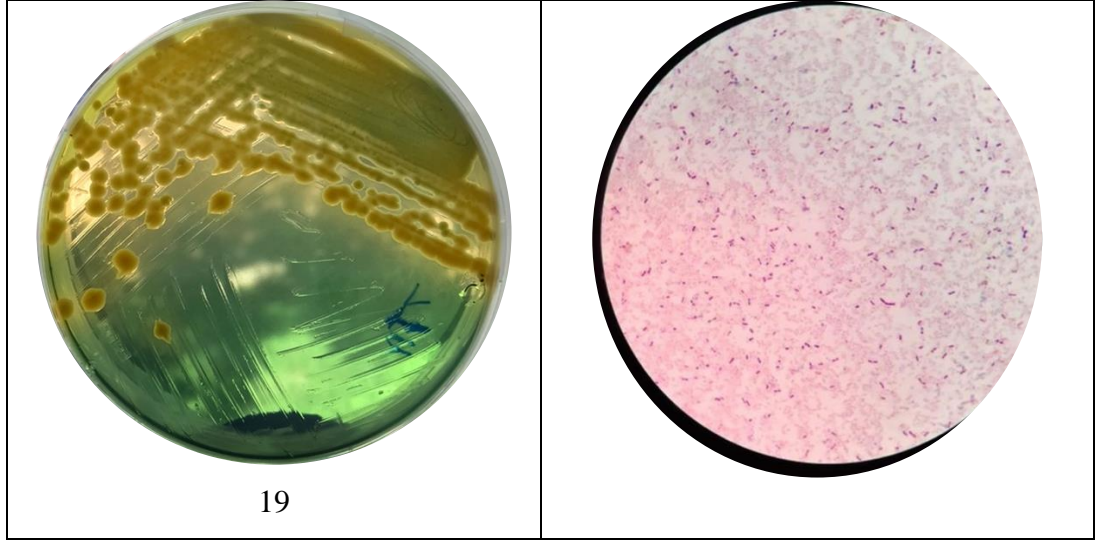


17



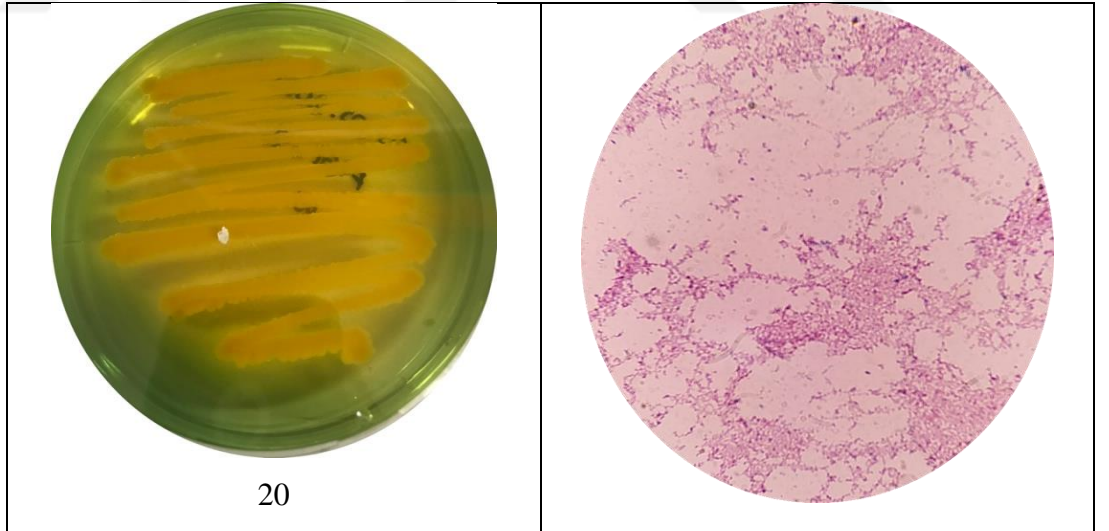
18



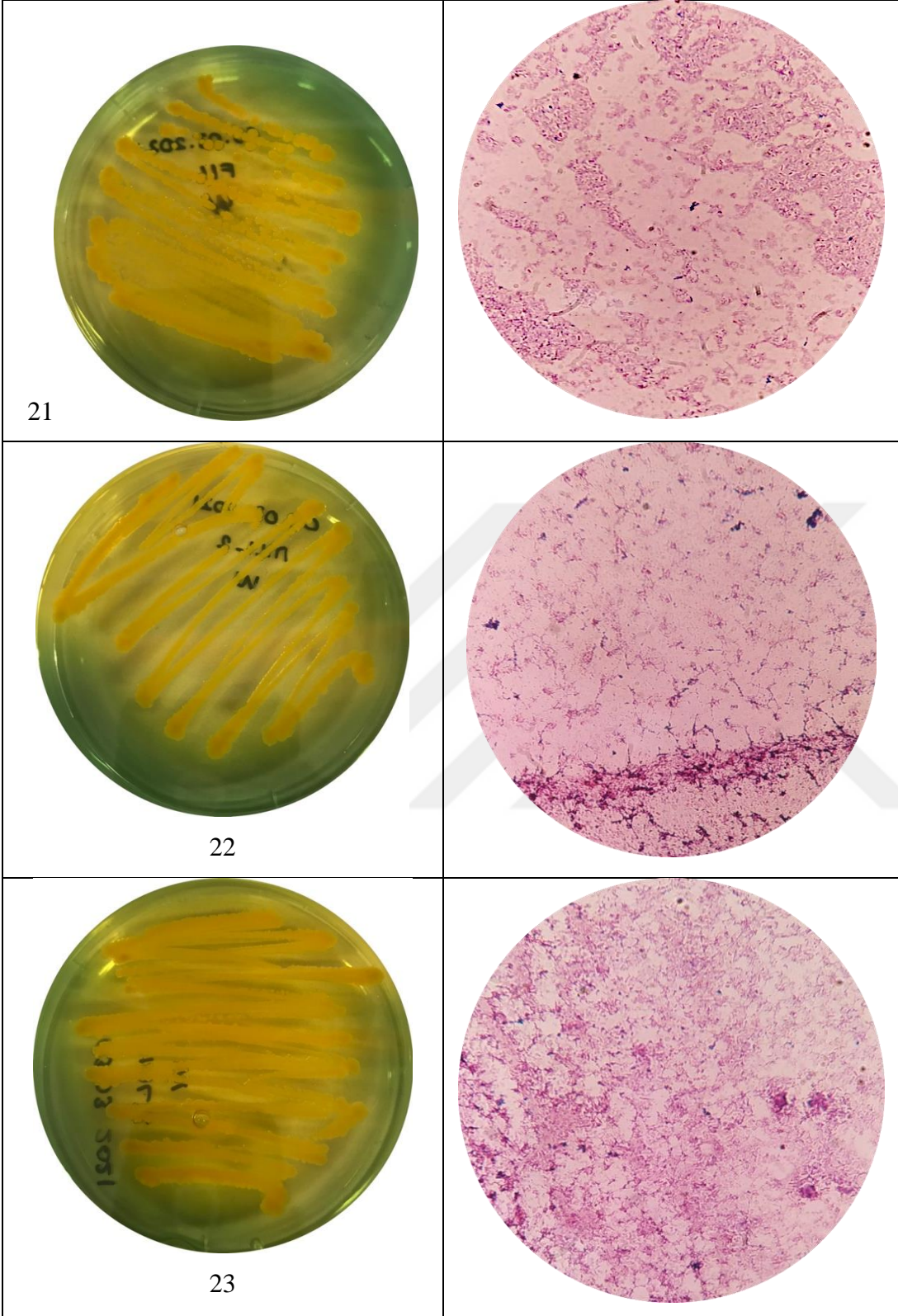


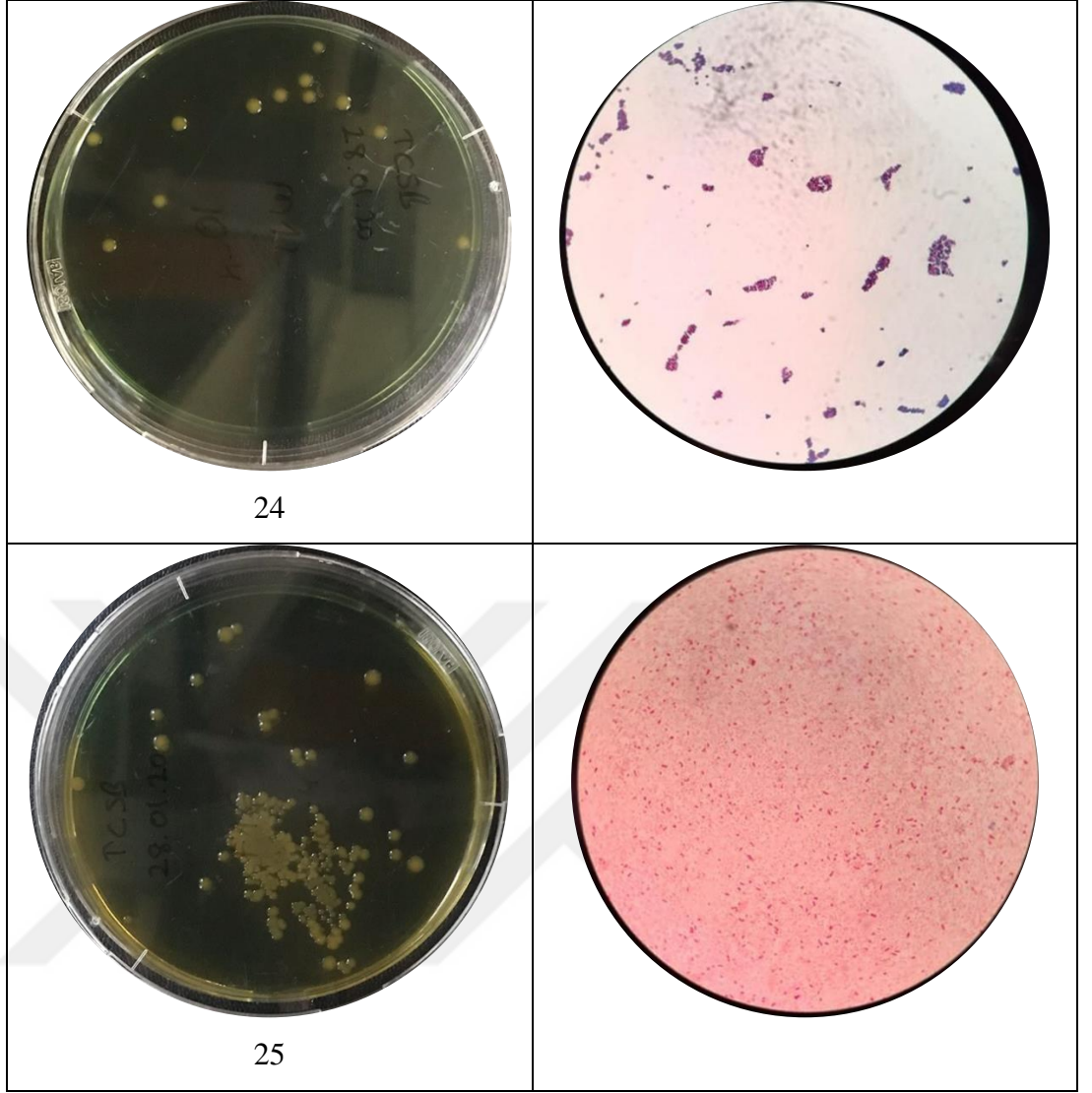
19

**Şekil 4.6** İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (10: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 11: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-1;12: İlkbahar Dişi Karaciğer (MBA), 13: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-2; 14: İlkbahar Dişi Karaciğer (VAL broth); 15: İlkbahar Dişi Karaciğer 2-2; 16: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-3; 17: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-4; 18: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 19: İlkbahar Erkek Gonad 1)



20

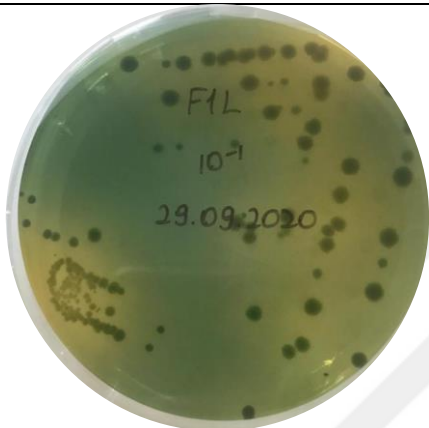
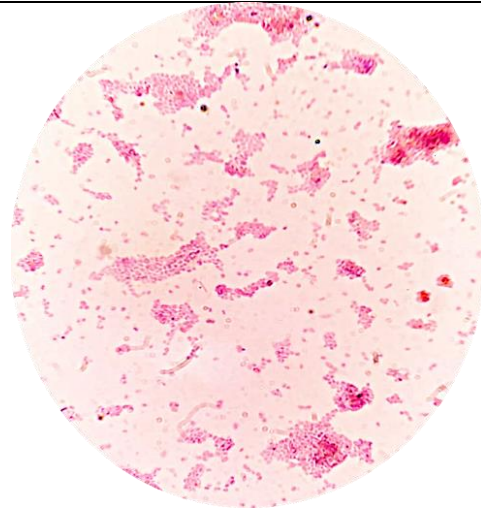




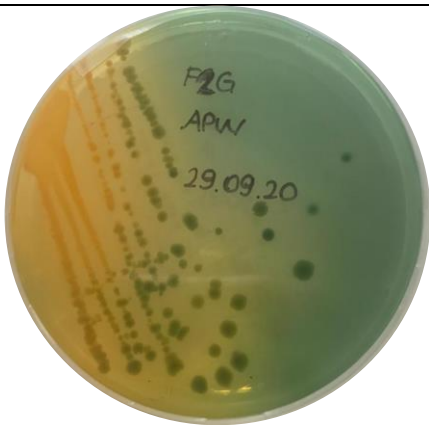
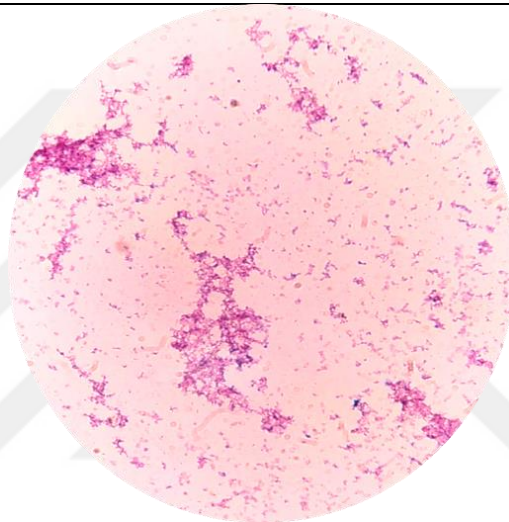
**Şekil 4.7** İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (20: Kış Dişi Gonad 1-2; 21: Kış Dişi Gonad 1-2-2; 22: Kış Erkek Karaciğer 2; 23: Kış Dişi Karaciğer 1; 24: Kış Erkek Karaciğer 1, 25: Kış Erkek Karaciğer 2)



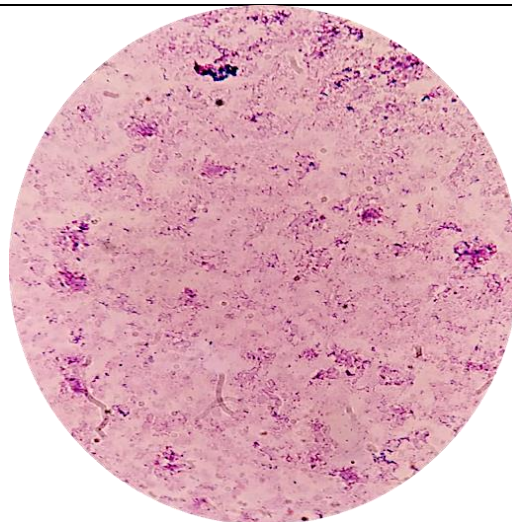
26



27

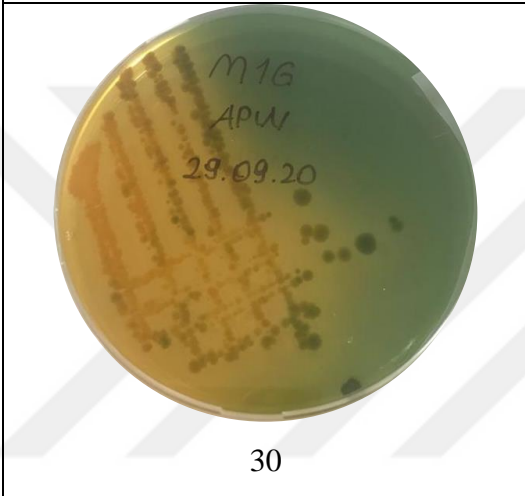
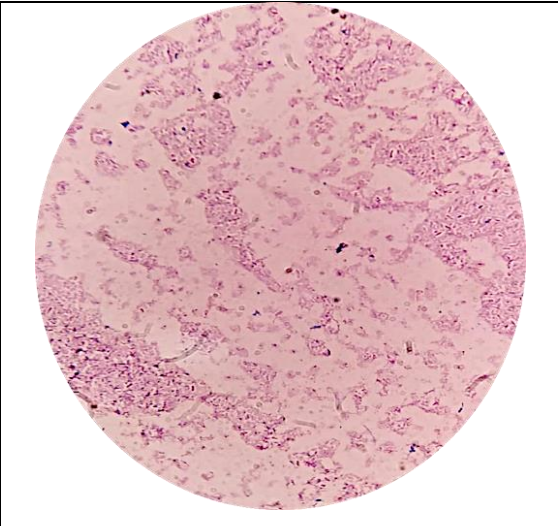


28





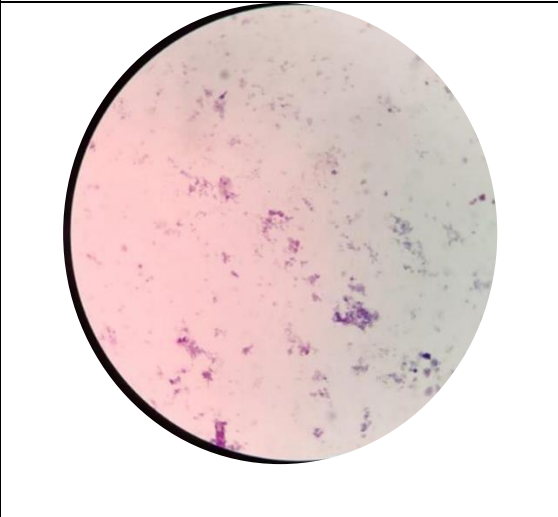
29

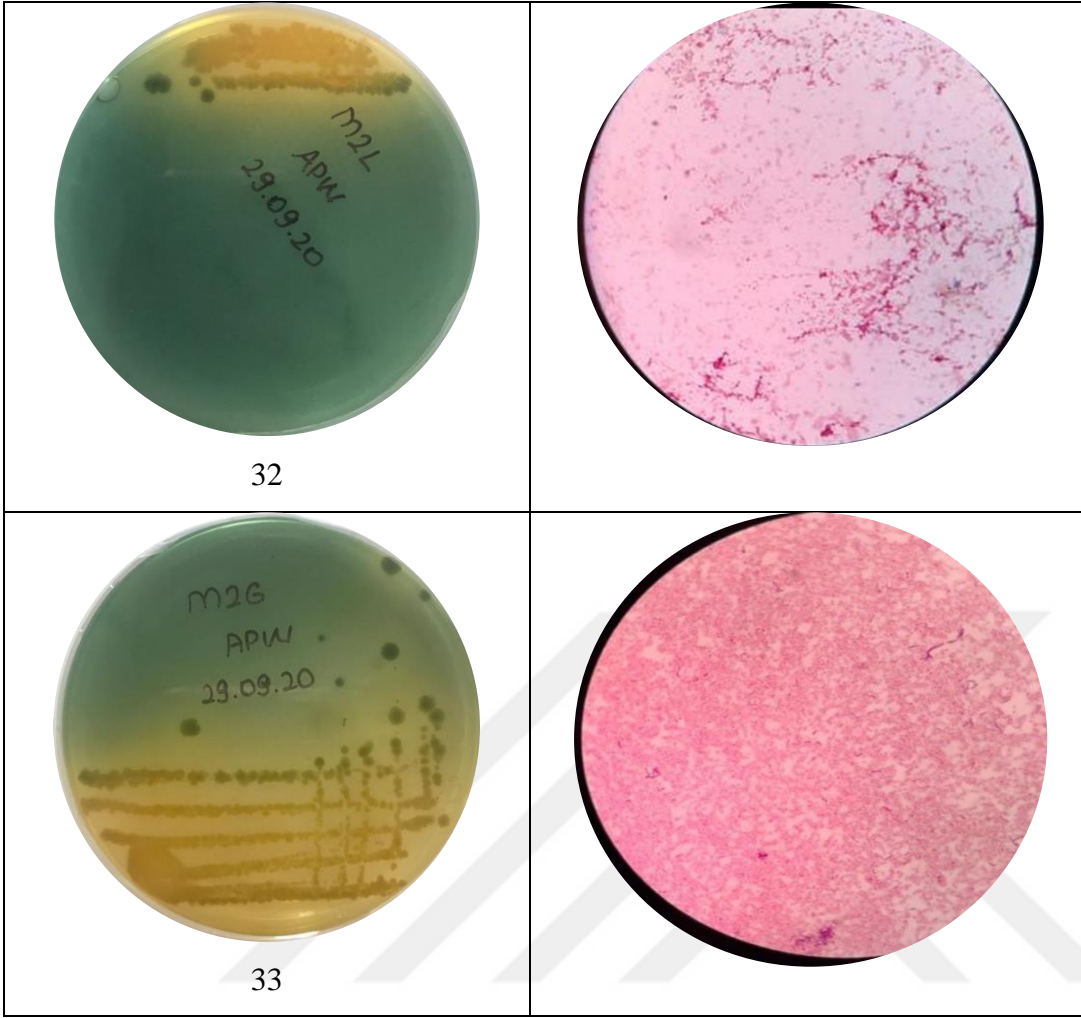


30



31





**Şekil 4.8** İzolasyon sonucunda elde edilen kolonilerin besiyeri üzerindeki ve gram boyama görüntüleri (Bakteri preparatları 100x immersiyon objektifinde görüntülenmiştir) (26: Sonbahar Dişi Gonad 1; 27: Sonbahar Dişi Karaciğer 1; 28: Sonbahar Dişi Gonad 2; 29: Sonbahar Dişi Karaciğer 2; 30: Sonbahar Erkek Gonad 1; 31: Sonbahar Erkek Karaciğer 1; 32: Sonbahar Erkek Karaciğer 2; 33: Sonbahar Erkek Gonad 2)

### 4.3 DNA izolasyonu ve PCR analizi sonuçları

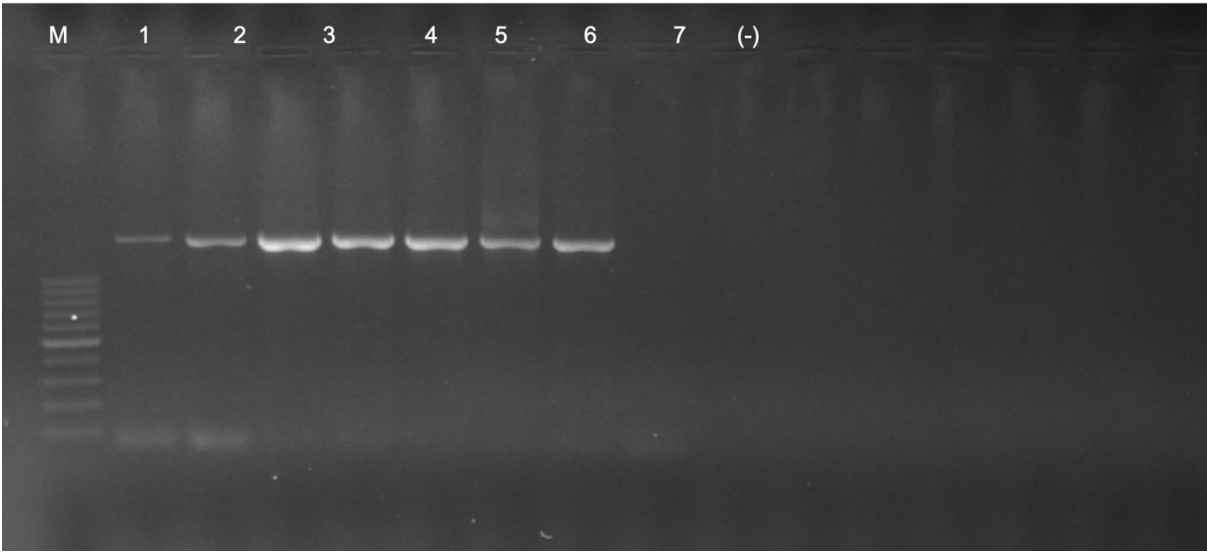
İzole edilen bakteri DNA'larının saflıkları ve miktarları NanoDrop (ThermoFisher Scientific, USA) cihazında belirlenmiştir (Tablo 4.5.)

**Tablo 4.5** İzole edilen bakteri DNA'larının miktar ve saflıkları

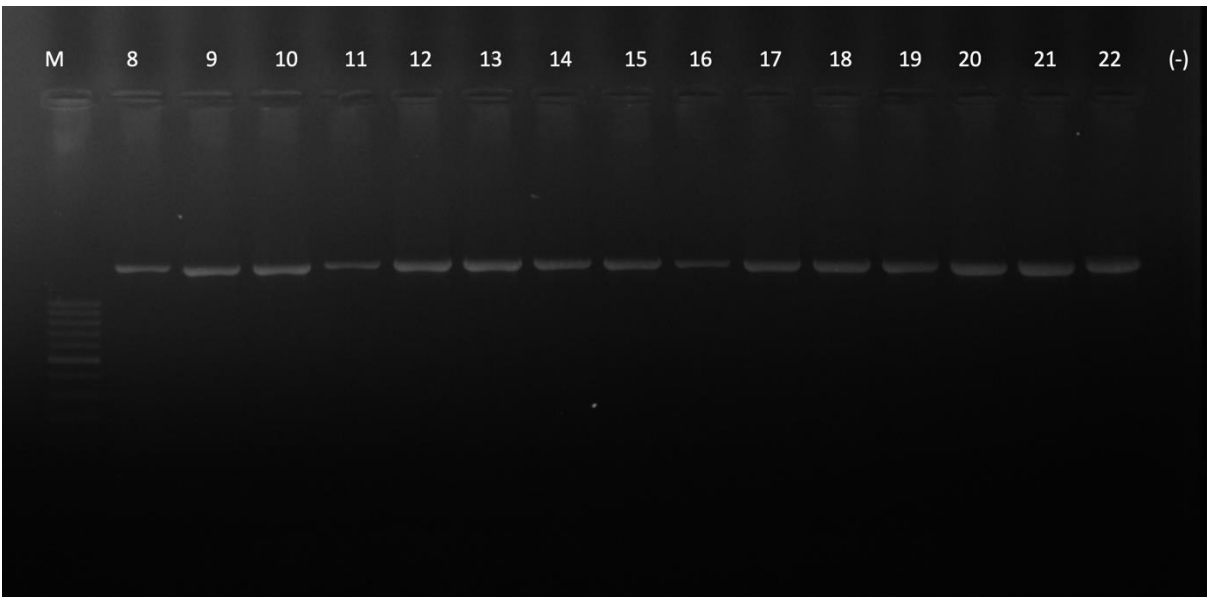
<b>Örnek #</b>	<b>Konsantrasyon (ng/μL)</b>	<b>260/280</b>
1	11,4	1,94
2	138,7	1,65
3	85,7	1,52
4	88,6	1,54
5	168,3	1,95
6	177,4	1,96
7	158,8	1,74
8	134,0	1,54
9	21,4	1,95
10	6,2	2,46
11	294,6	1,70
12	20,1	2,18
13	111,5	1,54
14	36,2	1,89
15	8,2	3,09
16	152,9	1,48
17	196,9	1,47
18	9,5	1,73
19	62,8	1,67
20	21,9	1,85
21	16,7	1,49
22	1,8	2,13
23	27,2	2,02
24	27,5	2,03
25	41,3	2,18
26	82,6	1,55
27	42,5	1,14
28	119,8	0,97
29	83,0	1,13
30	78,1	0,94

31	51,9	1,03
32	471,2	1,47
33	166,7	1,85

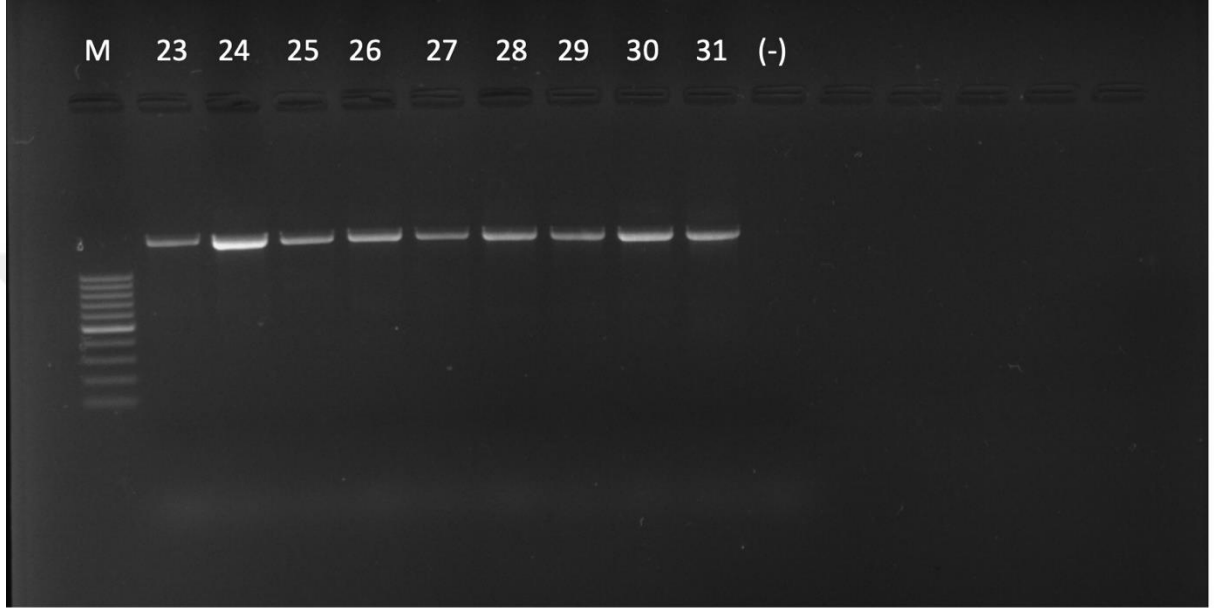
PCR analizi sonucunda elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve jel görüntüleme cihazında görüntülenerek fotoğraflanmıştır (Şekil 4.9-4.12).



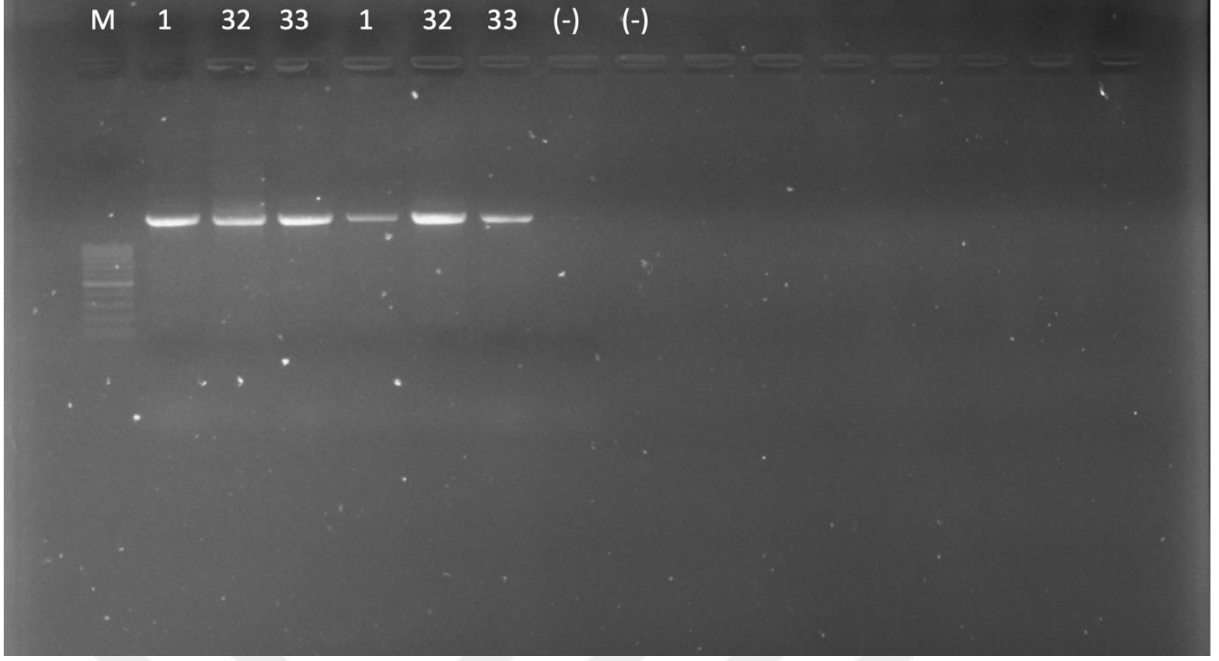
**Şekil 4.9** PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: Tip tür; 2: Yaz Dişi Karaciğer 2; 3: Yaz Dişi Gonad 1; 4: Yaz Dişi Gonad 2; 5: Yaz Erkek Karaciğer 1; 6: Yaz Erkek Karaciğer 2; 7: Yaz Erkek Gonad 1)



**Şekil 4.10** PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (8: Yaz Erkek Gonad 2; 9: Yaz Dişi Karaciğer 1; 10: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 11: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-1; 12: İlkbahar Dişi Karaciğer (MBA), 13: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-2; 14: İlkbahar Dişi Karaciğer (VAL broth); 15: İlkbahar Dişi Karaciğer 2-2; 16: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-3; 17: İlkbahar Dişi Karaciğer 1-4; 18: İlkbahar Erkek Karaciğer 2; 19: İlkbahar Erkek Gonad 1; 20: Kış Dişi Gonad 1-2; 21: Kış Dişi Gonad 1-2-2; 22: Kış Erkek Karaciğer 2)



**Şekil 4.11** PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (23: Kış Dişi Karaciğer 1; 24: Kış Erkek Karaciğer 1, 25: Kış Erkek Karaciğer 2; 26: Sonbahar Dişi Gonad 1; 27: Sonbahar Dişi Karaciğer 1; 28: Sonbahar Dişi Gonad 2; 29: Sonbahar Dişi Karaciğer 2; 30: Sonbahar Erkek Gonad 1; 31: Sonbahar Erkek Karaciğer 1)



**Şekil 4.12** PCR analizi sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri (1: Tip tür; 32: Sonbahar Erkek Karaciğer 2; 33: Sonbahar Erkek Gonad 2)

#### 4.4 Dizi Analizi Sonuçları ve Filogenetik Ağaç Oluşturulması

16S rDNA bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılan örnekler dizi analizi için yetkili firmaya gönderilmiş ve forward ve reverse okumalar Sequencer programı kullanılarak birleştirilmiştir. Elde edilen diziler Genbank sitesinde blast analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.6’da verilmiştir.

**Tablo 4.6** İzole edilen bakterilere ait 16S rDNA dizilerinin Blast sonuçları

Örnek #	Örnek Kodu	Blast Sonucu
1	Tip tür	<i>Vibrio alginolyticus</i>
2	Yaz Dişi Karaciğer	<i>Vibrio harveyi</i>
3	Yaz Dişi Gonad	<i>Vibrio harveyi</i>
4	Yaz Dişi Gonad	<i>Vibrio harveyi</i>
5	Yaz Erkek Karaciğer	<i>Vibrio alginolyticus</i>
6	Yaz Erkek Karaciğer	<i>Vibrio alginolyticus</i>
7	Yaz Erkek Gonad	Dizi analizi sonucu çıkmadı
8	Yaz Erkek Gonad	<i>Vibrio harveyi</i>

9	Yaz Dişi Karaciğer	<i>Vibrio owensii</i>
10	İlkbahar Erkek Karaciğer	<i>Enterococcus faecalis</i>
11	İlkbahar Dişi Karaciğer	<i>Enterobacter hormaechei</i>
12	İlkbahar Dişi Karaciğer	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
13	İlkbahar Dişi Karaciğer	<i>Enterococcus faecalis</i>
14	İlkbahar Dişi Karaciğer	<i>Vibrio alginolyticus</i>
15	İlkbahar Erkek Karaciğer	<i>Enterococcus faecalis</i>
16	İlkbahar Dişi Karaciğer	<i>Enterococcus faecalis</i>
17	İlkbahar Dişi Karaciğer	<i>Enterococcus faecalis</i>
18	İlkbahar Erkek Karaciğer	<i>Bacillus sp.</i>
19	İlkbahar Erkek Gonad	<i>Enterococcus faecalis</i>
20	Kış Dişi Gonad	<i>Acinetobacter sp.</i>
21	Kış Dişi Gonad	<i>Shewanella baltica</i>
22	Kış Erkek Karaciğer	<i>Bacillus sp.</i>
23	Kış Dişi Karaciğer	<i>Pseudomonas lundensis</i>
24	Kış Erkek Karaciğer	<i>Pseudomonas lundensis</i>
25	Kış Erkek Karaciğer	<i>Pseudomonas lundensis</i>
26	Sonbahar Dişi Gonad	<i>Vibrio harveyi</i>
27	Sonbahar Dişi Karaciğer	<i>Vibrio harveyi</i>
28	Sonbahar Dişi Gonad	<i>Vibrio harveyi</i>
29	Sonbahar Dişi Karaciğer	<i>Vibrio harveyi</i>
30	Sonbahar Erkek Gonad	<i>Vibrio harveyi</i>
31	Sonbahar Erkek Karaciğer	<i>Vibrio owensii</i>
32	Sonbahar Erkek Karaciğer	<i>Vibrio harveyi</i>
33	Sonbahar Erkek Gonad	<i>Aeromonas salmonicida</i>

İzole edilen bakterilerde ağırlıklı olarak *Vibrio sp.* türlerinin bulunduğu görülmüştür. *Vibrio* cinsine ait 3 tür izole edilmiş olup bu türlerin mevsimsel dağılımın ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7). Yaz döneminde sadece *Vibrio* türleri izole edilmişken en yüksek bakteri çeşitliliği sırasıyla ilkbahar ve kış aylarında görülmüştür.

**Tablo 4.7** İzole edilen bakterilerin mevsimlere göre dağılımı

<b>Yaz</b>	<b>İlkbahar</b>	<b>Kış</b>	<b>Sonbahar</b>
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Vibrio owensii</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Shewanella baltica</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Vibrio owensii</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	
	<i>Bacillus</i> sp.		

İzole edilen bakteriler cinsiyete göre incelendiğinde 3 *Vibrio* türünün, *E. faecalis* ve *P. lundensis* türlerinin her iki cinsiyette bulunduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8** İzole edilen bakterilerin cinsiyete göre dağılımı

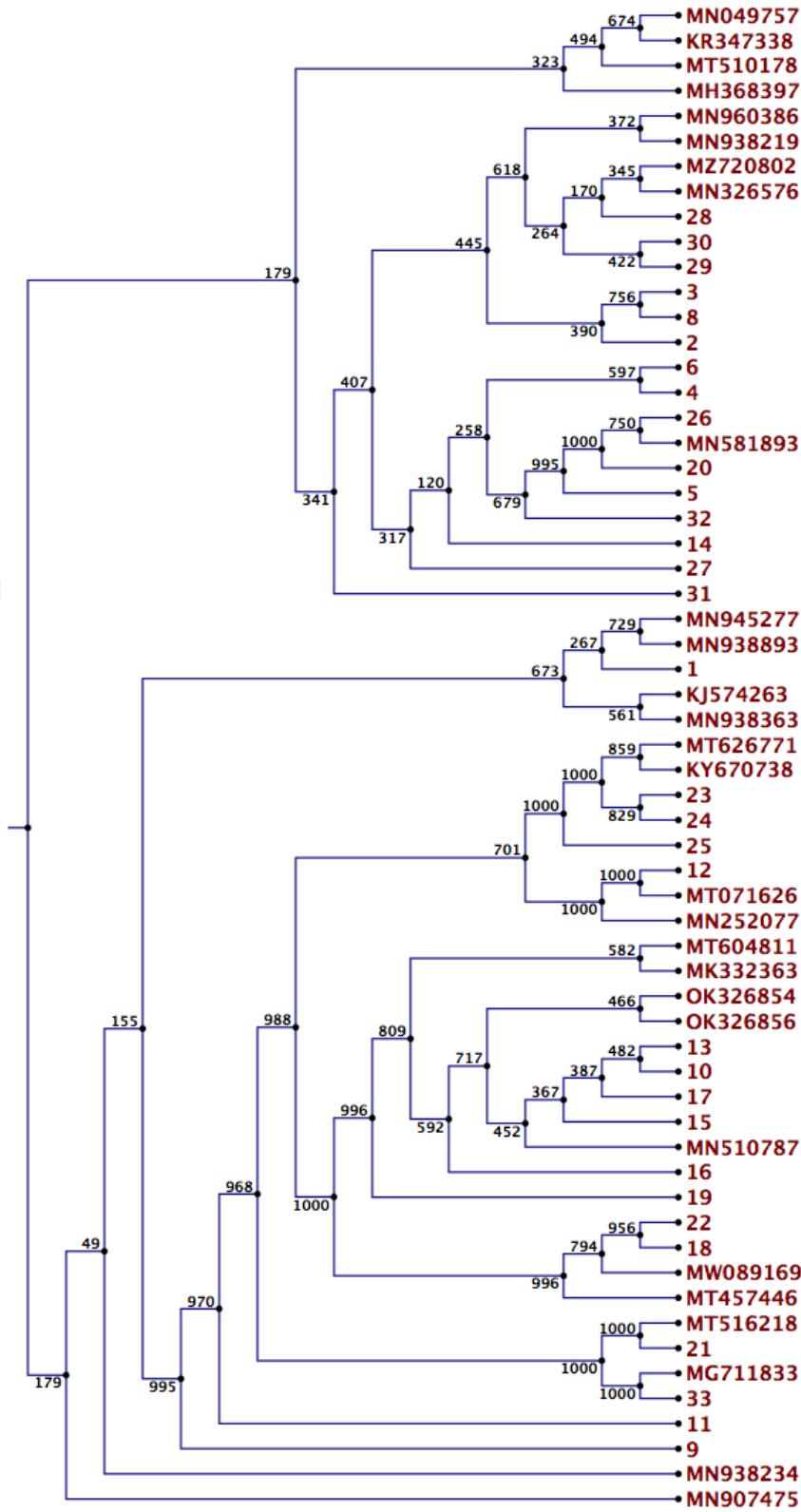
<b>Dişi</b>	<b>Erkek</b>
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Vibrio owensii</i>	<i>Vibrio owensii</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Pseudomonas lundensis</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
<i>Shewanella baltica</i>	
<i>Enterobacter hormaechei</i>	

İzole edilen bakteri türlerinin çeşitliliği organlara göre değerlendirildiğinde İki organda ortak olan *V. harveyi* ve *E. faecalis* türlerinin bulunduğu tespit edilmiş ve en fazla karaciğerde bakteri çeşitliliğinin olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.9).

**Tablo 4.9** İzole edilen bakterilerin organlara göre dağılımı

<b>Karaciğer</b>	<b>Gonad</b>
<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Vibrio owensii</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Shewanella baltica</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	
<i>Bacillus</i> sp.	
<i>Pseudomonas lundensis</i>	

Elde edilen dizilerin hizalanmasında CLC Sequence Viewer programı kullanılmıştır. Ardından Neighbour Joining algoritmaları ile ağaç oluşturulmuştur. Ağaç oluştururken bootstrap değeri olarak 1000 tekrar kullanılmıştır



Şekil 4.13 *Lagocephalus sceleratus* balon balığından mevsimsel olarak karaciğer ve gonadlardan izole edilen bakterilerin 16S rDNA gen dizilerine filogenetik ağaç oluşumu.

## 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında dört mevsim boyunca Göcek'teki balıkçılardan bir dişi bir erkek olmak üzere toplam 8 örnek temin edilmiştir. Gonad ve karaciğer üzerinden alınan sürüntü örnekleri, Muğla Göcek'ten dört farklı mevsimde yakalanan *L. sceleratus* bireylerinin dört mevsim iki ayrı eşeyinden ve her eşey grubundan iki farklı bireyden alınmıştır. Diseksiyon işlemi yapılmadan önce balıkların boy, kilo ölçümü cm ve g cinsinden kaydedilmiştir. Uygun hava koşullarında diseksiyon işlemi deniz üzerinde gerçekleştirilmiş olup alınan örnekler bakteriyel ozmotik değişimleri önlemek ve inhibisyonun önüne geçebilmek için FTS içinde laboratuvar ortamına getirilmiştir.

Uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılan gonad ve karaciğerlerden bakteri izolasyonu çeşitli besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bakteriler gram boyamanın ardından mikroskop altında incelenmiş ve ardından DNA izolasyonu için Tris-EDTA (TE) tamponu içerisinde -20°C'de saklanmıştır. Ardından bakterilerden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, 16S rDNA bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmış ve hizmet alımı yoluyla 16S rDNA bölgelerinin bazı dizileri belirlenmiştir. İzole edilen 33 bakteriden 1 tanesi dizi analizinde sonuç vermemiştir. Diğer diziler GenBankasında blastlandığında 10 adet *V. harveyi*, 3 adet *V. alginolyticus*, 2 adet *V. owensi*, 6 adet *Enterococcus faecalis*, 1 adet *Acinetobacter radioresistens*, 1 adet *Enterobacter hormaechei*, 2 adet *Bacillus* sp., 1 adet *Acinetobacter* sp., 1 adet *Aeromonas salmonicida*, 1 adet *Shewanella baltica* ve 3 adet dizi analizi sonucu ise *Pseudomonas lundensis* olarak belirlenmiştir. Bakteri dağılımının mevsime, cinsiyete ve organa göre farklılık gösterdiği gözlenmiş ve en bol gözlenen bakterinin *V. harveyi* olduğu tespit edilmiştir. *V. harveyi*, *Vibrio* cinsinden gram negatif, biyoluminesans yapabilen, deniz bakterisidir. *V. harveyi* çubuk şeklinde, hareketli (polar flagella yoluyla), fakültatif olarak anaerobik, halofiliktir ve hem fermentatif hem de solunum metabolizması için yetkindir. 4°C'nin altında büyümmez (optimum büyüme: 30°C ile 35°C). Özellikle de yaz aylarında izole ettiğimiz türlerin başında olması bu nedenle olabilir. *V. harveyi* tropik deniz sularında serbest yüzerken, deniz hayvanlarının bağırsak mikroflorasında ve Gorgon mercanları dahil deniz hayvanlarının hem birincil hem de fırsatçı patojeni olarak bulunabilir (Owens ve

ark., 2006). Ticari olarak yetiştirilen penaeid karidesleri etkileyen bir hastalık olan parlak vibriozdan sorumludur (Austin ve ark., 2006). Ek olarak, okyanusta seyreden gemilerden alınan örneklerle dayanarak, *V. harveyi* türünün denizlerde biyoluminesens yaptığı bilinmektedir. Quorum sensing metabolizmaları oldukça gelişmiş olduğundan diğer türleri baskılamaktadırlar, bu bakteriyi tüm örneklerde izole etmemiz türün bu özelliğinden kaynaklanabilir.

Bunun yanı sıra ikincil baskın tür *Enterococcus faecalis* türüdür. Genellikle gastrointestinal sistemlerinde yaşayan gram-pozitif, kommensal bir bakteridir (Kenneth ve ark., 2004). Balık iç organ florasının çoğunu oluşturmaktadır. *Enterococcus* cinsindeki diğer türler gibi, *E. faecalis* türü de sağlıklı bireylerde doğal olarak bulunur ve probiyotik olarak kullanılabilir (Anzai ve ark., 2000)

Üçüncü sıklıkta yer alan tür ise *Pseudomonas lundensis* türüdür. *P. lundensis* genellikle süt, peynir, et ve balıkların bozulmasına neden olan gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteridir (Anzai ve ark., 2000). Deniz gıdalarındaki en büyük zehirlenme etmeni bu bakteridir. Bazı su ürünleri gıdalarında raf ömrü çalışmalarında bu bakterinin yoğunluğuna bakılarak bozulma durumları ve raf ömrü çalışmaları gerçekleştirilir. Aynı zamanda TTX üreten *Pseudomonas* sp. bu grubunun da bir temsilcisidir.

Bulunan diğer bir bakteri türü olan *Vibrio ovensii*; çubuk şekilli, isteğe bağlı anaerobik gram negatif bir türdür. Cano-Gomez vd'nin 2009'da yaptığı çalışmada TCSB agarda ürettiği gözlemlenmiştir.

Yayınlanan çalışmalarda hem deniz hem de toprak ortamlarındaki en önemli hidrokarbon parçalayan bakteriler arasında *Acinetobacter* sp. ve *Bacillus* sp. türlerinin de bulunduğunu göstermektedir (Çay, H., 2017). Bunlar TTX üreten bakteriler olarak bilinmektedir (Magarlamov ve ark., 2017). *Acinetobacter* sp. üyelerinden bazıları yaşadığı doğal ortam gereği farklı tuz, ısı ve pH şartlarına da dayanıklıdırlar (Gül-Şeker, M., 2009).

Akdeniz'e Kızıl Deniz'den göç eden; ekonomik ve ekolojik açıdan zararlı olan türler arasında en yaygın olanı *L. sceleratus* türü olup, birçok bilimsel çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Özellikle balıkçılık malzemelerine zarar vermeleri, vücutlarında toksin bulundurmaları ve Akdeniz'e çok iyi adapte olup hızlı çoğalmaları popülaritelerinin temelini oluşturmaktadır.

20 g ağırlığındaki erkek Swiss albino ırkı fareler üzerinde yapılan çalışmalarda toksin düzeylerinin öldürücü etkileri araştırılarak tespit edilmiştir. Balon balıklarında sıklıkla kullanılan bir analiz yöntemi olan fare deneyleri sonucunda elde edilen değerler Mouse Unit olarak belirtilmiştir. 1 MU yaklaşık olarak 0,22 µg'a denk gelmektedir (Yasumoto ve Michishita, 1985). Fare deneyleri ile enjeksiyon yapılan doku (Katikou ve ark., 2009; Hungerford, 2006; Sabrah ve ark., 2006; Saoudi ve ark., 2008; Nuñez-Vazquez ve ark., 2000; El-Sayed ve ark., 2003; Bragadeeswaran ve ark., 2010; Chulanetra ve ark., 2011) ekstresi içerisindeki 1 MU (0,22 µg) ve üzerindeki toksin içerikleri tespit edilebilmiştir (Katikou ve ark., 2009; Hungerford, 2006; Sabrah ve ark., 2006; Saoudi ve ark., 2008; Nuñez-Vazquez ve ark., 2000; El-Sayed ve ark., 2003; Bragadeeswaran ve ark., 2010; Chulanetra ve ark., 2011).

TTX konsantrasyonunun dağılımı bireylere, bölgelere ve mevsime göre değişkenlik gösterebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TTX'in balon balığı ovaryum ve akciğerlerindeki miktarlarının diğer organlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Dişi balon balıkları erkeklere göre daha zehirlidir çünkü ovaryumlar testislere göre daha fazla TTX içermektedir. TTX toksinini balon balıklarının üretmediği, balığın bünyesine besin zincirinden geçtiği ve bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir (Hwang ve Noguchi, 2007).

Yaptığımız moleküler bakteri tayinlerinde *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Shewanella* sp., *Pseudomonas* sp., gibi TTX üreten bakterilere rastlanmıştır. TTX üreten bu bakterilerin en az bir tanesinin her mevsimde mutlaka bulunduğu gözlemlenmiştir.

TTX son derece kuvvetli bir toksin olmasına rağmen farmasötik alanda umut vaat edici bir moleküldür. 20. YY başlarında Japonya'da TTX molekülünün klinik alanlarda romatizma tedavilerinde uygulandığı görülmüştür (Noguchi ve Arakawa, 2008). Çin Halk Cumhuriyeti'nde terminal kanser hastalarında ağrı kesici olarak medikal kullanımı söz konusudur (Saoudi vd., 2010). TTX'in sinirsel iletim üzerine olası engelleyici etkisi nedeniyle özellikle anestezi alanında yeni ilaçlar için olası bir kaynak olması durumu söz konusudur (Schwartz vd., 1998). Hagen vd., (2008) tarafından yapılan çalışmada TTX'in analjezik etkisinden yararlanarak orta ve ileri düzey kanserli hastalarda ağrıları azaltmak için kullanılmış, kanserli hastalarda ağrıları azalttığını tespit etmişlerdir. Son

yıllarda yapılan çalışmalar TTX molekülünün insan sağlığında kullanılmak üzerine üç farklı etkisi üzerine yoğunlaşmış durumdadır. TTX'in ileri düzey hastalarda ağrı kesici etkisi olduğu, antitümör etki gösterdiği ve uyuşturucu bağımlılığı tedavisinde diğer opioidlere alternatif bağımlılık yapmayan etki mekanizması üzerinde çalışılan özelliklerdir (Saoudi vd., 2010; Schwartz vd., 1998; Yu, 2008; Bragadeeswaran vd., 2010; Hagen vd., 2008).

Alegre vd.'nin 2017 yılında yaptığı çalışmada Batı Akdeniz'de yüksek miktarda TTX içeren balon balığı varlığına dair potansiyel tehlikeden söz etmişlerdir. Denia'da yakalanan *L. sceleratus* türünün oldukça toksik olduğu belirlenmiş ve detaylı bir toksin profili verilmiştir. Balon balığının insan tüketimi için kabul edilebilirliğini değerlendirmek için gonad dokularındaki tetrodotoksin seviyeleri Japon kriterlerinin 10 kat üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Chang vd. 2011 yılında yaptığı çalışmada VAL, TCSB ve TSA üzerinde yaptığı çalışmalarda *V. alginolyticus* suşları üzerinde yuvarlak, düz, yeşil-sarımsı koloniler ürettiğini tespit etmiştir.

Literatürdeki tüm çalışmalarda *L. sceleratus* türü balon balıklarının belirli dönemlerde toksik limitin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ülkemizdeki balon balıklarının toksisitesinin yüksek olduğu ilkbahar ve yaz aylarında *V. alginolyticus* türü bakteri dişi ve arkek bireylerin karaciğerinden izole edilmiştir.

Sabrah`ın 2006 yılında yaptığı çalışmada balık büyüklüklerinin de toksisite miktarını etkilediği verilmiştir. Yaptığımız çalışmada görüldüğü gibi mevsimlere göre total ağırlıklarına ve total boylarına bakıldığında en fazla balık ağırlıklarını yaz ve ilkbahar mevsimlerinde gözlemlemekteyiz. Bu durum balıkların toksik miktarında artışa neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalar balon balıklarının toksisitesinin yaklaşık 1 kg'ı geçtiğinde arttığını öncesinde ise toksisitenin ya çok az ya da hiç olmadığını belirtmektedir.

Çalışmamızda balıkların yaz ve ilkbahar aylarında daha ağırlık ve boylarının daha yüksek çıkmasının nedeni, kış ve sonbahar aylarında daha derinlerde bulunmaları ile ilişkilendirilebilir. Bulunduğu ortamdan kaynaklı yediği besinlerde farklı olacağından, vücuda giren bakterilerin TTX üreten türler olmaları da değişkenlik gösterebilir.

Mevcut tez çalışmasında izole edilen bakterilerin 16S rDNA bölgeleri çoğaltılarak moleküler tayinleri yapılmıştır. Sırasıyla DNA izolasyonu, PCR analizi ve dizi analizinden oluşan basamaklar sonucunda elde edilen gen dizilimleri GenBankasındaki sonuçlarla karşılaştırılarak tür tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda balon balığında bulunan bakteri türleri belirlenmiş; mevsimsel ve dokular arası farklılıklar olduğu bulunmuştur. *L. sceleratus* türünün toksisitesinden *V. alginolyticus* türünün sorumlu olduğu diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak ülkemiz denizlerinde ilk olarak 2006 yılında tespit edilen bu türün toksisitesinin Akdeniz ortamına girdikten sonra değişip değişmediği bilinmemektedir. Doğal ortamı Indo-Pasifik olan bu balık türünün Kızıldeniz yoluyla Akdenize geçmesinin toksisitesini değiştirip değiştirmediği hala bilinmemektedir. Yapılan bu çalışmayla *L. sceleratus* türünün iki organında bulunan bakterilerin türleri ülkemizde ilk olarak belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında toksin üreten *V. alginolyticus* türünün ülkemizdeki *L. sceleratus* türlerinde de bulunuyor olması türün toksisite kaynağının ülkemizde de aynı bakteri olduğunu göstermektedir.

Farmasötik alanda kullanımının her geçen gün arttığı bilinen ve çalışmaların yoğunlaştığı görülen TTX'in ekonomışk önemi de doğru orantılı olarak artmaktadır. Sentetik olarak üretilemeyen ancak 2021 yılında sentetik olarak üretilse de verimliliği tartışmalı olan TTX'in farmasötik çalışmalardaki kullanımı balon balıklarından toksinin izolasyonu şeklinde gerçekleşmektedir. Bu işlemler için karaya çıkarılması yasak olan balığın toplanma izni, balığın yakalanması, özel koşullarda balığın transferi, toksin izolasyonu ve saflaştırılması gibi iş gücü ve maliyet gerektiren prosedürler gerekmektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçların, ileride yapmayı planladığımız *V. alginolyticus* bakterisinden direkt olarak TTX eldesi ve verimliliğin genetik araçlarla arttırılmasına yönelik çalışmalar için önemli bir basamak olduğunu kanıslındayız.

## KAYNAKLAR

Akbora, Hasan Deniz (2018). Kuzey Kıbrıs denizlerinde yaşayan benekli Balon Balığı (*Lagocephalus sceleratus* (Gmelin 1789))'nın çeşitli dokularında bulunan Tetrodotoksin (TTX) düzeylerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 61s, Yayınlanmıştır.

Akyol, O. ve ark., (2005). First Confirmed Record Of *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) In The Mediterranean Sea, Journal Of Fish Biology (2005) 66, 1183-1186.

Ana Cano-Gomez, Evan F. Goulden, Leigh Owens, Lone Høj (2009). *Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia. FEMS Microbiol Lett 302 (2010) 175–181

Anzai; Kim, H; Park, JY; Wakabayashi, H; Oyaizu, H; ve diğerleri (Tem 2000). "16S rRNA dizisine dayalı psödomonadların filogenetik ilişkisi". Int J Syst Evol Mikrobiol. 50 (4): 1563–89. doi: 10.1099/00207713-50-4-1563. PMID 10939664.

Arakawa, O., Hwang, D., Taniyama, S., & Takatani, T., (2010). Toxins of pufferfish that cause human intoxications. Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea, (Eds.), A. Ishimatsu, & H.-J. Lie, pp. 227–244, TERRAPUB and Naga-saki University.

Asakawa, M., Ito, K., & Kajihara, H., (2013). Highly Toxic Ribbon Worm *Cephalothrix simula* Containing Tetrodotoksin in Hiroshima Bay, Hiroshima Prefecture, Japan. *Toxins*, 5, 376–395.

Austin B, Austin D (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish Fifth (Revised) Edition. *Springer-Praxis Publishing*, Chichester.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Austin B, Zhang XH (2006). " *Vibrio harveyi*: deniz omurgalıları ve omurgasızlarının önemli bir patojeni". Uygulamalı Mikrobiyolojide Harfler. 43 (2): 119–214. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01989.x. PMID 16869892.

Avcı, B., Karaağaç, G., (2009), Daidala`dan Göcek`e

Avşar, D., (2005). Balıkçılık Biyolojisi ve Popülasyon Dinamiği, Akademik Kitapevi 1, 306.

Azhar, S. N. M., (2012). Toxicity and toxin properties of puffer fish collected from kuching coastal waters. Project Report. Universiti Malaysia Sarawak.

Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O’Riordan, A., & Furey., A., (2014). Tetrodotoxin: Chemistry, Toxicity, Source, Distribution and Detection. *Toxins*, 6, 693–755.

Bentur, Y., Ashkar, J., Lurie, Y., Levy, Y., Azzam, Z. S., Litmanovich, M., Eisenman, A., 2008. Lessepsian Migration and Tetrodotoxin Poisoning Due to *Lagocephalus sceleratus* In The Eastern Mediterranean. *Toxicon*, 52(8): 964-968. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.10.001

Bragadeeswaran, S., Therasa, D., Prabhu, K., Kathiresan, K., 2010. Biomedical And Pharmacological Potential of Tetrodotoxin-Producing Bacteria Isolation from Marine Pufferfish *Arothron hispidus* (Muller, 1841). *The Journal of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases*, 16(3): 421-431

Buller, Nb (2014). Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals: a practical identification manual. Cabi.

Buller, Nb (2014). Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals: a practical identification manual. Cabi.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Burke, M.J. W., Grime, J.P. ,1996. An experimental study of plant community invasibility.

Chamandi, S. C., Kallab, K., Mattar, H., Nader, E., 2009. Human Poisoning After Ingestion of Puffer Fish Caught from Mediterranean Sea. Middle East Journal of Anesthesiology, 20(2):285-288.

Charlebois, P.M., Marsden, J.E., Goettel, R.G., Wolfe, R.K., Jude, D.J., and Rudnika, S. 1997. The round goby *Neogobius melanostomus* (Pallas): a review of European and North American literature with notes from the Round Goby Conference, Echelle, A.A., Echelle, A.F., 1997.

Chua, H. H., Chew, L.P. (2009). Pufferfish poisoning: A family affair.

Coblentz, Bruce E., (1990, September). Exotic organisms: A Dilemma for Conservation Biology, 68

Colautti, R. I, MacIssac H.J, 2004. A neutral terminology to define “invasive species”.

Çağırğan, H. (1993). The First Isolation of *Pasteurella piscicida* From Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. Hayvancılık Araştırma Dergisi 3(2): 17-19.

Davis, M. A., Thamsen, K., 2000. Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology.

Di Pinto A., Ciccarese G., Tantillo G., Catalano D., Forte V. T., 2005. A Collagenase-Targeted Multiplex PCR Assay for Identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Do HK, Kogure K., Imada C., Noguchi T., Ohwada K., Simidu U. Deniz sedimentinden izole edilmiş aktinomisetlerin tetrodotoksin üretimi. J. Appl. Microbiol. 1991; 70: 464–468. doi: 10.1111 / j.1365-2672. 1991.tb02741.x.

Do HK, Kogure K., Simidu U. Tetrodotoksin üreten derin deniz tortusu bakterilerinin tanımlanması. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56: 1162–1163.

Eisenman, A., Rusetski, V., Sharivker, D., Yona, Z., Golani, D., 2008. An Odd Pilgrim in The Holy Land. The American Journal of Emergency Medicine, 26(3): 383.e3–383.e6. doi: 10.1016/j.ajem.2007.05.035

Facultatively halophilic bacetria, vibrio parahaemolyticus. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. Japanese Journal of Medical Science and Biology 16(4): 161-188.

FDA. Defect action levels for histamine in tuna; Availability of guide. Federal Register U.S. Food and Drug Administration, 1982; 47: 40487.

Fernandez-Ortega, J.F., Santos, J.M., Herrera-Gutierrez, M.E., Fernandezsanchez, V., Loureo, P.R., Rancano, A.A., Tellez-Andrade, A., 2010. Seafood Intoxication By Tetrodotoksin: First Case İn Europe. The Journal of Emergency Medicine, 39(5): 612-617

Froese R., Pauly D. (eds) (2010) FishBase. World Wide Web electronic publication.

<http://www.fishbase.org>, version 05/2012.

Fugicularis vermicularis balıklarının bağırsaklarında bir tetrodotoksin üreten bakteri olan Noguchi T., Hwang DF, Arakawa O., Sugita H., Deguchi Y., Shida Y., Hashimoto K. *Vibrio alginolyticus*. Mar. Biol. 1987; 94: 625–630. doi: 10.1007 / BF00431409.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Fuller, P.L., Nico, L.G., Williams, J.D., 1999. Nonindigenous fishes introduced into inland waters of the United States. US Geological Survey, Bethesda, US.

Galil, B. S., 2000. A Sea Under Siege-Alien Species In The Mediterranean. *Biological Invasions*, 2(2): 177-186

Galil, B. Zenetos, A., 2002. A Sea Change- Exotics in The Eastern Mediterranean Sea. In *Invasive Aquatic Species in Europe. Distribution, Impacts and Management*, E. Leppakoski Et. Al. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 325-336

Golani D. & Appelbaum-Golani B., 2010a Fish Invasions of the Mediterranean Sea Change and Renewal. Sofia–Moscow. 332 P.

Golani D., 1998. Distribution of Lessepsian migrant fish in the Mediterranean. *Italian Journal of Zoology*, 65 (1): 95-99

Golani Ve Levy, 2005. New Records and Rare Occurrences of Fish Species From The Mediterranean Coast Of Israel. *Zoology In The Middle East*, 36:1, 27-32

Goodwin, B.J., McAllister, A.J., Fahrig, L., 1999. Predicting invasiveness of plant based on biological information.

Guardone et al., September 2018; Toxic invasive pufferfish (Tetraodontidae family) along Italian coasts: Assessment of an emerging public health risk , Volume 91, Pages 330-338

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Hanifin, C. T., 2010. The Chemical and Evolutionary Ecology of Tetrodotoxin (TTX) Toxicity In Terrestrial Vertebrates. *Marine Drugs*, 8(3): 577-593

Hanifin, C.T., (2010). The chemical and evolutionary ecology of tetrodotoxin (TTX) toxicity in terrestrial vertebrates.

Haque, M.A., Islam, Q.T., & Ekram, A.R.M.S., (2008), Puffer Fish Poisoning. *Teachers Association Journal*, 20, 199–202.

Hürsel Çay (2017). Atıksu Arıtımı İçin Adapte Aşı Kültürünün Sıvı Karışım Olarak Üretimi, Raf Ömrünün Ve Biyoparçalama Etkinliğinin Saptanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 142s, Yayınlanmış.

<https://www.fishbase.de/summary/55076>

Hwang DF, Arakawa O., Saito T., Noguchi T., Simidu U., Tsukamoto K., Shida Y., Hashimoto K. Mavi halkalı ahtapot *Octopus maculosus*'tan tetrodotoksin üreten bakteriler. *Mar. Biol.* 1989; 100: 327–332. doi: 10.1007 / BF00391147.

Hwang DF, Cheng CA, Chen HC, Jeng SS, Noguchi T., Ohwada K., Hashimoto K. Microflora ve çizgili ay kabuğu *Natica lineata*'da tetrodotoksin üreten bakteri. *Sci.* 1994; 60: 567–571.

Hwang, D. F., Noguchi, T., 2007. Tetrodotoxin Poisoning. *Advances In Food and Nutrition Research*, 52:141-236

Iverson, F., Truelove, J., 1994. Toxicology And Seafood Toxins: Domoic Acid. *Natural Toxins*, 2(5): 334-339

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Jeon, J. K., K. Miyazawa, T. Noguchi, H. Narita, K. Ito and K. Hashimoto, 1984. Occurrence Of Tetrodotoxin in A Gastropod Mollusk, 'Araregai' Niotha Clathrata. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 50:2099-2015

Kalogirou, et al., 2013. Ecological Characteristics Of The Invasive Pufferfish *L. Sceleratus* (Gmelin,1798) In The Eastern Mediterranean Sea- A Case Study From Rhodes. Mediterranean Marine Science 14(2), 251-260

Katikou, P., Georgantelis, D., Sinouris, N., Petsi, A., Fotaras, T., (2009). First report on toxicity assessment of the Lessepsian migrant pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters (Aegean Sea, Greece).

Katsanevakis, et al., 2014. New Mediterranean Biodiversity Records (October,2014), Mediterranean Marine Science 15(3), 675-695

Katsanevakis, S., Tsiamis, K., Ioannou, G., Michailidis, N., Zenetos, A., (2009). Inventory of alien marine species of Cyprus (2009). Mediterranean Marine Science, 1(2),109–133.

Kheifets, J., Rozhavsky, B., Girsh Solomonovich, Z., Marianna, R., Soroksky, A., 2012. Severe Tetrodotoxin Poisoning After Consumption of *Lagocephalus sceleratus* (Pufferfish, Fugu) Fished in Mediterranean Sea, Treated with Cholinesterase Inhibitor. Case Reports in Critical Care, vol. 2012, Article ID 782507, 3 pages. doi: 10.1155/2012/782507

King, C.M., 1990. The handbook of New Zealand mammals, Oxford University Press, Oxford, UK.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Kogure K., Do HK, Thuesen EV, Nanba K., Ohwada K., Simidu U. Deniz sedimentinde tetrodotoksin birikimi. Mart Ecol. Prog. Ser. 1988; 45: 303–305. doi: 10.3354 / meps045303.

Korun J, Timur, G. (2005). The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgheh 57(3): 197–206.

Kulbicki, M., Bozec, Y.M., Labrosse, P., Letourneur Y., Mou-Tham, G., Wantiez, L., (2005). Diet composition of carnivorous fishes from coral reef lagoons of New Caledonia. Aquat. Living Resour., 18, 231–250.

Kungsuwan A., Noguchi T., Arakawa O., Simidu U., Tsukamoto K., Shida Y., Hashimoto K. At nalı yengeci *Carcinoscorpius rotundicauda*'dan bakteri üreten tetrodotoksin. Nippon Suisan Gakkaishi. 1988; 54: 1799–1802. doi: 10.2331 / suisan.54.1799.

Lasram, F. Ben Rais, Tomasin, J.A., Guilhauman, F., Ramdhane, M.S, Do Chi, T.,

Lockwood, J.L., 1999. Using taxonomy to predict success among introduced auifauna: relative importance of transport and establishment.

Lodge DM. 1993. Biological invasions: lessons for ecology. Trends Ecol. Evol. 8:133-137

Mack, R.N., Simberloff, D., Lonsdale, W.M., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.A., 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Magarlamov, T., Melnikova, D. And Chernyshev, A., 2017. Tetrodotoxin-Producing Bacteria: Detection, Distribution and Migration of the Toxin in Aquatic Systems. *Toxins*, 2017, 9, 166.

Maruyama, J., T. Noguchi, J.K. Jeon, T. Harada, And K. Hashimoto, 1984. Occurrence Of Tetrodotoxin in The Starfish *Astropenten latespinisus*. *Experientia* 40:1395-1402

Matsui T., Taketsugu S., Kodama K., Shiba-Ishii A., Yamamori K., Shimizu C., Shira-Ishi A. Bir kirpi balığı Takifugu niphobles'in bağırsak bakterileri tarafından tetrodotoksin üretimi. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1989; 55: 2199–2203. doi: 10.2331 / suisan.55.2199.

Mauillot, D., 2008. Ecological corraletes of dispersal success of Lessepsian fishes.

Mine Gül-Şeker (2009). Marmara Denizi Ve Karadeniz' Den İzole Edilen Bakterilerin Safılaştırılması Ve Tanımlanması, Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik Ve Fen Bilimleri Enstitüsü, 304s, Yayınlanmış.

Miyazawa, K., Noguchi, T., 2001. Distribution And Origin of Tetrodotoxin. *Toxin Reviews*, 20(1):11-33.

Mooney, H.A., Cleland, E. E., 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Colloquium*, 5446-5451 PNAS vol:98 no:10.

Mosher, H.S., F. A. Fuhrman, H.D. Buchwaid, And H. G. Fischer, 1964. Tarichatoxin-Tetrodotoxin: A Potent Neurotoxin. *Science* 144:1100

Mustapha S, Mustapha Em, Nozha C (2013). *Vibrio alginolyticus*: an emerging pathogen of food borne diseases. *Int J Sci Tech* 2: 302-309.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Nader, M. R., Indary, S. and Boustany, L.E. 2012. The puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) in the eastern Mediterranean. EastMed Technical Documents (FAO)

Narita H., Matsubara S., Miwa N., Akahane S., Murakami M., Goto T., Nara M., Noguchi T., Saito T., Shida Y., vd. Denizyıldızı *Astropecten polyacanthus*'tan izole edilmiş, TTX üreten bir bakteri olan *Vibrio alginolyticus*. Nippon Suisan Gakkaishi. 1987; 53: 617–621. doi: 10.2331 / suisan.53.617.

Narita, H., T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Nara, And K. Hashimoto. 1948. Occurrence of Tetrodotoxin-Associated Substance In A Gastropod, “Hanamushirogai” *Zeuxis siquijorensis*. Bull. Jpn Soc. Sci. Fish. 50:85-89

Narita, H., T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Ueda, K. Hashimoto, Y. Watanabe, And K. Hida. 1981 Occurrence of Tetrodotoxin in A Trumpet Shell, “Boshubora” *Charonia sauliae*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47:935-942

Neagu, D., Micheli, L., Palleschi, D., 2006. Study of a toxin-alkaline phosphatase conjugate for the development of an immunosensor for tetrodotoxin determination, Anal Bioanal Chem (2006) 385: 1068–1074

Nelson, J., S., (2006). Fishes of the World. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons, Gnc.

Noguchi T., Jeon JK, Arakawa O., Sugita H., Deguchi Y., Shida Y., Hashimoto K. Tetrodotoksin ve anhidrotetrodotoksinin *Vibrio* sp. Bir ksantit yengeci *Atergatis floridus*'un bağırsaklarından izole edilmiştir. J. Biochem. 1986; 99: 311–314. doi: 10.1093 / oxfordjournals.jbchem.a135476.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Noguchi, T., And Y. Hashimoto. 1973. Isolation of Tetrodotoxin from A Goby *Gobius criniger*. Toxin 11:305-310

Noguchi, T., Arawaka, O., 2008. Tetrodotoxin-Distribution and Accumulation İn Aquatic Organisms, And Cases of Human Intoxication. Marine Drugs, 6(2):625-242

Occhipinti-Ambrogi, A., Savini, D., 2003. Biological invasions as a component of global change in stressed marine ecosystems.

Oral, M., (2010). Alien fish species in the Mediterranean – Black Sea basin. J. Black Sea / Mediterranean Environment, 16 (1), 87–132.

Owens, Leigh; Busico-Salcedo, Nancy (2006). "*Vibrio harveyi*: Cennetteki Güzel Problemler (Bölüm 19)". Thompson, Fabiano'da; Austin, Brian; Salıncaklar, Jean (ed.). *Vibrio* sp'nin Biyolojisi. ASM Basın.

Özbay, T., 2015. Mersin Körfezi'nde Dağılım Gösteren Balon Balığı, *Lagocephalus Sceleratus* (Gmelin,1789)'un Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi

Özdemir, G., Ceylan, B., 2007. Biyolojik İstila ve Karadeniz'deki İstilacı Türler.

Polat, N. ve ark., (2011). İstilacı balık türleri ve hayat stratejileri. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi (2011) 2, 63-86.

Radford, I.J., Causens, R.D., 2000. Invasiveness and comperative life-history traits of exotic and indigenous *Senecio* species in Australia. Oecologia.

Randall, J.E., 1995. Coastal fishes of Oman. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii. 439 p.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Reichard, S.H., Hamilton, C.W., 1997. Predicting invasions of woody plants introduced into North America.

Ricciardi, A., Rasmussen, J. B. ,1998. Predicting the identity and impact of future biological invaders: a priority for aquatic resource management.

Ritchie KB, Nagelkerken I., James S., Smith GW Bir tetrodotoksin üreten deniz patojeni. Doğa. 2000; 404: 354. doi: 10.1038 / 35006168.

Rodríguez, I.; Alfonso, A.; Alonso, E.; Rubiolo, J.A.; Roel, M.; Vlamis, A.; Katikou, P.; Jackson, S.J.; Menon, M.S.; Dobson, A.; et al. The association of bacterial C9-based TTX-like compounds with *Prorocentrum minimum* opens new uncertainties about shellfish seafood safety. Sci. Rep.,7, 40880.

Sabrah M. M., El-Ganany A.A., Zaky M.A., 2006. Biology and Toxicity of the Pufferfish *Lagocephalus sceleratus* (gmelin, 1789) From the Gulf of Suez. Egyptian Journal of Aquatic Research, 32 (1): 283-.297.

Sakazakı R, Iwanamı S, Fukumı H (1963). Studies on the enteropathogenic.

Sakazakı R, Tamura K, Kato T, Obara Y, Yamai S, Hobo K (1968). Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*.

Saoudi, M., Abdelmouleh, A., El Feki, A., 2010. Tetrodotoksin: A Potent Marine Toxin. Toxin Reviews (Formerly Journal of Toxicology), 29(2):60-70

Schwartz, D. M., Fields, H. L., Duncan, K. G., Duncan, J. L., Jones M. R., 1998. Experimental Study of Tetrodotoksin, A Long-Acting Topical Anesthetic. American Journal of Ophtalmology, 125(4), 481-487

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Shakman, E.A., Kinzelbach, R., (2007). Distribution and characterization of Lessepsian migrant fishes along the Coast of Libya.

Shakman, E.A., Kinzelbach, R., (2007). Distribution and characterization of Lessepsian migrant fishes along the Coast of Libya. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37 (1), 7–15.

Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. 4th ed. Kenneth J. Ryan, C. George Ray, John C. Sherris. New York: McGraw-Hill. 2004. ISBN 0-8385-8529-9. OCLC 52358530.

Sheumack, D. D., M. E. Howden, I. Spence, And R. J. Quinn. 1978. Maculatoxin: A Neurotoxin from The Venom Glands Of The Octopus *Haplochlæna maculosa* Identified As Tetrodotoxin. *Science* 199:188-191

Stickney, Rr (2000). *Encyclopedia of aquaculture*. Wiley.

Stokes, David. L., Elliott, D. C., David, M. C., Santiago L., (2014, May). Pictures of an Invasion: English Holly (*Ilex aquifolium*) in a Semi-natural Pacific Northwest Forest, *Northwest Science* 88(2): 75-93

Straftaris, N., Zenetos, A., 2006. Alien Marine Species in The Mediterranean the 100\_Worst Invasives and Their Impact. *Mediterranean Marine Science*, 7(1): 87-118

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Balon Balığı Avcılığının Desteklenmesine Dair Tebliğ, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2020/12/20201202-4.htm> (Erişim tarihi: 2 Aralık 2020)

Talwar, P.K. and Jhingran, A.G. (1991) *Inland Fishes of India and Adjacent Countries*. Oxford-IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 1158 p

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Temiz, A., (2010), Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri

Terzi, G., (2008). Deniz ürünlerine bağlı zehirlenmeler ve etkileri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2008; 65(1) :51-60

Thuesen EV, Kogure K. Dört Chaetognatha türünde bakteriyel tetrodotoksin üretimi. Biol. Boğa. 1989; 176: 191–194. doi: 10.2307 / 1541587.

Timur G, Timur M (1991). An Outbreak of Enteric Redmouth Disease in Farmed Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 11: 181-182.

Tuncer S., Cihangir H.A. and Bilecenoglu M., 2008. First record of the Lessepsian migrant *Lagocephalus spadiceus* (Tetraodontide) in the Sea of Marmara. Cybium, 32(4): 347-348

Tuncer, S., Aslan, H. (2008). First record of the Lessepsian migrant *Lagocephalus spadiceus* (Tetraodontidae) in the Sea of Marmara. Cybium: International of Ichthyology,32(4): 347-348.

Van Clef, M., Stiles, E.W., 2001. Seed longevity in three pairs of native and non-native congeners: assessing invasive potential.

Vermeij, G.J., 1996. Biological Conservation

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Mellilo, J.M., 1997. Human domination of Earth's ecosystems.

Welcomme, R.L., 1988. International introductions of inland aquatic species. FAO Fish. Tech. Pap., N° 294, Rome, FAO, 318 p.

## KAYNAKLAR (DEVAM)

Williamson, M., 1996. Biological invasion. Champmon & Hall, London.

Woodward, R. B. (1964). The structure of tetrodotoxin. Pure and Applied Chemistry, 9 (1), 49–74.

Wu, Et al.,2005; Toxicity and Distribution of Tetrodotoxin-Producing Bacteria İn Puffer Fish Fugu Rubripes Collected From The Bohai Sea Of China, Toxicon 46, 471-476

Yaman F, Seçer S, Halkman Ak (2003). Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata L.*) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax L.*) Balıklarında Vibriosiz ve Pasteurellosis'in Araştırılması. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 1(2): 1-36.

Yasumoto T., Yasumura D., Yotsu M., Michishita T., Endo A., Kotak Y. Tetrodotoksin ve anhidrotetrodotoksinin bakteriyel üretimi. Agric. Biol. Chem. 1986; 50: 793–795. doi: 10.1080 / 00021369.1986.10867470.

Yasumoto, T., Michishita, T., 1985. Fluorometric Determination of Tetrodotoxin by High Performance Liquid Chromatography. Agricultural and Biological Chemistry, 49(10): 3077-3080.doi: 10.1080/00021369.1985.10867225

Yotsu M., Yamazaki T., Meguro Y., Endo A., Murata M., Naoki H., Yasumoto T. Tetrodotoksin ve türevlerinin *Pseudomonas* sp. kirpi balon balığı derisinden izole edilmiştir. Toxicon. 1987; 25: 225–228. doi: 10.1016 / 0041-0101 (87) 90245-5.

Yu, C. H., 2008. Detection And Biosynthesis of Puffer Fish Toxin From Bacterial Culture For Novel Medical Application. Phd Thesis, The Hong Kong Polytechnic University, PRC

## **KAYNAKLAR (DEVAM)**

Zenetos et al., 2012. Alien Species In The Mediterranean Sea By 2012. A Contribution To The Application Of European Union`S Marine Strategy Framework Directive (MSFD). Part 2. Introduction Trend and Pathways. Mediterranean Marine Science 13(2), 328-352

Zimmer, T., 2010. Effects Of Tetrodotoxin on The Mammalian Cardiovascular System. Marine Drugs, 8(3):741-762. doi: 10.3390/md8030741



## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisansım süresince bana tecrübelerini ve bilgi birikimini esirgemeyen, her zaman yardımcı olan, beni yönlendiren değerli tez danışmanım Doç. Dr. İnci Tüney Kızılkaya'ya en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prof. Dr. Ataç Üzel hocama bakteri kültürü ve tanımlanması konularda yardımlarında dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca desteklerinden dolayı Akdeniz Koruma Derneği'ne ve bu süreçte destek olan bütün arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZGEÇMİŞ

İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini İskenderun`da tamamladı. 2013 yılında kazandığı Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümünden 2018 yılında mezun oldu. 2018 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü`nde yüksek lisansa başladı ve 2022 yılında yüksek lisansını tamamladı. Yüksek Lisans eğitimi boyunca Akdeniz Koruma Derneği`nde çeşitli projelerde çalıştı. 2021 yılında Klinik Araştırma saha görevlisi olarak işe başladı ve halen devam etmektedir.

