

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

KÜLTÜR BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN *Aeromonas hydrophila* SUŞLARINDA FENOLİK BİLEŞENLERİN ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİ VE SUŞLAR ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Nurdan FİLİK

Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

II. Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ebru ÖNEM

ISPARTA - 2020



© 2020 [Nurdan FİLİK]

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmada;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

02/11/2020

Nurdan FİLİK



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Çevreyi Algılama (Quorum Sensing).....	4
2.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	5
2.2.1. Genom yapısı	6
2.2.2. Hücre yapısı ve metabolizması	6
2.2.3. <i>A. hydrophila</i> patogenezi	7
2.3. Hareketli <i>Aeromonas</i> Septisemisi (MAS).....	7
2.4. <i>A. hydrophila</i> 'da Çevreyi Algılama Sistemi	8
2.5. <i>A. hydrophila</i> 'da Çevreyi Algılama Sistemi Yönetimindeki Virülans Faktörleri.....	11
2.5.1. Biyofilm	15
2.5.2. β -Hemolitik aktivite	17
2.5.2.1. Hemolizin, özellikler, mekanizma, por oluşumu, yapı, hastalık sırasındaki rolü, gen ekspresyonunun düzenlenmesi	17
2.5.2.1.1. Alfa hemolizin (α -hemolizin).....	18
2.5.2.1.2. Beta hemolizin (β -hemolizin)	18
2.5.2.1.3. Gama hemolizin (γ -hemolizin)	18
2.5.3. Elastolitik aktivite	19
2.6. <i>A. hydrophila</i> 'da Antibiyotik Direnci ve <i>A. hydrophila</i> 'nın Neden Olduğu Hastalıkta Risk Yönetimi	19
2.7. Çevreyi Algılama Sisteminin İnhibisyonu (Quorum Quenching)	20
2.7.1. AHL sinyal molekülünün alınmasının engellenmesi	21
2.7.2. AHL sinyal molekülünün sentezinin engellenmesi.....	22
2.7.3. AHL sinyal molekülünün yıkılması	22
2.8. Fenolik Bileşenler (Polifenoller).....	22
2.8.1. Gallik asit (GA).....	24
2.8.2. Rosmarinik asit (RA)	25
2.8.3. Vanilik asit (VA).....	26
2.9. Moleküler Yöntemler	27
2.9.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR).....	27
2.9.2. Değişimli alan jel elektroforezi (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. <i>A. hydrophila</i> suşlarının temini	30
3.1.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarının üretim ve depolanması.....	31
3.1.3. Kullanılan fenolik bileşenler	31
3.1.4. Besiyerleri ve çözeltiler.....	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. <i>A. hydrophila</i> suşlarının identifikasyon testleri	32

3.2.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarının GSP agar (Glutamate starch phenol red) pseudomonas aeromonas selective agar base acc. to KIELWEIN mediumda suş analizi.....	33
3.2.3. Antibiyotik duyarlılık testleri.....	33
3.2.4. <i>ahyI</i> , <i>ahyR</i> genlerinin PCR ile analizi	34
3.2.5. Fenolik bileşenlerle virülans üretim ve inhibisyon testleri	36
3.2.5.1. Biyofilm oluşum testi.....	37
3.2.5.2. β -Hemolitik aktivite testi	37
3.2.5.3. Elastolitik aktivite testi.....	38
3.2.6. Moleküler epidemiyolojik ilişki.....	38
3.2.7. İstatistik	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. <i>A. hydrophila</i> Suşlarının İdentifikasyonu	43
4.3. Farklı Besiyerlerinde (TSA, Aeromonas Isolation Agar Base, GSP, Kanlı Agar) <i>A. hydrophila</i> Suşlarının Koloni Profilleri.....	46
4.4. <i>A. hydrophila</i> 'nın GSP Agar (Glutamate Starch Phenol Red) Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base acc. to KIELWEIN Mediumda Suş Analizi ...	49
4.5. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibiyogram Testi Sonuçları	51
4.6. <i>ahyI</i> , <i>ahyR</i> Genlerinin PCR ile Analizi Sonuçları.....	57
4.7. Fenolik Bileşenlerle Virülans Üretim ve İnhibisyon Testlerinin Sonuçları.....	59
4.7.1. Biyofilm oluşumu test sonuçları	59
4.7.2. β -Hemolitik aktivite testi sonuçları.....	64
4.7.3. Elastolitik aktivite testi sonuçları	70
4.8. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin AH ATCC 7966, AH RSKK 05049, AH SAHA, AH S, AH J, AH 2, AH 3 Suşlarında Biyofilm Oluşumu, β -hemolitik Aktivite ve Elastolitik Aktivite Üzerine Etkisi.....	73
4.9. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin AH 4, AH 12.1, AH 14, AH 15, AH 16, AH 108, AH 113 Suşlarında Biyofilm Oluşumu, β -hemolitik Aktivite ve Elastolitik Aktivite Üzerine Etkisi	75
4.10. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin AH 216, AH 217, AH 219, AH 220, AH 222, AH 230, AH 232 Suşlarında Biyofilm Oluşumu, β -hemolitik Aktivite ve Elastolitik Aktivite Üzerine Etkisi	77
4.11. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin Tüm Suşlarda β -hemolitik Zon Çapı Üzerine Etkisi.....	79
4.12. <i>A. hydrophila</i> Suşlarının PFGE ile Tiplendirilmesi	81
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	84
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	126

ÖZET

Doktora Tezi

KÜLTÜR BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN *Aeromonas hydrophila* SUŞLARINDA FENOLİK BİLEŞENLERİN ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİ VE SUŞLAR ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİNİN PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Nurdan FİLİK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ebru ÖNEM

Araştırmada balıklarda ölümcül Motile Aeromonas Septisemisi etkeni virülans faktörlerini çevreyi algılama sistemiyle yöneten toksikolojik açıdan oldukça güçlü *Aeromonas hydrophila* suşları çalışılmıştır.

Hasta balıklardan izole edilen 20 *A. hydrophila* suşu ile *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşunun antibiyotik direnç profilleri incelenmiş, virülanslardan sorumlu *ahyI* ve *ahyR* genleri Polymerase Chain Reaction (PCR) ile araştırılmıştır. Ayrıca bazı fenolik bileşenlerin *A. hydrophila* suşlarında çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki biyofilm, β -hemolitik aktivite, elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi araştırılmış ve suşlar arasındaki ilişki Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemiyle incelenmiştir.

A. hydrophila suşları 28 antibiyotiğe karşı taranmış 12 antibiyotiğe dirençli, 14 antibiyotiğe duyarlı, 2 antibiyotiğe orta derecede duyarlı olduğu belirlenmiştir. Antibiyogramda en dikkat çeken suşların tedavide etkili olduğu bilinen oksitetrasikline dirençli oluşudur.

PCR analiziyle çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki virülans oluşumundan sorumlu *ahyI* ve *ahyR* genlerinin ikisi de tüm *A. hydrophila* suşlarında saptanmıştır.

A. hydrophila suşlarında çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki virülans faktörleri biyofilm, β -hemolitik aktivite, elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi araştırılmak üzere fenolik bileşenlerden gallik asit, rosmarinik asit, vanilik asit kullanılmıştır ve virülans inhibisyon testlerinde taranan fenolik bileşenlerin önemli inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir. Özellikle rosmarinik asidin biyofilm üzerine, vanilik asitin β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisinin güçlü olduğu bulunmuştur. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P \leq 0.05$) görülmüştür.

PFGE yöntemiyle suşlar arasındaki moleküler epidemiyolojik ilişkinin araştırılmasında 21 *A. hydrophila* suşunun 17 farklı genotip (pulsotip) oluşturduğu saptanmıştır.

Sonuçta *A. hydrophila*'nın virülansından çevreyi algılama sistemi sorumludur ve bu sayede hastalık sürecini yönetir. Hastalık oluşumunda kritik önemde olan çevreyi algılama sisteminin fenolik bileşenlerle inhibisyonunun sağlanarak aralarındaki iletişimin bloke edilmesiyle hastalıkların kontrol altında tutulması bakterilerle mücadelede önemli bir stratejidir.

Anahtar kelimeler: Çevreyi algılama sistemi, Moleküler epidemiyolojik ilişki (PFGE), *A. hydrophila*, Fenolik bileşenler

2020, 127 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INHIBITION EFFECT OF PHENOLIC COMPOUNDS ON QUORUM SENSING SYSTEM AND DETERMINATION OF CLONAL RELATIONSHIP BETWEEN STRAINS BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS IN *Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM CULTURE FISHES

Nurdan FİLİK

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ebru ÖNEM

Research deadly Motile *Aeromonas* Septicemia agent in fish virulence factors manage with quorum sensing system toxicologically very strong *Aeromonas hydrophila* strains were studied. Antibiotic resistance profiles 20 *A. hydrophila* strains isolated from sick fish and *A. hydrophila* ATCC 7966 reference strain were examined, *ahyI* and *ahyR* genes responsible for virulence investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR). Additionally some phenolic compounds investigated inhibition effect on biofilm, β -hemolytic activity, elastolytic activity management quorum sensing system *A. hydrophila* strains and relationship between strains examined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) method.

A. hydrophila strains were screened against 28 antibiotics, 12 antibiotic resistant, 14 antibiotic sensitive, and 2 antibiotics moderately sensitive. The most striking strains antibiogram resistant oxytetracycline which known to be effective treatment.

Both *ahyI* and *ahyR* genes responsible for virulence formation management quorum sensing system by PCR detected all *A. hydrophila* strains.

A. hydrophila strains, phenolic components gallic acid, rosmarinic acid, vanilic acid were used to investigated virulence factors biofilm, β -hemolytic activity, elastolytic activity management quorum sensing system and determined phenolic components screened virulence inhibition tests significant inhibition effect. Especially rosmarinic acid found strong inhibitory effect on biofilm and vanilic acid on β -hemolytic activity and elastolytic activity. Results observe statistically significant ($P \leq 0.05$).

Investigation molecular epidemiological relationship between strains by PFGE method found 21 *A. hydrophila* strains formed 17 different genotypes (pulsotypes).

Ultimately quorum sensing system responsible for virulence of *A. hydrophila* and manages disease process. Keeping diseases under control by blocking communication between them by disease formation ensuring critical quorum sensing system inhibition with phenolic components important strategy struggle against bacteria.

Key Words: Quorum sensing system, Molecular epidemiological relationship (PFGE), *A. hydrophila*, Phenolic components

2020, 127 pages

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim esnasında bilimsel yaklaşımlarıyla bana yön veren, bilgilerine, öngörülerine, yerinde tespitlerine, tecrübelerine, değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, akademik dünyaya beni hazırlayan, onun öğrencisi olmaktan onur duyduğum, tüm birikimini cömertçe aktaran Akademianın en güçlü kadınlarından Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Doktora çalışmalarımnda değerli bilimsel yaklaşımlarını aktaran, tecrübelerini benimle paylaşan, akademik bilgilerini cömertçe aktaran, bağlı bulunduğu Anabilim Dalı'nın yeni bilimsel bilgilerini bana öğreterek tezi güçlendiren Sayın II. Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Ebru ÖNEM'e sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez araştırmalarım sırasında ve doktora öğrenimim süresince tüm akademik bilgilerini aktaran Tez İzleme Komisyonu Öğretim Üyeleri değerli Hocalarım Doç. Dr. Seçil METİN'e ve Doç. Dr. Tuğba KÖK TAŞ'a çok teşekkür ederim. Doktora eğitimim esnasında akademik anlamda destek veren Prof. Dr. Behire Işıl DİDİNEN'e çok teşekkür ederim.

1002 – TÜBİTAK – Hızlı Destek Programı Program Kodu ve Adıyla 119O671 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) kurumuna teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca ve eğitimimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli eşim Fethi FİLİK'e, dünyalar tatlısı kızımız Derin FİLİK'e ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Nurdan FİLİK
ISPARTA, 2020

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>A. hydrophila</i>	6
Şekil 2.2. <i>N</i> -acyl homoserin lakton (AHL) molekülü	8
Şekil 2.3. Bakteriyel QS sinyal moleküllerinin yapısı, sinyal moleküllerinin 3 ana molekül sınıfı; <i>N</i> -acyl homoserine laktonları, autoinducer-2 ve autoinducer peptidler	9
Şekil 2.4. <i>E. coli</i> populasyonundaki her bir bakterinin kurulmuş birer moleküler saat gibi davranarak oluşturdıkları çevreyi algılama sistemi.....	11
Şekil 2.5. <i>A. hydrophila</i> 'nın virülansından sorumlu genlerin, moleküler etkileşimlerin ve fonksiyonlarının diyagramı	14
Şekil 2.6. Bakterinin yüzeye yapışmak için EPS oluşturmaları	16
Şekil 2.7. Mikroplar şehri: biyofilm.....	16
Şekil 2.8. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü, biyofilmin scanning elektron mikroskopundaki görüntüsü	17
Şekil 2.9. Gallik asitin moleküler formülü, bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi; QS, Quorum Sensing, BF, biyofilm oluşumu; BE, biyofilmi engellemesi; MOT, hareketlilik; TOX, toksin gibi fenotipleri ve oranları	25
Şekil 2.10. Rosmarinik asitin moleküler formülü, bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi; BF, biyofilm oluşumu; MOT, hareketlilik; TOX, toksin; ENZ, enzim gibi fenotipleri ve oranları	26
Şekil 2.11. Vanilik asitin moleküler formülü, bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi; QS, Quorum Sensing BF, biyofilm oluşumu gibi fenotipleri ve oranları	26
Şekil 4.1. <i>A. hydrophila</i> 'nın koloni morfolojisi	43
Şekil 4.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarında O/F testi sonuçları.....	44
Şekil 4.3. <i>A. hydrophila</i> suşlarında vibriostat testi sonuçları	44
Şekil 4.4. <i>A. hydrophila</i> suşlarında katalaz testi sonuçları.....	44
Şekil 4.5. <i>A. hydrophila</i> suşlarında sitokrom oksidaz testi sonuçları	45
Şekil 4.6. Sırayla orijinal <i>A. hydrophila</i> suşu: krem pigmentli koloni, negatif sonuç; <i>Pseudomonas sp.</i> pembe pigmentli koloni ve pozitif sonuç; <i>Aeromonas sp.</i> sarı pigmentli koloni	49
Şekil 4.7. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen negatif kontrol suşu <i>Pseudomonas spp.</i>	49
Şekil 4.8. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 referans suşu	50
Şekil 4.9. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen <i>A. hydrophila</i> AHJ suşu	50
Şekil 4.10. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen <i>A. hydrophila</i> AH SAHA suşu.....	50
Şekil 4.11. <i>A. hydrophila</i> AH 216 suşunun KF30 ve CN10'a duyarlılığı, E15, K30, PT15, TY15, OX1'e karşı direnci	55
Şekil 4.12. <i>A. hydrophila</i> AH 220 suşunun antibiyogram sonucu	55
Şekil 4.13. <i>A. hydrophila</i> AH 108 suşunun CN10'a duyarlılığı ve P10'a direnci	56
Şekil 4.14. <i>A. hydrophila</i> AH 217 suşunun ENR5'e, FLM30'a duyarlılığı ve T30'a, SXT25'e direnci	56
Şekil 4.15. <i>A. hydrophila</i> AH 217 suşunun antibiyogram sonucu	56

Şekil 4.16. AH RSKK 05049 suşunda 16S, <i>ahyI</i> , <i>ahyR</i> genleri jel görüntüsü	58
Şekil 4.17. <i>ahyI</i> geni jel görüntüsü.....	59
Şekil 4.18. <i>ahyR</i> geni jel görüntüsü	59
Şekil 4.19. Kristal viyole ile boyanma sonrası <i>A. hydrophila</i> suşlarının ependorfta biyofilm oluşumu	60
Şekil 4.20. <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 referans suşunun biyofilmi (üst) ve sırayla GA, RA ve VA fenoliklerinin biyofilm inhibisyonu (alt).....	61
Şekil 4.21. <i>A. hydrophila</i> AH 220 suşunun biyofilmi (üst) ve sırayla GA, RA ve VA fenoliklerinin biyofilm inhibisyonu (alt).....	61
Şekil 4.22. <i>A. hydrophila</i> AH 230 suşunun biyofilmi (üst) ve sırayla GA, RA ve VA fenoliklerinin biyofilm inhibisyonu (alt).....	62
Şekil 4.23. <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966, AH 2 ve AH 219 suşlarının kanlı agarda β - hemolitik aktivite oluşturmaları.....	64
Şekil 4.24. A. <i>A. hydrophila</i> AH ATCC 7966 suşunun kanlı agarda 17 mm hemoliz zonu ve B. AH ATCC 7966 suşunda GA-KA'da 12 mm zonla 5 mm'lik hemoliz inhibisyonu	65
Şekil 4.25. A. <i>A. hydrophila</i> AH 219 suşunun kanlı agarda 17 mm hemoliz zonu ve B. AH 219 suşunda GA-KA'da 0 mm zonla 17 mm'lik hemoliz inhibisyonu.....	65
Şekil 4.26. A. <i>A. hydrophila</i> AH S suşunun kanlı agarda 13 mm hemoliz zonu ve B. AH S suşunda GA-KA 0 mm zonla 13 mm'lik hemoliz inhibisyonu. 65	65
Şekil 4.27. A. <i>A. hydrophila</i> AH 12.1 suşunun kanlı agarda 24 mm hemoliz zonu ve B. AH 12.1 suşunda RA-KA 19 mm zonla 5 mm'lik hemoliz inhibisyonu.....	66
Şekil 4.28. A. <i>A. hydrophila</i> AH ATCC 7966 suşunun kanlı agarda 17 mm hemoliz zonu ve B. AH ATCC 7966 suşunda VA-KA'da 0 mm zonla 17 mm'lik hemoliz inhibisyonu	66
Şekil 4.29. A. <i>A. hydrophila</i> AH 113 suşunun kanlı agarda 12 mm hemoliz zonu ve B. AH 113 suşunda VA-KA'da 0 mm zonla 13 mm'lik hemoliz inhibisyonu.....	66
Şekil 4.30. Kantitatif analiz için %2 yıkanmış koyun eritrositi içeren PBS ile karıştırılan ve buzda bekletilmek üzere hazırlanan <i>A. hydrophila</i> AH ATCC 7966 suşunun hemoglobin miktarı tespiti için santrifüje hazırlanması	68
Şekil 4.31. <i>A. hydrophila</i> suşlarının elastolitik aktivite ölçümü	70
Şekil 4.32. VA'nın <i>A. hydrophila</i> suşlarında elastolitik aktivite üzerine etkisi.....	70
Şekil 4.33. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH ATCC 7966 ve AH RSKK 05049 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi.....	73
Şekil 4.34. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH SAHA ve AH S suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	74
Şekil 4.35. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH J ve AH 2 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	74
Şekil 4.36. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 3 suşunda biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	74

Şekil 4.37. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 4 ve AH 12.1 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	75
Şekil 4.38. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 14 ve AH 15 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	76
Şekil 4.39. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 16 ve AH 108 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	76
Şekil 4.40. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 113 suşunda biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	76
Şekil 4.41. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 216 ve AH 217 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	77
Şekil 4.42. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 219 ve AH 220 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	78
Şekil 4.43. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 222 ve AH 230 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi	78
Şekil 4.44. Negatif kontrol ve GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 232 suşunda biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi.....	78
Şekil 4.45. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH ATCC 7966, AH RSKK 05049, AH SAHA, AH S, AH J, AH 2 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi	79
Şekil 4.46. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 3, AH 4, AH 12.1, AH 14, AH 15, AH 16 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi	80
Şekil 4.47. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 108, AH 113, AH 216, AH 217, AH 219, AH 220 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi	80
Şekil 4.48. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin <i>A. hydrophila</i> AH 222, AH 230, AH 232 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi	80
Şekil 4.49. <i>A. hydrophila</i> suşlarının PFGE dendrogram görüntüsü.....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. PFGE profillerini yorumlama kriterleri	28
Çizelge 3.1. Farklı koleksiyonlardan elde edilen <i>A. hydrophila</i> suşları	30
Çizelge 3.2. <i>A. hydrophila</i> suşlarını araştırmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler	31
Çizelge 4.1. <i>A. hydrophila</i> suşlarında fenotipik identifikasyon	45
Çizelge 4.2. TSA, Aeromonas Isolation Agar Base, GSP, Kanlı Agar besiyerlerindeki <i>A. hydrophila</i> suşlarının koloni profillerinin <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 referans suşuyla desteklenmesi.....	47
Çizelge 4.3. <i>A. hydrophila</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	52
Çizelge 4.4. Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.....	54
Çizelge 4.5. <i>ahyI</i> ve <i>ahyR</i> genlerine sahip olan suşlar	57
Çizelge 4.6. Suşların UV-Spektrofotometre Sonuçları	58
Çizelge 4.7. <i>A. hydrophila</i> suşlarının biyofilm virülansı ve biyofilm inhibisyon sonuçları.....	63
Çizelge 4.8. <i>A. hydrophila</i> suşlarının β -hemolitik aktivite zon çaplarının mm ölçüm sonuçları.....	67
Çizelge 4.9. <i>A. hydrophila</i> suşlarının β -hemolitik aktivitesi ve β -hemolitik aktivitesinin inhibisyon sonuçları	69
Çizelge 4.10. <i>A. hydrophila</i> suşlarının elastolitik aktivitesi ve elastolitik aktivitesinin inhibisyon sonuçları.....	72
Çizelge 4.11. PFGE sonucu belirlenen pulsotipler	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AHL	<i>N</i> -butanoyl-L-homoserin lakton
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute
dk	Dakika
EPS	Extracellular Polymeric Substance (Ekstraselüler Polimerik Substant)
g	Gram
GA	Gallik Asit
GA-KA	Gallik Asit İçeren Kanlı agar
GSP	<i>Pseudomonas Aeromonas</i> Selective Agar Base
l	litre
LD ₅₀	Öldürücü Doz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH	Hidrojen gücü
PI	Patojenite adaları
QQ	Quorum Quenching
QS	Quorum Sensing (Çevreyi Algılama)
QSI	Quorum Sensing İnhibitörü (Çevreyi Algılama İnhibitörü)
RA	Rosmarinik Asit
RA-KA	Rosmarinik Asit İçeren Kanlı agar
Rpm	Round Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SAM	S-adenozil metiyonin
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
Taq Poly	<i>Thermus aquaticus</i> , DNA polymerase I, thermostable
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Ünite
VA	Valinik Asit
VA-KA	Vanilik Asit İçeren Kanlı agar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

1. GİRİŞ

Bakteriler arası iletişimin temeli “Sanırım bir bakteri topluluğu, birkaç bakteriden daha güçlü ve bu nedenle birçok engeli aşabiliyorlar” yorumu ile “Çevreyi Algılama” (Quorum Sensing, QS)’in dolaylı olarak ilk tanımının yapılmasıyla olmuştur (Smith, 1905). İşte bu sözlerden yıllar sonra, yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirileri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir. Günümüzde bakterilerin sinyal moleküllerini kullanarak, genlerinin alt gruplarını senkronize edip birlikte hareket edebildikleri bilinmektedir.

Çevreyi algılama sistemlerinin belirlenmesi ile bakterilerin sinyal moleküllerini kullanarak biyofilm oluşturdıkları, antibiyotiklere direnç geliştirdikleri, kronik enfeksiyonlara neden oldukları gösterilmiştir (Fuqua vd., 1994).

Çevreyi algılama sisteminin ayrıntılı olarak açıklandığı ilk çalışma *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* bakterileri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Denizde yaşayan biyoluminesans bakterisi *V. fischeri* sıvı kültürlerde geliştirilmiş ve ışık oluşumunun yalnızca ortamdaki bakteri sayısının çok fazla olduğu yoğunluklarda meydana geldiği gözlemlenmiştir (Greenberg, 1997). Bu çalışma, bugün diğer çevreyi algılama sistemlerine örnek olan, *V. fischeri*’deki çevreyi algılama mekanizmasının esas modelini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca bu çalışmada çevreyi algılama sistemi sinyal molekülü olan *N*-3-okso-hekzanoil-L-homoserin lakton bulunmuştur (Önem, 2013).

Bunu takip eden yıllarda, *N*-acyl homoserin lakton (AHL)’ye bağlı çevreyi algılama mekanizmalarının sadece *V. fischeri* ve *V. harveyi* bakterileriyle sınırlı olmadığı birçok bakteri türünde bu moleküllerin bilinen 50’den fazla örneğinin var olduğu ortaya konmuştur (Gray ve Garey, 2001). 1990 ların başlarında bir grup araştırmacı (Bainton vd., 1992) karbapenem antibiyotiklerini üretemeyen *Erwinia carotovora* mutantlarda eksik genlerin tespiti üzerine çalışmıştır. Mutant gruplarından antibiyotik üretemeyen grup ikinci bir mutant grubuyla birlikte besi ortamına karbapenemi üretebildiklerini tespit etmişlerdir. Araştırmalar sonunda ikinci gruptaki mutantların birinci grupta antibiyotik üretimini tetikleyen bir “sinyal molekülü” sentezlediğini anlamışlardır. Çalışmada ilginç olan mutant bakteride görülen sinyal molekülünün *V. fischeri*’de ışık oluşumunu tetiklemek için kullanılan sinyal

molekölü ile aynı olması olup bu çalışma çevreyi algılama sisteminin farklı bir yönünün ortaya çıkmasını sağlamıştır (Bainton vd., 1992; Önem, 2013). Daha sonra bu konu üzerine yapılan birçok çalışma da farklı organizmalarda çok fazla sayıda çevreyi algılama sistemi olduğu tanımlanmıştır (Winson vd., 1995; Önem, 2013).

Günümüzde çevreyi algılama sistemini kullanan birçok bakteri türünün sosyal bir davranış sergilediği, üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleri ile iletişim kurduğu, belirli bir çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlediği ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülans faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklediği ispatlanmıştır. Bakterilerin konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyaramayarak başarılı bir hastalık sürecini oluşturduğu görülmüştür (Saraçlı, 2006). Bu nedenle biyoteknolojik çalışmalar artık sistemin en önemli parçası ve iletişimi başlatan molekül olan AHL ve AHL antagonistlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Balık hastalıklarının tedavisinde bu tip moleküllerin kullanımı, bakteriler arası haberleşmenin bloke edilerek virülansın azaltması ve dolayısıyla hastalıkların kontrolüne fırsat verecek yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülmektedir.

A. hydrophila'nın çevreyi algılama sistemi üzerine fenolik bileşiklerle inhibisyon etkisinin araştırılması bu fırsatçı patojene karşı antibiyotik gereksinimini azaltarak doğal maddelerin kullanımını esas almaktadır. Çevreyi algılama sisteminin virülans faktörlerinin regülasyonundan sorumlu olmasından dolayı bu sistemin inhibisyonu sağlanarak bakterilerle mücadelede yeni profilaktif stratejileri gündeme gelmektedir. Bu amaçla çevreyi algılama sisteminde önemli rolü olan açıl homoserin lakton moleküllerinin analogları çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine denetlenmektedir. Bu çalışma ile balıklarda önemli bir patojen olan *A. hydrophila*'da virülans sorumlu olan ve üretimi çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen bazı virülans faktörleri ile biyofilm oluşumunun inhibisyonu bazı fenolik bileşikler (gallik asit, vanilik asit, rosmarinik asit) kullanılarak araştırılmıştır.

A. hydrophila ve hareketli *Aeromonas*'ların patojenitesi, üretmiş oldukları sitotoksik (β -hemolisin) ve sitotonik (kolera benzeri) enterotoksinlerden kaynaklanan ekzotoksin üreten önemli bir patojen olması nedeni ile balıklarda hastalık oluşturarak yüksek mortalite göstermektedir. Balık ölümlerine neden olan *A. hydrophila*

suşlarının farklı bölgelerdeki epidemiyolojik ilişkinin ortaya konulması patojenin orjini ve yayılımı hakkında bilgi verecektir. Bu anlamda suşlar arasındaki klonal ilişkinin pulsed field jel elektroforez yöntemiyle belirlenmesi salgınların belirlenmesi ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Bu araştırmanın amacı patojenik bir bakteri olan *A. hydrophila* suşlarında çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki virülans faktörlerinin oluşumundan sorumlu olan *ahyI* ve *ahyR* genlerinin varlığının saptanması, *A. hydrophila* suşlarında çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivitenin bazı fenolik bileşenlerle (gallik asit, rosmarinik asit ve vanilik asit) inhibisyonunun araştırılması ve *A. hydrophila* suşları arasındaki moleküler epidemiyolojik ilişkinin incelenmesidir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Çevreyi Algılama (Quorum Sensing)

Çevreyi algılama sistemi bakteriye hayatına devam etmesi için güç katan bir sistemdir (Chu vd., 2015). Bakteriler sosyal bir davranışla, üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir yoğunluğa ulaşmış olduklarını izlemekte ve yeter yoğunluğa ulaştıkları anda da virülans faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylelikle, bakteri eşik değere ulaşmadan immun sistem kendisini fark etmeden önce biyofilm oluşturarak konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyarmayarak başarılı bir hastalık sürecini oluşturmaktadır (Saraçlı, 2006). Bakterilerde çok fazla sinyal molekülü tanımlanmış olup Gram negatif bakterilerde yaygın olarak *N*-Acyı homoserin lakton sinyal molekülü adı verilen moleküller görülmektedir. Fırsatçı bir patojen olan *A. hydrophila*'da çevreyi algılama sistemini, virülans faktörleri üretmek, biyofilm oluşumunu sağlamak gibi hastalıkların patogeneğinde önemli rolü olan olayların düzenlenmesinde kullanır (Anguita vd., 1993).

Bakteri-bakteri iletişim ile popölasyon yoğunluğuna bağılı iletişim mekanizması çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılmakta ve pek çok bakteri cinsinde görülmektedir. Bakteriler arasındaki bu iletişimin temeli, bakterilerin bulundukları ortama otouyarıcı (AI) sinyal molekülü olarak adlandırılan birtakım maddeleri sentezlemeleri ve sentezlenen bu maddelerin yoğunluğu ile ortamdaki popölasyon yoğunluklarını algılayabilmeleri ve bunun neticesinde de sinyal moleküllerinin özel genlerin ekspresyonun da rol oynamasına dayanmaktadır. (Lerat ve Moran, 2004). Bakterilerde bu şekliyle yüzlerce kolektif davranış mevcuttur, fakat bunlar içerisinde en önemli olanı virülans faktörlerinin sentezidir (Henke ve Bassler, 2004).

Fırsatçı bir patojen olan *A. hydrophila*'da çevreyi algılama sistemiyle virülans faktörleri üretmek, biyofilm oluşturmak, proteaz aktivitesi gibi hastalığın patogeneğinde önemli rolü olan olayları düzenler. Çevreyi algılama sisteminin bakterilerin virülans faktörlerinin regölasyonundan sorumlu olduğunun keşfinden sonra bakterilerle mücadelede yeni profilaktif stratejiler olarak bu sistemin

inhibisyonunun sağlanması önem kazanmıştır (Xavier ve Bassler, 2003; Henke ve Bassler, 2004; Önem, 2013).

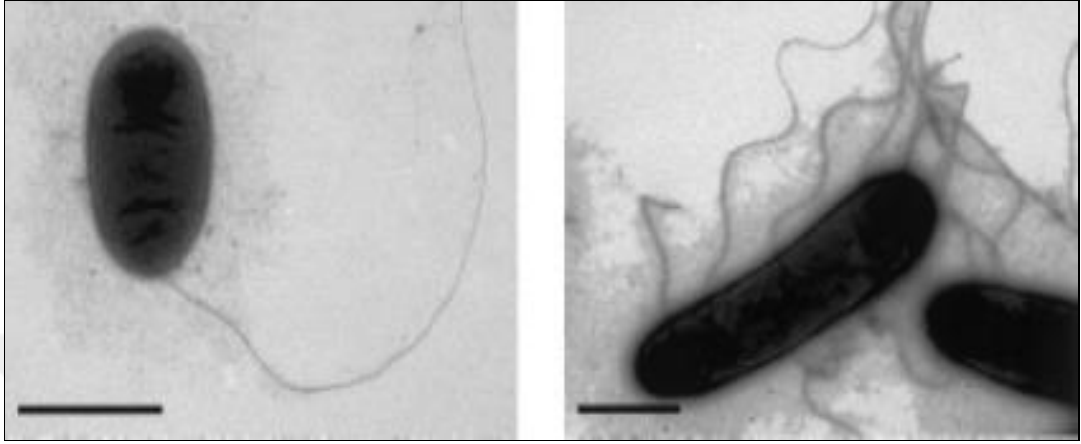
Bakterilerin her geçen gün antibiyotiklere gösterdikleri direnç ve özellikle bu direncin bakterilerde görülen bazı mekanizmalar dışında biyofilm oluşumu ile de artıyor olması bakterilerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Biyofilm oluşumunun enfeksiyöz hastalıkların %80'inden sorumlu olması ve etkin bir tedavinin gerçekleştirilmesini engellemesi nedeniyle çevreyi algılama sistemi kontrolünde gerçekleşen biyofilm oluşumunun inhibisyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bakteri kökenli enfeksiyonlarda enfeksiyona neden olan virülans faktörlerinin çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol ediliyor olması, çalışmaları bu sistemin inhibisyonu üzerine yoğunlaştırmıştır. Bu amaçla sistemin inhibisyonu üzerine çok fazla sayıda sentetik molekül taranmaktadır. Bununla birlikte *A. hydrophila* kaynaklı balık enfeksiyonlarında mücadelede çalışılan suşların moleküler epidemiyolojik olarak tanımlanmasıyla olası bir bulaşının ortaya konarak etken ile savaşta başarı artacaktır.

2.2. *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila (Şekil 2.1) Gram negatif, çubuk şekilli, fırsatçı, hareketli, spor oluşturmeyen, sitokrom oksidaz pozitif, O/F glukoz testinde fermentatif reaksiyon veren, Vibriostat (O/129) testine dirençli, fakültatif anaerobik bir bakteridir (Hazen vd., 1978; Aoki, 1999; Rey vd., 2009; Laith ve Najiah, 2013; Austin ve Austin, 2016). *A. hydrophila* Tryptik Soy Agarda (TSA) pürüzsüz, dışbükey, yuvarlak formda ve krem renkli koloniler oluşturur (Abbott vd., 2003; El-Fatlawy ve El-Hadrawy, 2014). Bu bakteri, ılık iklimlerde, dünya genelinde tatlı, acı su, deniz, nehir, klor ve klorsuz su kaynaklarında yüksek miktarlarda bulunur (Hazen vd., 1978; Kaper vd., 1980; Van der Kooj, 1988). Bakteri 28°C'de optimal gelişirken, ancak aynı zamanda 4°C ile 37°C aralığında yaşayabilir (Agger vd., 2018). Bu bakteri jelatin, hemoglobin ve elastin gibi maddeleri sindirebilir (Mathewson ve Dupont, 1992).

A. hydrophila hem balıklarda (Santos vd., 1998; Rehulka, 2002) hem de insanlarda hastalık oluşturan zoonoz bir bakteridir (Werner ve Rutherford, 1990; Bottarelli ve

Ossiprandi, 1999; Lehone ve Rawlin, 2000; Davies vd., 2001; Castro, 2002). *Aeromonas* türleri balıklarda Hareketli *Aeromonas* Septisemi (Motile *Aeromonas* Septisemisi, MAS) hastalığına neden olur ve ciddi mortaliteyle sonuçlanır (Austin ve Austin, 2016).



Şekil 2.1. *A. hydrophila* (Gavin, 2002)

2.2.1. Genom yapısı

A. hydrophila suşu ATCC 7966^T suşunun genomunun tamamı bilinmektedir (Seshadri vd., 2006). Genom, %61.5 GC içeriği olan single circular 4.744.448 bp kromozomdan oluşur (Seshadri vd., 2006; NCBI Genome Project, 2006). Tüm genom 4.122 protein kodlayan gen ve 159 RNA geninden (128 tRNA genleri ve 30 rRNA genleri) oluşur (Grigoriev vd., 2012; Nordberg vd., 2014). *A. hydrophila* ATCC 7966^T'nin tüm genom dizisi, bu patojenin kimliğini açıklar, ortamda büyümesini sağlar, virülansını oluşturur, tüm hayatsal mekanizmasını yönetir, oksijensiz ortamda hayatta kalabilmesini sağlar, insanlarda ve balıklarda kolonileşerek hastalığa neden olmasını yönetir (Seshadri vd., 2006).

2.2.2. Hücre yapısı ve metabolizması

A. hydrophila'nın biyosentetik yetenekleri kapsamlıdır. Krebs döngüsüne (TCA cycle) biyosentetik reaksiyonlarıyla katılmaktadır (Seshadri vd., 2006).

2.2.3. *A. hydrophila* patogenezi

A. hydrophila hem balıklarda hem de insanlarda hastalıklara neden olur (Seshadri vd., 2006). *A. hydrophila* yapısı nedeniyle çok toksiktir. Bilim adamları *A. hydrophila*'nın patojenik bir bakteri olduğunu ispatlamışlardır (Seshadri vd., 2006). Polar flagella *A. hydrophila*'nın yüzeye tutunmasını lateral flagella ise kolonizasyonunu gerçekleştirir (Al-Fatlawy ve Al-Hadrawy, 2014). *A. hydrophila* bir polar flagellum tarafından harekete geçer. Doku hasarına neden olan aerolisin sitotoksik enterotoksin üretir (Agger vd., 2018). Balık veya insan vücuduna girdiğinde kan dolaşımıyla organlara geçer. Tip II salgı sistemiyle Act toksini üretilir ve salgılanır. Toksin, hücreye güçlü reseptörlerle bağlanır, hücre yüzeyinde heptamerik porlar oluşturur, oligomerizasyonu başlatır, hücre ölümü ve sonuçta doku tahribatına neden olur. *A. hydrophila* bağışıklığı zayıf balıkları anında enfekte eder (Albert vd., 2000; Chopra vd., 2000). Yakın zamanda çalışılan Tip III sekresyon sistemi (TTSS) *Aeromonas* patogenezinin tanımlanmıştır. TTSS, virülans faktörlerini konak hücreye istila eder. Patojenik bakteriler tarafından salgılanan ve TTSS yoluyla transloke edilen virülanslar hücre hasarını ve apoptozunu (programlı hücre ölümünün) gerçekleştirilmesinden sorumlu olan efektör moleküllerdir. Bu virülanslar ve toksinler, balıkta hastalığa neden olan patojenik *A. hydrophila*'da tespit edilmiştir (Snower vd., 1989). Tip IV pilinin tutunması, ekstraselüler proteazın dokulara zarar vermesi, kapsülünün toksik yetenekleri, polar ve lateral flagella gibi tüm virülans faktörleri hücrenin elemanlarını yok etmeye ve hücreleri öldürmeye odaklıdır (Seshadri vd., 2006; Al-Fatlawy ve Al-Hadrawy, 2014). *Aeromonas* türlerinin patojenitesi, aerolizin, lipaz, kitinaz, amilaz, jelatinaz, hemolisin ve enterotoksin gibi bir dizi ekstraselüler protein tarafından gelişir. Bununla birlikte patojenik mekanizmaları hala araştırılmaktadır (Snower vd., 1989).

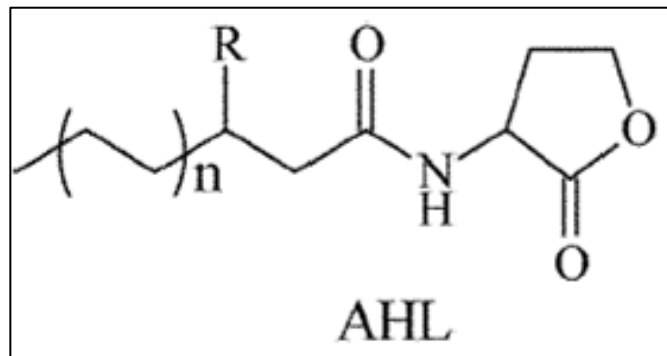
2.3. Hareketli *Aeromonas* Septisemisi (MAS)

A. hydrophila balıklarda hemorajik septisemi ile seyreden ve ağır kayıplarla sonuçlanan MAS enfeksiyonuna neden olur (Austin ve Austin, 2016). Hareketli *Aeromonas* Septisemisi "Red Fin Disease", "Red Pest", "Infectious Abdominal Dropsy" adlarıyla da bilinmektedir ve literatürlere geçmiştir (Roberts ve Shepherd, 2001; Öztürk ve Altınok, 2014). MAS genellikle balıklarda fırsatçı veya sekonder

patojen olarak düşünülse de *A. hydrophila*'nın mortalite ve salgınlarda primer etken olduğu belirlenmiştir (Pathiratne vd., 1994; Yambot, 1998; Nielsen vd., 2001; Fang vd., 2004; Xia vd., 2004). Bu bakteri 1-2 hafta gibi kısa bir sürede %80-100 ölüm oranıyla sonuçlanan hastalık salgınları oluşturmaktadır (Lukistyowati, 2012; Kusdarwati vd., 2017; Christy vd., 2019). MAS hastalığının en önemli semptomları balıklarda deri ve kaslarda kanama, karaciğer, böbrek ve dalakta hiperemi, iç organlarda doku kaybı, ülserler, yüzgeç kaybı, epidermiste hiperplazi, ağız çevresinde erozyonlar, periorbital ödem, ekzoftalmus, dropsi olarak görülmektedir (Mancini vd., 1997; Erer, 2002; Sağlam vd., 2006).

2.4. *A. hydrophila*'da Çevreyi Algılama Sistemi

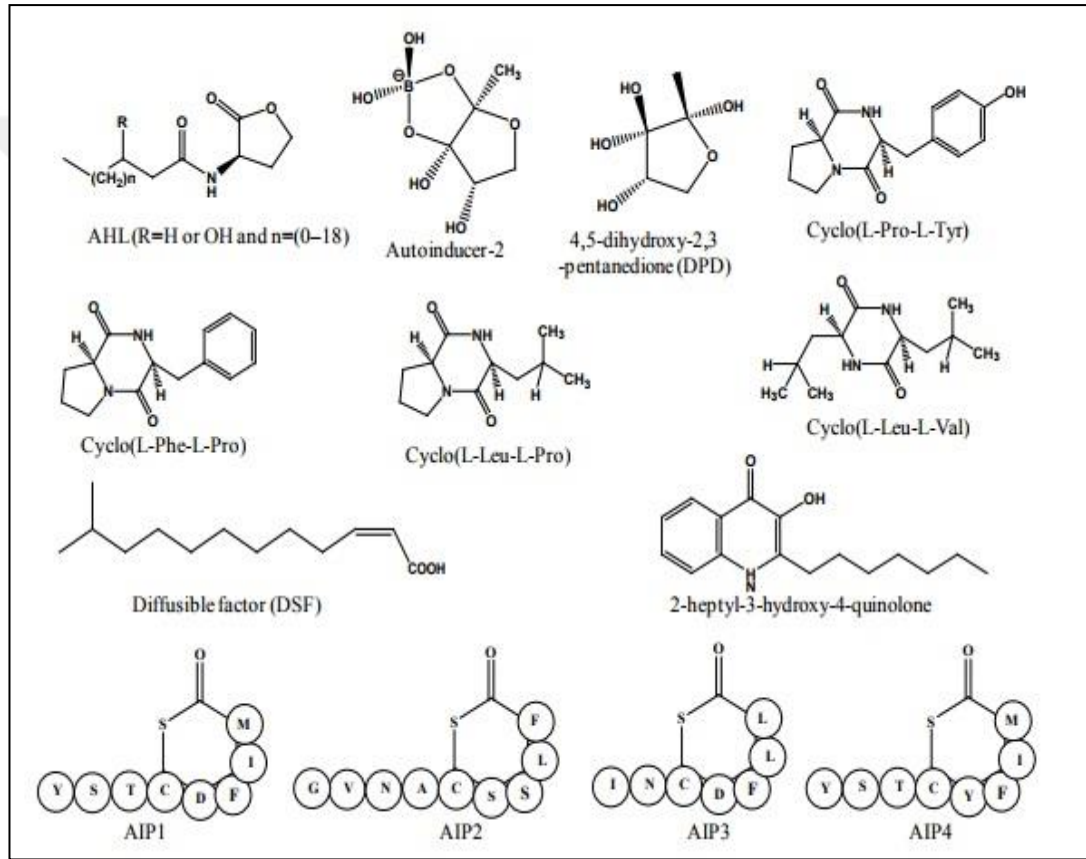
Çevreyi Algılama Sistemi bakteri-bakteri arasındaki iletişim mekanizması olup, *N*-acyl homoserin lakton (AHL) molekülleri (Şekil 2.2) aracılığıyla bakterilerin yeterli sayıda çoğunluğa ulaştıklarını anladıkları anda virülans faktörleri gibi kritik gen ekspresyonlarını tetikledikleri ve hastalığı oluşturdıkları bir süreçtir (Boşgelmez-Tınaz, 2003). Böylelikle, konakta hastalık oluşturabilecek yeterli çoğunluğa ulaşıncaya kadar bağışıklık sistemi tarafından patojen bakterinin fark edilmemesi sağlanarak başarılı bir hastalık süreci oluşturulur (Jayaraman ve Wood, 2008). QS sistemi hiyerarşik bir QS döngüsü tarafından kontrol edilir (Zhu ve Winans 2001).



Şekil 2.2. *N*-acyl homoserin lakton (AHL) molekülü (Dong ve Zhang, 2005)

Günümüzde bakterilerin asosyal olmadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemlerini kullandıkları kabul edilmektedir (Swift vd., 1994).

Çevreyi algılama, bakterinin autoinducer veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerini üreterek kendi hücre yoğunluğunu bakteriye izleten bir sistemdir (Şekil 2.3). Virülans faktörlerinin üretimi, lag fazından çıkma, ekzoenzimlerin üretimi, bazı pigment üretimleri, plazmidlerin konjugasyonla transferi, sporulasyon, toplu kaçış, konjugasyon, hücre bölünmesi, biyoluminesens, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu, konjugasyon gibi bakteriyel hayati fonksiyonlar bu sistemle yönetilmektedir (Fuqua vd., 1994; Hardman vd., 1998; Boşgelmez-Tınaz, 2003; Bruhn vd., 2005; Sequences, 2008).



Şekil 2.3. Bakteriyel QS sinyal moleküllerinin yapısı, sinyal moleküllerinin 3 ana molekül sınıfı; *N*-acyl homoserine laktonları, autoinducer-2 ve autoinducer peptidler (Lade vd., 2014)

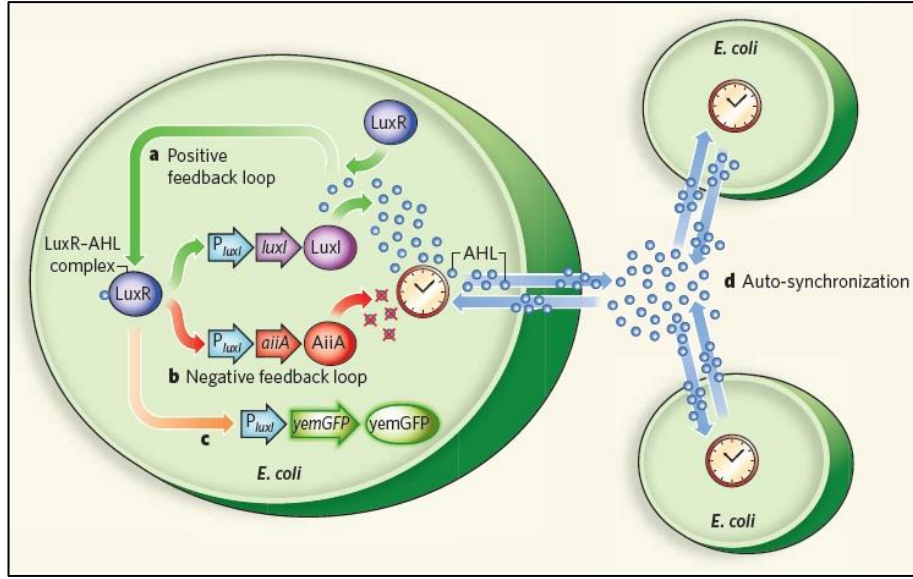
Gram (-) çubuk şekilli bakterilerde otoindüksiyon (örneğin AHL molekülü) bir bakteri tarafından LuxI kimyasal reaksiyon ürünleri aracılığıyla sentezlenir ve salınır. Başka bir bakterinin LuxR kimyasal reaksiyon ürünü cevap vererek reseptör proteinine bağlanır ve AHL molekülünü algılar (örneğin *A. hydrophila*). Gram pozitiflerde sinyal molekülü AIP'dir. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin her ikisinde de taşıyıcı LuxS/Lsr'dir. Otoindüksiyon sentezlenir LuxS ile ilgili kimyasal

reaksiyon ürünleri aracılığıyla salınır ve bakteri ayrıca Lsr taşıyıcısı aracılığıyla yeniden kaydeder ve genlerin düzenlenmesini yapar (Raffa vd., 2005).

A. hydrophila'daki AHL ile *Escherichia coli* *QseB* ve *QseC* gen sistemi arasında türler arası iletişimde söz konusudur (Kozlova vd., 2012; Sarkodie vd., 2019).

E. coli bakterisi *QseB* ve *QseC* gen sistemleriyle bakteri iletişimine cevap vermek ve virülans faktörlerini sentezlemek için kullanır. *QseC*'nin engellenmesinin, tür içi iletişimi keser ve virülansı önemli ölçüde azaltır (Kostakioti vd., 2009). En yaygın Autoinducer molekülleri *N*-acylhomoserin laktone (AHLs) molekülleridir ve bu sinyalleşme mekanizması birçok literatürle kanıtlanmıştır (Haque vd., 2018). *A. hydrophila*'da bu autoinducer moleküllerden biri olan çevreyi algılama sistemi yönetimindeki *N*-acylhomoserin lakton (AHL) molekülleriyle iletişim olduğu gibi *A. hydrophila*'da *QseB* ve *QseC* sistemi de vardır. *A. hydrophila*'daki AHL ile *QseB* ve *QseC* gen sistemi arasında cross talk yani türler arası iletişimde söz konusudur. *A. hydrophila*'da autoinducerler Al-1, Al-2 ve AL-3 sistemleri birbirleriyle koordine halinde biyofilm oluşumundan sorumludur. *A. hydrophila*'nın klinik suşlarının çevreyi algılama virülans faktörlerini düzenlemesinde *QseB* ve *QseC* genleri de etkilidir (Kozlova vd., 2012; Sarkodie vd., 2019).

E. coli popülasyonundaki her bir bakteri diğer bakterilerle tıpkı arkadaş gibi aynı anda çalışma prensibine göre hızlı bir şekilde çaprazlama olarak birlikte hareket edebilmekte ve ayarlanmış moleküler saat gibi davranarak proteinleri ve genlerinden bir network (şebeke, ağ) kurgulamaktadır (Fussenegger, 2010). *E. coli* popülasyonundaki haberleşme Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. *E. coli* populasyonundaki her bir bakterinin kurulmuş birer moleküler saat gibi davranarak oluşturdukları çevreyi algılama sistemi (Fussenegger, 2010)

2.5. *A. hydrophila*'da Çevreyi Algılama Sistemi Yönetimindeki Virülans Faktörleri

Virülans, bir bakteri grubu veya türü içerisinde patojenitesinin derecesini tanımlamaktadır. Bakterinin hastalığı başlatması (infektivite) ve bu hastalığın şiddeti (derecesi) olmak üzere genel anlamda iki özelliği kapsamaktadır. Bu özellikler göz önüne alındığında patojen bir tür içerisinde az, orta ve çok virulent suşlar bulunabilmektedir (Gülay, 2010).

Bakterinin virülansı genomda bulunan patojenite adaları (PI) denilen özel bölgelerde ve plazmidlerde kodlanan virülans genleri ile düzenlenir. Başka bir deyişle bakteri genomunda virülansstan sorumlu genlerin yer aldığı DNA segmentidir (Tendolkar vd., 2003; Shankar vd., 2006; Upadhyaya vd., 2009).

Aeromonas sp. türlerinde virülans faktörleri yüksek bakteri yoğunluğuna bağlı olarak çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki genlerin ekspresyonuyla ortaya çıkar (Jangid vd., 2007). *A. hydrophila*'nın virülans seviyesi, ürettiği toksinlere bağlıdır (Rahman vd., 1997).

Virölans faktör üretimi bakteride genetik düzeyde regüle edilir. DNA düzeyindeki regülasyonun büyük kısmı spesifik virölans faktörleri kodlayan gendeki yeniden düzenlemeleri, promotor veya diğer regülatör elemanları içeren genlerdeki değişimleri veya yeniden düzenlemeleri içerir (Woods, 2004). Virölans faktörlerinin üretimindeki farklılığın olası bir mekanizması; virölans faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyonunun, kompleks bir düzenleyici gen ağı ile farklı çevresel uyarılara yanıt olarak düzenlenmesidir (Pier, 2007).

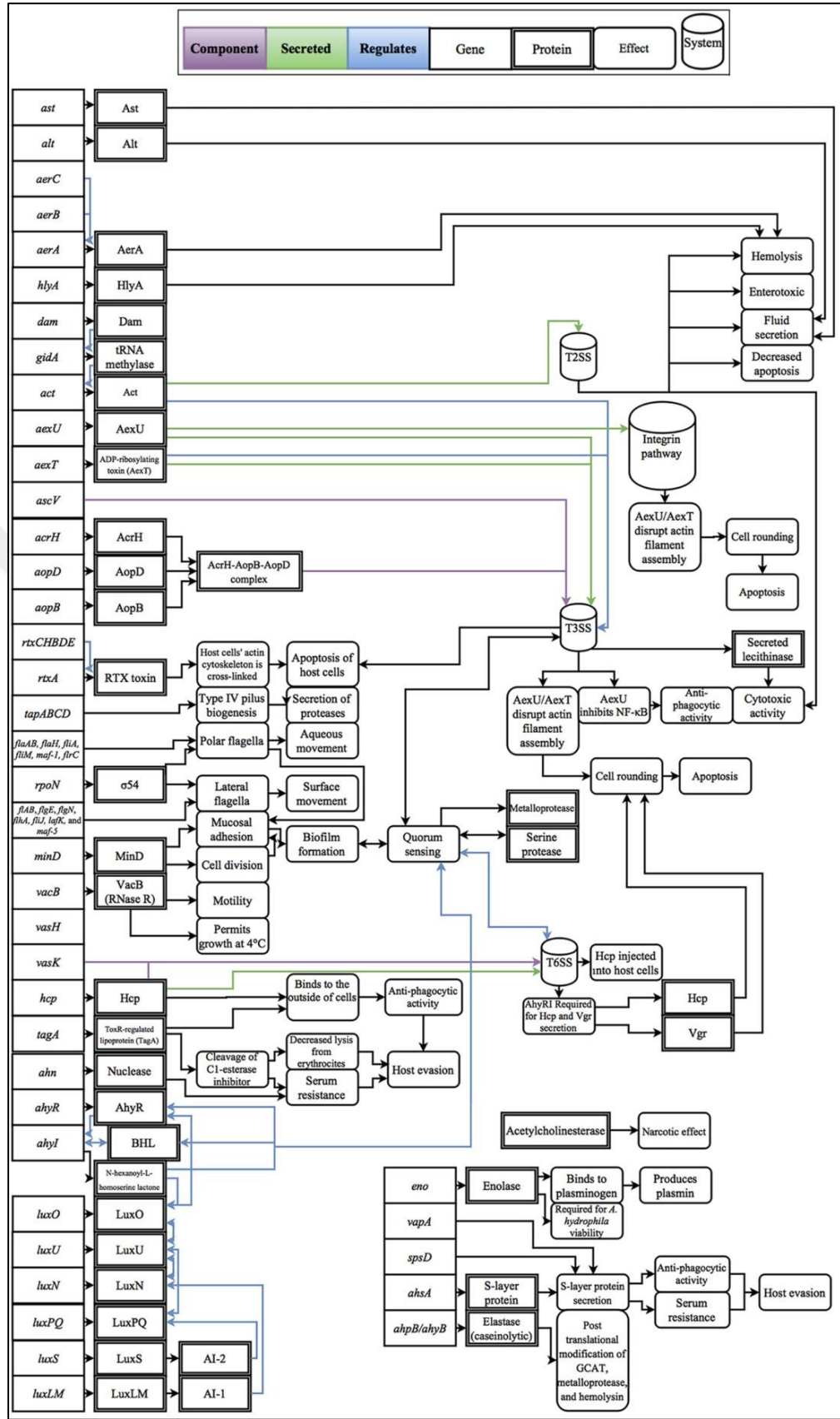
A. hydrophila AHL molekülleri aracılığıyla çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki virölanslar hemolizinler, sitotoksinler, enterotoksinler, proteazlar ve dermonekrotik faktörlerdir (Şekil 2.5) (Angka, 1990; Mateos vd., 1992; Rodrigues vd., 1992a; Rasmussen-Ivey vd., 2016). *A. hydrophila*'nın dermonekrotik faktörlerinin balık ölümleri üzerindeki etkileri kanıtlanmıştır (Leblanc vd., 1981). Hasta balıklardaki *A. hydrophila*'nın tespiti için elastaz önemli taksonomik bir kriterdir (Santos vd., 1988).

Aeromonas spp. a-hemolizin (Ljungh vd., 1981), hemoaglutinasyon (Burke vd., 1984), glisero-fosfolipid-kolesterol acyltransferaz (MacIntyre ve Buckley 1978), lipaz (Anguita vd., 1993), yüzey adezinleri (fimbria) (Baylan ve Yılmaz, 2004), metalloproteaz (Swift vd., 1999) ve serine proteaz (Whitby vd., 1992) içeren bir dizi virölans mekanizmalarına sahiptir. *A. hydrophila*'da AHL molekülü olan (*N*-butanoyl-L-homoserin lakton [BHL]) *LuxRI* homologu *AhyRI* geniyle kodlanmaktadır ve serine proteaz üretimini çevreyi algılama sistemiyle üretmektedir (Swift vd., 1997).

A. hydrophila'da çevreyi algılama sinyal moleküllerinden BHL ve OdDHL molekülleri aracılığıyla ramnolipid, proteaz, amilaz, hemoliz, elastaz gibi çevreyi algılama sistemi tarafından yönetilen balıklarda hastalık oluşturan tehlikeli virölans faktörlerini üretmektedir (Filik ve Kubilay, 2020).

A. hydrophila'nın virölans seviyesi, ürettiği toksinlere bağlıdır. *A. hydrophila* enfeksiyonunun patojenitesi sitotoksinler, proteazlar, S tabakaları ve aerolysin gibi çeşitli virölans faktörlerinin üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Rahman vd., 1997). Aerolysin, *Aeromonas sp.* tarafından üretilir ve hemolitik ve enterotoksik aktiviteden

sorumludur (Xu, vd., 1998). Aerolysin (*aerA*), *Aeromonas* suşunun patojenitesini tanımlamak için kullanılan virülanslardan biri olarak tanımlanmıştır (Zhang vd., 2013; Christy vd., 2019). Christy vd., (2019)'e göre *A. hydrophila*, nükleaz, aerolisin, serin ve proteaz olarak bilinen dört virülans genine daha sahiptir. *Aera* ve *hlyA* geni, hemoliz ve aerolisin toksinlerinin üretilmesinden sorumlu olan ana genlerdir, aerolisin, hemolitik ve sitolitik özelliklere sahip *A. hydrophila* suşları tarafından üretilen hücre dışı bir proteindir. *A. hydrophila*'daki aerolysin toksinleri, yağ tabakasına girmeden ve delikler oluşturmada önce ökaryotik hücrelerin yüzeyindeki spesifik glikoprotein reseptörlerine bağlanır. Delikler oluşturan aerolysin toksinleri, apreprotoksin içeren peptidler bakteriyel membrana geçer. Bu toksinler epitel hücrelerine saldırabilir ve gastroenterite neden olabilir (Christy vd., 2019).



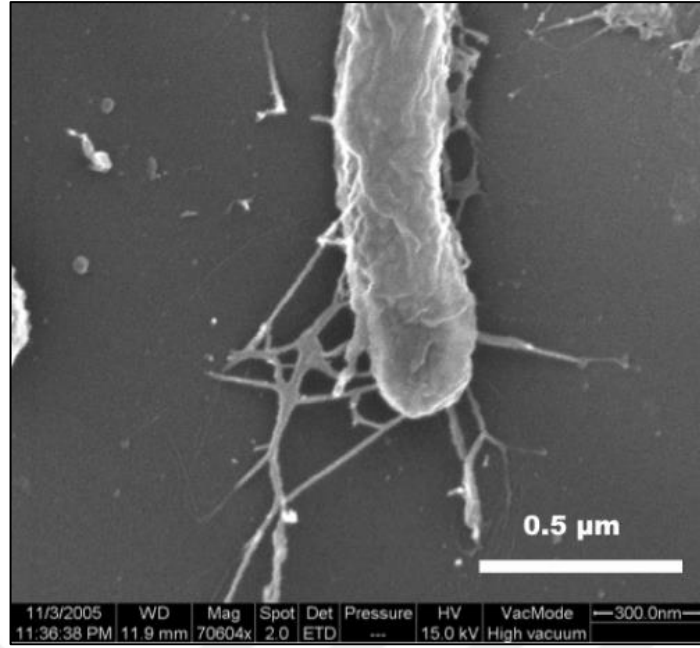
Şekil 2.5. *A. hydrophila*'nın virülansından sorumlu genlerin, moleküler etkileşimlerin ve fonksiyonlarının diyagramı (Rasmussen-Ivey vd., 2016)

2.5.1. Biyofilm

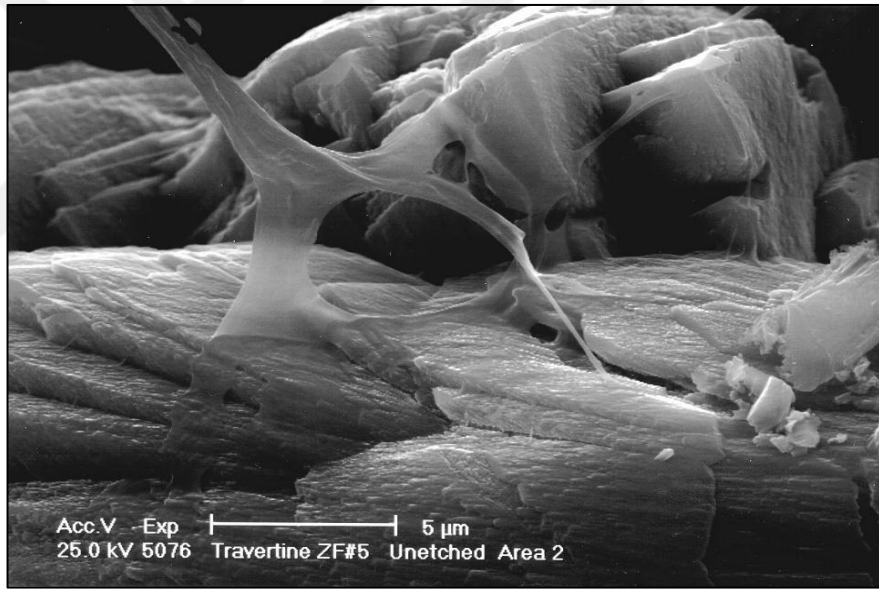
Literatürde biyofilm için farklı birçok tanım yapılmıştır. Fosil kayıt bilgileri 3 milyar yıldan daha uzun süreden beri bakterilerin biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmıştır (Çiftçi, 2005). Biyofilm kalınlığı 0.2 mikronsa bakterinin mutlaka bu biyofilm içerisinde yer aldığı ve dünyadaki mikrobiyal kütleinin tamamının %80 kadarının biyofilm formunda olduğu iddia edilmektedir (Davies, 2003; Richards ve Melveer, 2009; Filik, 2019). Sıvı ile temas eden yüzeylere tutunan bakterilerin oldukça hidrate, aniyonik bir matriks olan glikokaliks ile kaplı olduğunu bildirmişlerdir (Costerton vd., 1976; Costerton vd., 1987). Daha sonra farklı araştırmacılar tarafından da yapılan biyofilm tanımlarında ortak temel faktörler; mikroorganizma, yüzey ve glikokaliks olarak görülmektedir (Carpentier ve Cerf, 1993; Elder vd., 1995).

Biyofilm (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8) bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Çiftçi, 2005). Söz konusu biyofilm bakteriyel patojenitede ve ısrarcı infeksiyonlarda önemli rol oynar (Costerton vd., 1999; Middleton vd., 2002).

Biyofilmin ilk adımı adherans olup dokunma anı hastalıklar için kritiktir. Balık vücudu, dokuları ve pulları, bakterilerin yaşaması ve bölgede biyofilm oluşturmaları için önemli noktalar. Bakterinin yüzeye EPS (Extracellular Polymeric Substances) ile yapışması bir biyofilm stratejisidir (Şekil 2.6) (Patti vd., 1994).

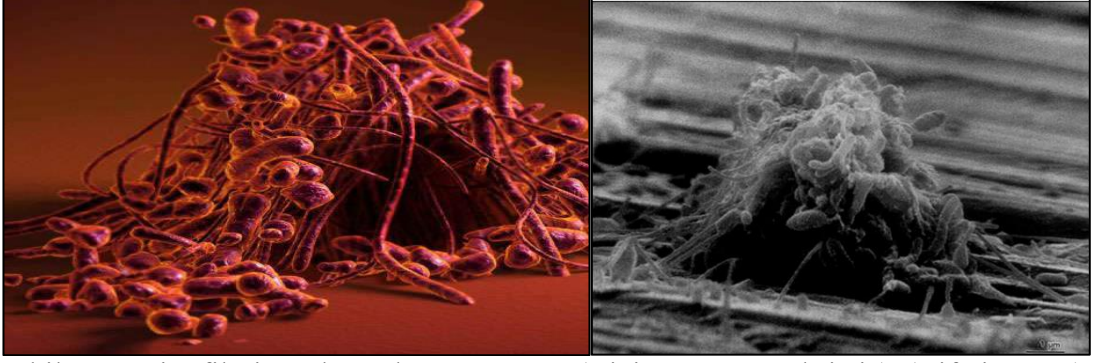


Şekil 2.6. Bakterinin yüzeye yapışmak için EPS oluşturması (Wu, 2013)



Şekil 2.7. Mikroplar şehri: biyofilm (Game Changer Detox, 2018)

Biyofilm mimarisinde çevreyi algılama sistemindeki AHL molekülleri rol oynamaktadır. Biyofilm oluşumu çevreyi algılama sisteminin yönetiminde olduğu için bu sistemin bloke edilmesi yeni tedavilerden biridir (Davies vd., 1998; Hartman ve Wise, 1998; Stickler vd., 1998).



Şekil 2.8. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie) (Çiftçi, 2005), biyofilmin scanning elektron mikroskopundaki görüntüsü (Donlan ve Costerton, 2002)

2.5.2. β -Hemolitik aktivite

2.5.2.1. Hemolizin, özellikler, mekanizma, por oluşumu, yapı, hastalık sırasındaki rolü, gen ekspresyonunun düzenlenmesi

Hemoliz eritrositlerin, sitoplazmanın ve kan plazmasının lizisidir. *In vivo* ve *in vitro* şartlarda gerçekleşir (Wells, 2008). Hemoliz olayı ya patojen bakterinin toksini olan hemolizinler aracılığıyla gerçekleşir ya da canlının yoğun hareket etmesi sonrası gerçekleşir (Witek vd., 2017). Hemolizinler, eritrositlerin sitoplazmik membranına zarar vererek lizise ve sonunda hücre ölümüne neden olur (Madigan, 2010). Hemolizin ayrıca sitoplazmik membran üzerinde por oluşturarak eritrositlerin, lökositlerin ve trombositlerin parçalanmasına neden olabilen por oluşturuca toksinlerdir (PFT). Hemolizin bakteriler tarafından normalde suda çözünür bir şekilde salgılanır. Bu monomerler, spesifik alıcılar aracılığıyla atağa geçer ve hedef hücrelere yayılır. Bu yapıldıktan sonra halka şeklinde heptamer kompleksleri yaparak oligomerize olurlar (Thompson vd., 2011). Por oluşturuca hemolizin heptamerle örneğin alfa-hemolizin porunu oluşturur. Alfa-hemolizin monomeri salgılanır ve zaten duyarlı olduğu hücrenin dış membranına bağlanır. Bağlanmadan sonra monomerler aracılığıyla su, iyonlar ve küçük organik moleküller kontrolsüzce hücrenin içine yayılır ve hücre oligomerize olur. ATP, zar potansiyelinin ve iyon gradyanlarının dağılması, hücre duvarı yırtılmasına (lizis) neden olan geri dönüşümsüz ozmotik şişlik gibi hayati moleküllerin hızla bozulmasına ve konak hücrenin ölümüne neden olur (McGillivray vd., 2009). Bir virülans olan hemoliz

yüksek bakteri yoğunluğuna bağlı olarak çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki genlerin ekspresyonuyla ortaya çıkar (Jangid vd., 2007).

2.5.2.1.1. Alfa hemolizin (α -hemolizin)

α -hemolizin toksini, sitoplazma ve monomerinin oligomerizasyonu ile dış membrana bağlanarak hücre ölümüne neden olur. α -hemolizin ozmotik fenomenlerden, hücre depolarizasyonundan ve hayati moleküllerin kaybından (örneğin ATP) sorumludur ve bunların ölümüne neden olur (McGillivray vd., 2009). α -hemolizin üreten bakteri kanlı agar'da koyu ve yeşilimsi koloni oluşturur. Bazı literatürlerde bu renk değişimi nedeniyle ‘‘yeşil hemoliz’’ olarak adlandırılır. Alfa hemolizin bakterinin ürettiği hidrojen peroksit aracılığıyla hemoglobinin oksitlenerek yeşil renkte methemoglobin türevi bir madde oluşturmasıyla gerçekleşir (Ray vd., 2004). Methemoglobin, oksijenin taşınabilmesi için ferröz (Fe^{+2}) şeklinde olması gereken hemoglobin demirinin ferrik (Fe^{+3}) şekline oksidasyonu ile oluşur (Honig, 2000). Methemoglobin oksijeni bağlayamaz, bu da dokulara oksijen taşıyamayacağı anlamına gelir. Mavimsi çikolata-kahverengi renktedir (Denshaw-Burke, 2006).

2.5.2.1.2. Beta hemolizin (β -hemolizin)

β -hemolizin fosfolipaz C toksinidir. Koyun eritrositlerinin araştırılmasında bu toksik mekanizması, hücre zarının %50'sini oluşturan spesifik bir membran lipidini ve sfingomiyelini hidrolize etmiştir. Bu degradasyonu, ciddi oranda fosforil-kolin yükselişi takip etmiştir. Organik fosforun salınmasından dolayı da sfingomiyelin ve en sonunda hücre lizisine (ölümüne) neden olmuştur (Maheswaran ve Lindorfer, 1967).

2.5.2.1.3. Gama hemolizin (γ -hemolizin)

γ -hemolizin aynı α -hemolizin gibi por oluşturuvcu toksinlerdir (PFT). İki tane birbirine benzemeyen bileşenden oluşur ve iki bileşenli toksinler olarak ta adlandırılır. Bu iki bileşenli toksin, "S" ve "F" bileşeninin sinerjik kombinasyonundan oluşan toksinlerdir. Bu toksinler protein yapılarında bozulmalar ve hedef hücre zarında oligomerik porlar oluşturur. Hedeflenen ana hücreler

polimorfonükleer hücreler, monositler, eritrositler ve makrofajlardır (Kamio vd., 1993; Morinaga vd. 2003; Dalla Serra vd., 2005).

2.5.3. Elastolitik aktivite

A. hydrophila'nın patojenitesinde elastolitik aktivite yani elastaz oldukça önemli rol oynamaktadır (Cascón vd., 2000). *A. hydrophila* suşlarının toksijenik biyokimyasal özellikleri arasında elastolitik aktivite bulunmaktadır (Lallier ve Higgins, 1988).

A. hydrophila ahyB geniyle elastolitik aktiviteyi kodlamaktadır. *ahyB* geninin 62.728 moleküler ağırlığında olup 588 aminoasit protein koduyla 1.764 nükleoitte oluştuğu sekans analizinde ortaya konmuştur. Birçok *A. hydrophila* suşu kükürt dioksit içeren çözünmez elastin nütrient agarda elastolitik aktiviteyi üretmektedir ve bu suşlarda elastin salgısı çalışmaları devam etmektedir (Cascón vd., 2000). Cascón vd. (2000) *ahyB* geninin *A. hydrophila* bakterisinin elastolitik aktivitesine katkıda bulunduğuna dair kanıtları bildirmiştir. Allelik yer değiştirme yoluyla bir *A. hydrophila ahyB* mutantı oluşturduklarını ve bu *ahyB* genininde balıklarda hastalık oluşumunda önemli bir virülans faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Hatta *A. hydrophila ahpB* mutantının ortalama öldürücü dozu (LD₅₀) doğal suştan yaklaşık 100 kat daha yüksektir (Cascón vd., 2000).

A. hydrophila tarafından üretilen elastolitik aktivitenin karaciğerde yağlanmaya ve nekroza neden olduğu ispatlanmıştır (Nieto vd., 1991; Rodriguez vd., 1992; Gado, 1998; Afifi vd., 2000). Balığın bağırsak mukozasının istilasından ve bakterinin balığın diğer dokularına yerleşmesinden de elastaz sorumludur (Cascón vd., 2000). Damarlarda elastin bulunduğundan, elastinin parçalanması hemorajilere neden olur (Salyers ve Whitt, 1994).

2.6. *A. hydrophila*'da Antibiyotik Direnci ve *A. hydrophila*'nın Neden Olduğu Hastalıkta Risk Yönetimi

Antimikrobiyal ajanlar genellikle etkenlerin hedef protein bölgelerini bozarak bakteriyostatik ya da bakterisidal etki eder (Carpenter ve Chambers, 2004; Romero vd., 2012; Duman, 2017).

A. hydrophila yüksek genetik heterogeneite gösterdiği için MAS'a karşı koruyucu aşı ve probiyotik gibi profilaktik uygulamalar ile hastalığın kontrolünde açısından zorluklar yaşanmaktadır (Poobalan vd., 2010). Ülkemizde hareketli *Aeromonas* sepsis etkenleri yaygın olarak izole edilmiştir (Baran vd., 1980; Timur, 1983; Güvener, 2001; Öztürk, 2007; Durmaz ve Türk, 2009; Korun ve Toprak, 2010; Boran, 2013). Antimikrobiyallerin yaygın kullanımı, balık ve çevresel patojenlere karşı antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmaktadır (Angulo ve Griffin, 2000; Witte, 2000; Petersen vd., 2002; Angulo vd., 2004; Alcaide vd., 2005). Profilaktik amaçla kullanılan bazı antimikrobiyaller ise balıklarda immun sistemi baskılayarak balıkların hastalıklanmasına yol açmaktadır (Naylor ve Burke, 2005; Cabello, 2006). Antibiyotiklere karşı dirençli populasyonların ortaya çıkmasıyla antibiyotiklerin giderek etkisiz kalması, dolayısıyla hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi sonucu antibiyotik direnci ile sonuçlanmaktadır (Rasko ve Sperandio, 2010).

Bakterilerin antibiyotik direnci kazanması şu şekildedir. Transformasyonda bakteriler direnç genlerini dış ortamdan alırlarken transdüksiyonda bakteriler direnç genlerini viral bir DNA'dan (bakteriyofaj) alırlar. Konjugasyonda ise bakteriler direnç genleri ya da plazmidleri hücreler arası direkt bağlantı ile alırlar. Bakteriler arasında direnç genlerinin taşınmasında genellikle transpozonlar ve plazmidler rol oynar. Transpozonlar hareketli genetik elementlerdir ve plazmidler aracılı ile taşınırlar. Bakteriler arasında taşınan bu hareketli genetik elementler antimikrobiyallere karşı direnç kazanmalarına neden olur (Kumarasamy vd., 2010).

Antimikrobiyallerin hastalıklara etkisiz kalması sonucu hastalıklarda tedavi için yeni fikirler ortaya çıkmıştır. Bakterilerde iletişim sisteminin engellenmesi de (Çevreyi algılama inhibisyonu) yeni hedefler arasında yer almaktadır (Danase, 2002).

2.7. Çevreyi Algılama Sisteminin İnhibisyonu (Quorum Quenching)

Quorum Sensing (QS) ile Quorum Quenching (QQ) birbirinin tersi proseslerdir. Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozmaktır (Uroz vd., 2009; Chen vd., 2013). Zhang vd. (2019)'a göre QQ, bakterileri öldürmeden QS tarafından yönetilen virülansın engellenmesi antibiyotik gibi hastalık kontrol stratejilerindendir.

QQ ilk kez Dong vd. (2002), yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* türünde gözlenen AiiA enziminin AHL'leri inhibe ettiğini gözlemeleri ve bu olayı QS sistemini bastıran mekanizma olarak tanımlamalarıyla ortaya konmuştur.

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu (QS molekül üretiminin önlenmesi, QS molekülünün degradasyonu veya inhibisyonu, QS sinyal alınımının önlenmesi), prokaryot-prokaryot quorum quenching, ökaryot-prokaryot quorum quenching, QS İnhibisyonu ise QS mimikleri, QQ enzimleri, QQ mekanizmasındaki spesifik moleküller kullanımı gibi stratejiler bakteriyel iletişimi bloke etmek için denenmektedir (Açıkgöz, 2012; Turan ve Engin, 2018).

Bakterilerin çoklu direnç özelliği kazanmaları sonucu çalışmalar güçlenen bu bakterilere karşı savaşabilecek yeni yaklaşımlar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bakterilerle alternatif savaş seçeneklerinden son zamanlarda en çok üzerine düşülen, bakterilerin konakta hastalık oluşturmaya sebep olan virülans faktörlerinin üretilmesinden sorumlu olan çevreyi algılama sistemidir (Hartman ve Wise, 1998; Hentzer ve Givskov, 2003). Bu sistemin inhibisyonu gerçekleştirmek için sentetik moleküller ya da bitkisel maddeler kullanılmaktadır (Hartman ve Wise, 1998).

2.7.1. AHL sinyal molekülünün alınmasının engellenmesi

Bakteriler arası iletişim molekülünün bakteri tarafından algılanmasını engellemekte bir stratejidir. Bu olay doğal AHL sinyal molekülü ile reseptör proteine bağlanmak için rekabete giren moleküller ile gerçekleştirilmektedir. AHL ile rekabete giren moleküller AHL'ye benzer ve AHL bağlanma bölgesi gibi işlem yaparak reseptörü inaktive eder. AHL analogu inhibitörlerin sentezi üzerine yoğunlaşan çalışmaların çoğu farklı yollarla acyl yan zincirin modifikasyonu ile gerçekleşmektedir (Hentzer ve Givskov 2003). Bazı bitkiler ürettikleri AHL analogu bileşikler ile kendileri için zararlı olan *Pythium torulosum*'un üremesini önlemek için *Bacillus cereus* tarafından antibiyotik sentezini tetiklerler (Raffa vd., 2005). *P. aeruginosa*'da virülans faktörlerini *N*-dekanoyil ciklopeptilamitin inhibe etmektedir (Ishida vd., 2007).

2.7.2. AHL sinyal molekülünün sentezinin engellenmesi

AHL sinyal molekülü üreten bakterilerin büyük çoğunluğu *V. fischeri* 'deki luxI homoloğu bir ya da birden fazla gen içerir. Homoserin lakton molekülünün halka kısmı S-adenozil metiyonin tarafından sentezlenir ve ACP (açıl taşıyıcı protein) AHL sinyal molekülünün açıl yan zincirine uygun olarak yönlendirilmesini sağlar. Sinyal molekülü üretimi hakkında bilinenler çevreyi algılama sisteminin inhibisyonunda sinyal üretimini hedef alan çalışmaları arttırmış ve S-adenozil metiyonin analogları (SAM) bu amaçla araştırmalara kaynak olmuştur (Parsek vd., 1999; Hentzer ve Givskov, 2003). Böylece SAM analoglarının çevreyi algılama sisteminde AHL sentezi inhibitör adayı olarak kullanılması umudunu arttırmıştır (Tateda, 2001).

2.7.3. AHL sinyal molekülünün yıkılması

Aktif sinyal moleküllerinin azaltılmasıyla da bakteriler arası iletişimi engellenebilmektedir. Dong vd. (2000), yaptıkları bir çalışmada bir *Bacillus* türünün *aiiA* adı verilen bir enzim aracılığı ile AHL sinyallerini engellemişlerdir. *aiiA* geninin ekspresyonunun bir bitki patojeni olan *E. carotovora* da AHL sinyallerini azalttığı ve test edilen bitkilerde çürüklük hastalığının semptomlarını hafiflettiği görülmüştür (Dong vd., 2000; Hentzer ve Givskov, 2003). Ayrıca bazı *Bacillus* türleri üretmiş oldukları bir enzim aracılığı ile AHL molekülünü etkisiz hale getirir. Bu bakterilerin klinik önemi bilinmemekle birlikte, AHL yıkan enzimlerin klinik önemi açıktır. Bazı bitki ve mantarlar, bakterilerin AHL sinyal iletişimini bozmayı başarmıştır. *Delisea pulchra* adı verilen bir kırmızı bir deniz yosunu tarafından üretilen doğal maddeler olan halojenlenmiş furanonların, bakterilerin kolonize olmasını önlediği, AHL aracılığı ile gelişen biyofilmi engellediği, virülans sentezini engellediği saptanmıştır (Manefield vd., 1999).

2.8. Fenolik Bileşenler (Polifenoller)

Fenolik bileşenler her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu bileşiklerdir. Fenolik bileşenler genelde bitkilerde bulunur ve bitkilerin renklenmelerinden, örneğin sonbahardaki yaprak renklerinden sorumludurlar. Antioksidan özellikleri vardır (Keçeli ve Gordon, 2001).

Fenolik bileşenler, yapısında bir benzen halkası ile bu benzen halkasına bağlı bir veya daha çok sayıda hidroksil grupları içermektedirler. Sahip oldukları pek çok biyolojik ve kimyasal özellikleri nedeniyle; serbest kökleri ve metal iyonlarını bğlama ve oksijeni yatıştırma özellikleri ile iyi bir antioksidan olabildikleri gibi esmerleşme reaksiyonlarında substrat olarak da görev yapabilmektedirler (Keçeli, 2000). Fenolik bileşenler, meyvenin duysal özelliklerinde önemli parametrelerdir ve özellikle o-difenoller, meyve veya yağın oksidasyona karşı dayanıklılığında antioksidan olarak görev yapmaktadır (Keçeli ve Gordon, 2001).

Fenolik bileşenlerin 100–300 mg/kg canlı ağırlık doz seviyesinde kanama zamanı, pıhtılaşma zamanı, üzerine etkileri tespit edilmiştir. Fenolik bileşenler reaktif oksijen türlerini kontrol alarak, enflamasyon önleyici konumları boyunca endotel sağlığı geliştirmeye yardımcı olmaktadır (Covas vd., 2006).

Bitkilerde yaygın olup, meyve ve sebzelerde değışik miktarlarda bulunmaktadır. Meyveler fenolik bileşenler bakımından daha zengin kaynaklardır. Önemli oranda fenolik içeren bitkiler arasında kuş üzümü, böğürtlen, ahududu, çilek, baklagiller, kakao, erik, armut, kiraz, nar, üzüm, elma, portakal gibi meyveler ile brokoli, lahana, maydanoz, soğan gibi sebzeler sayılabilir. Bitkilerin dışında en yoğun ve bol miktarda polifenol, hümik asitlerde bulunmaktadır (Covas vd., 2006).

Fenolik bileşenler doğal antioksidanların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Fonksiyonel ve teknolojik açıdan önemli görevleri bulunmaktadır; Bunlar üründe lezzet oluşması (acılık ve burukluk), meyve sebzelerde kendine özgü renk oluşması (antosiyantinler; kırmızı-mavi renk), polifenoloksidaz (PPO) enzimi katalizörlüğündeki esmerleşme reaksiyonu ile ürünün esmerleşmesi, antimutajenik etki (klorojenik asit, kateşinler gibi), antikarsinojenik etki, proteinleri çöktürme etkisi (tanenler, dabaklama işlemi), berrak meyve suları ve şaraplarda bulanma ve tortu oluşumu gibi aktivitelerdir. Kimyasal olarak aromatik benzen halkası içeren maddeler ve türevleridir. -OH grubu içeren benzen fenol olarak adlandırılır. En basit fenolik bileşik; 1 tane -OH grubu içeren benzen, yani fenoldür. Fenolik bileşikler, bitkininin çevresel stres koşullarına (UV radyasyon, patojenler vb.) karşı savunma mekanizmasının sonucunda oluşan sekonder metabolitlerdir (Türksoy, 2018). Kimyasal yapıları bir veya birden fazla hidroksil içeren aromatik halkalardan

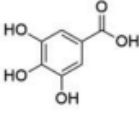
oluşmaktadır. Basit fenolik molekülden kompleks polimerlere kadar değişen geniş bir aralığı kapsayan bu gruplar genellikle polifenoller olarak da anılmaktadır (Bravo, 1998). Polifenoller içerdikleri fenol halkalarına ve bu halkaları birbirine bağlayan yapısal elementlere göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Polifenollerin temel grupları flavonoidler, fenolik asitler, fenolik alkoller, stilbenler ve lignanlardır (D Archivio vd., 2007; Demircan, 2016).

Bitkilerde, fotosentez sonucu oluşan karbonun yaklaşık %2'si fenolik bileşiklere dönüşmektedir. Bu dönüşümün aromatik amino asit metabolizması sırasında gerçekleştiği varsayılmakta ve bu nedenle fenolik bileşikler, bitkilerde aromatik ikincil metabolit sayılmaktadır (Karadeniz ve Ekşi, 2001).

2.8.1. Gallik asit (GA)

Gallik asit (GA) ilk kez 1786'da İsveçli kimyager Carl Wilhelm Scheele tarafından tanımlanmıştır (Carl Wilhelm Scheele, 1786). GA, hidroksi gruplarının 3, 4 ve 5 pozisyonlarında olduğu bir trihidroksibenzoik asittir. Antioksidandır. GA kokusuz, beyaz, katı formda olup suda batar. Moleküler formülü $C_7H_6O_5$ ya da $C_6H_2(OH)_3COOH$ olup moleküler ağırlığı 170.12 g/mol'dür (National Center Biotechnology Information, 2019a). Hem serbest hem de hidrolize edilebilir tanenlerin bir parçası olarak bulunur. GA grupları genellikle elajik asit gibi dimerlerin bağlanmasından oluşur (Andrew, 2004). GA digallik ve trigallik asitler ve eter-ester döngüsü gibi moleküller arası esterlerden oluşur (Edwin, 2007). GA, farmasötik endüstrisinde kullanılır (Fiuza vd., 2004).

Gallik asit *Cynomorium coccineum* gibi (Zucca vd., 2013), *Myriophyllum spicatum*'da, mavi-yeşil alg olan *Microcystis aeruginosa*'da (Nakai, 2000), çeşitli meşe türlerinde (Mämmelä vd., 2000), *Caesalpinia mimosoides*'da (Chanwitheesuk vd., 2007) bulunur. Ayrıca çay (Pandurangan vd., 2015), sumak (Andrew, 2004), çilek, üzüm, muz gibi meyvelerde (Koyama vd., 2007) ve sirkelerde (Gálvez vd., 1994) olmak üzere birçok gıda maddesinde çeşitli miktarlarda GA bulunur. Gallik asidin moleküler formülü Şekil 2.9'da verilmiştir. Ayrıca GA'nın bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi Şekil 2.10'da verilmiştir.

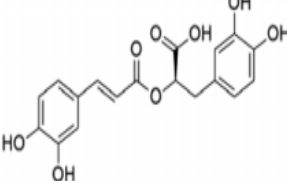
Gallic acid		BF	1 - 4 mg/mL
		BE	
		TOX	0.5 - 2 µg/mL
		BF	0.0625 - 4 mg/mL
		BE	
		BF	8 mg/mL
		BF	
		BE	1000 µg/mL
		MOT	100 - 1000 µg/mL
		MOT	50 - 500 mg/L
		QS	50 - 200 µg/mL
		QS	1000 µg/mL
		BF	30 - 1000 µg/mL
		MOT	15 - 500 µg/mL

Şekil 2.9. Gallik asitin moleküler formülü, bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi; QS, Quorum Sensing, BF, biyofilm oluşumu; BE, biyofilmi engellemesi; MOT, hareketlilik; TOX, toksin gibi fenotipleri ve oranları (Silva vd., 2016)

2.8.2. Rosmarinik asit (RA)

Rosmarinik asit (RA), bir kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit esteridir (Petersen ve Simmonds, 2003). Moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$ olup moleküler ağırlığı 360.3 g/mol'dür (National Center Biotechnology Information, 2019b). RA, bir kafeik asit esteri ve 3,4-dihidroksifenillaktik asittir. Genellikle Boraginaceae türlerinde ve Lamiaceae'nin Nepetoideae alt familyasında bulunur. Bu biraz çözünür olan bir kırmızı-turuncu toz formu suda az çözünür ama organik çözücülerde iyi çözünür. RA, perilla (*Perilla frutescens* L.), biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), adaçayı (*Salvia officinalis* L.), nane (*Mentha arvensis* L.) ve fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) gibi bitkilerinde bulunan polifenolik maddelerden biridir. Bu bitkilerin güçlü fizyolojik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Petersen ve Simmonds, 2003; Baba vd., 2004). RA antioksidan ve antienflamatuar aktiviteleri olan doğal olarak oluşan bir polifenoldür (Sanbongi vd., 2003). RA oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eden veya geciktiren doğal olarak oluşan veya sentetik madde olup oksidasyonun hayvan dokularındaki zararlı etkilerini ortadan kaldırır (National Center Biotechnology Information, 2019b). RA anti-enflamatuar ve immünomodülatör aktiviteleri olduğu bilinmektedir (Lee vd., 2008a). RA hücreleri oksidatif stres koşulları altında koruyabilmektedir (Psotova vd., 2006; Lee vd., 2008b). Rosmarinik

asitin moleküler formülü Şekil 2.10’de verilmiştir. Ayrıca RA’in bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi Şekil 2.10’de verilmiştir.

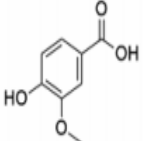
Rosmarinic acid		<i>S. mutans</i>	ENZ	20.1 µM
			BF	
			MOT	
		<i>P. aeruginosa</i>	TOX	750 µg/mL
			ENZ	

Şekil 2.10. Rosmarinik asitin moleküler formülü, bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi; BF, biyofilm oluşumu; MOT, hareketlilik; TOX, toksin; ENZ, enzim gibi fenotipleri ve oranları (Silva vd., 2016)

2.8.3. Vanilik asit (VA)

Moleküler formülü $C_8H_8O_3$ olup moleküler ağırlığı 152,15 g/mol’dür (National Center Biotechnology Information, 2019c).

Vanillik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), bir lezzetlendirici madde olarak kullanılan bir dihidroksibenzoik asit türevidir. Vanilinin oksitlenmiş şeklidir. Aynı zamanda ferulik asitten vanilin üretiminde bir ara maddedir (Lesage-Meessen vd., 1996; Civolani vd., 2000). Vanilik asitin moleküler formülü Şekil 2.12’de verilmiştir. Ayrıca VA’in bazı bakteriler üzerindeki çevreyi algılama sistemi üzerindeki etkisi Şekil 2.11’de verilmiştir.

Vanillic acid		<i>C. violaceum</i>	QS	50 - 200 µg/mL
		<i>C. violaceum</i>	QS	
		<i>A. tumefaciens</i>		0.063 - 0.25 mg/mL
		<i>A. hydrophila</i>	BF	

Şekil 2.11. Vanilik asitin moleküler formülü, bazı bakterilerin çevreyi algılama sistemi yönetimindeki fenotiplere etkisi; QS, Quorum Sensing BF, biyofilm oluşumu gibi fenotipleri ve oranları (Silva vd., 2016)

2.9. Moleküler Yöntemler

2.9.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) bütün moleküler klonlama tekniklerinin ilkidir. PCR çok hızlı ve hassas şekilde çok büyük boyuttaki karmaşık DNA'nın içindeki hedef genini tanır ve milyonlarca kopyasını oluşturur. Hedef gendeki nükleotidi sorumsuzca kolayca tanır (Green ve Sambrook, 2019).

2.9.2. Değişimli alan jel elektroforezi (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)

Moleküler epidemiyoloji hastalıkların tanısı, etkenin biyokimyasal ve moleküler seviyede tanımlanması ve tiplendirilmesi, patogenezen sorumlu genlerin saptanması, genetik duyarlılığın belirlenmesi, konak-patojen ilişkisi, virülans ve bulaşıcı olabilme yönünden farklılık gösterebilen suşların araştırılması, hastalığın yayılması, yayılmasının önlenmesi üzerinde duran bir bilim dalıdır (Feil ve Enright, 2004; Andrei ve Zervos, 2006; Uysal, 2012). Bakteriyel tiplendirmeye hastalıklarının epidemiyolojileri, salgınların kökenleri, patogenezi ve bakteri genetiği gibi konularda bilgiler edinilebilmektedir (Durmaz, 2008).

Moleküler epidemiyolojiyle hastalıklarının epidemiyolojisinde büyük ilerlemeler rapor edilmiştir. Moleküler epidemiyolojiyle suşlarda sabit belirli bir genetik göstergeyle salgın sırasında toplanan aynı tür içindeki suşların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Bu araştırmayla "suşlar farklı mı, aynı mı?" sorusuna cevap aranmaktadır. Salgın suşları (epidemiyolojik yönden ilişkili suşlar) klonal olarak da ilişkilidirler (Tompkins, 1998; Pfaller, 2001; Durmaz, 2007; Uysal, 2012).

Plazmit profilinin belirlenmesi ilk jenerasyon olsa da yerini artık kromozomal DNA üzerinde yoğunlaşan PFGE moleküler yöntemine bırakmıştır (Swaminathan ve Matar, 1993).

İlk tarif edildiği 1983 yılından sonra "pulsed field jel elektroforezi" birçok bakteriyel patojen için kullanılan moleküler epidemiyolojik analizler arasında "altın standart" metot haline gelmiştir (Goering, 2004).

İşlem sonrası restriksiyon profillerinin analizi ve suşların yakınlık derecelerine göre sınıflandırılması için ortak ya da salgın profili belirlenir. Ortak profil yoksa büyük olasılıkla suşlar birbirleriyle ilişkisizdir. Salgın suşunun profili belirlendikten sonra, buradaki bantların sayısı ve boyutları diğer suşlarındaki ile karşılaştırılır. Her bir suşun profili, salgın suşuyla olan ilişkisine göre sınıflandırılır (Durmaz ve Durmaz, 2001).

PFGE yönteminde kromozomal benzerlikler karşılaştırılmaktadır (Goering, 2004). Tenover vd. (1995), ilişkiyi tarif edebilmek için bir yöntem geliştirmiştir. Buna göre, bant profillerine bakarak, suşların birbirleriyle ilişkilerinin derecelendirilmesi yapılır. Bu kriterler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. PFGE profillerini yorumlama kriterleri (Tenover vd.,1995)

Kategori	Salgın suşu profiline göre meydana gelen genetik farklılık sayısı	Salgın suşundan farklılık gösteren bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı	0	0	Suş, salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	2-3	Suş, salgınla yakın ilişkili
Olası ilişkili	2	4-6	Suş, salgınla olası ilişkili
Farklı	≥ 3	≥ 7	Suş, salgınla ilişkisiz

Aynı suş: Sayı ve boyutları aynı olan suşlardır. Bu suşlar, genetik olarak farksız kabul edilir. Salgın suşu ile aynı profili gösteren suşlar, epidemiyolojik olarak ilişkilidir (Smith vd., 2000; Uysal, 2012).

Yakın ilişkili suş: Salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı olan suşlar için kullanılır. Suş, salgın suşuyla yakından ilişkili olarak değerlendirilir ve epidemiyolojik olarak, salgının bir parçası olma olasılığı yüksektir. Bu farklılık, bir nokta mutasyon, bir insersiyon veya bir delesyon gibi tek bir genetik olayla ilişkilidir (Sader vd., 1993; Tenover vd., 1995; Uysal, 2012).

Muhtemelen ilişkili suş: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı olan suşlar için kullanılır. Bu değişim, iki bağımsız genetik değişikliğin (insersiyon/delesyon ya da restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı) sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Epidemiyolojik yönden, bu suş, salgın suşuyla olası ilişkili olarak değerlendirilir. Bu suşlar salgın suşuyla aynı genetik soydan (lineage) olabilirler, ancak genetik olarak yakın ilişkili değildirler. Epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri daha azdır (Tenover vd., 1994; Tenover vd., 1995; Durmaz ve Durmaz, 2001; Uysal, 2012).

İlişkisiz suş: Suşların DNA'sında, üç ya da daha fazla genetik olay sonucu oluşan değişikliklere bağlı olarak salgın suşundan yedi ya da daha fazla bant farkı gözlenmektedir. Epidemiyolojik olarak, salgın suşuyla ilişkisizdir (Tenover vd., 1995; Uysal, 2012).

Salgın suşlarına ait DNA restriksiyon profilleri genelde "tip A" olarak rapor edilir. Salgın suşunun profili ile yakın ilişkili profiller, "tip A"nın alt tipleri olarak değerlendirilip tip A1, tip A2 olarak; salgın suşundan çok farklı ve ilişkisiz olarak sınıflandırılan profiller ise tip B, tip C olarak gösterilir (Durmaz ve Durmaz, 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *A. hydrophila* suşlarının temini

Araştırma da Bursa Uludağ Üniversitesi (BUÜ), Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi (ISUBÜ), Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nden (OMÜ) hasta balıklardan izole edilen ve identifikasyonu ilgili Üniversiteler tarafından yapılan *A. hydrophila* suşları (20 suş) ve *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşu kullanılmıştır (Çizelge 3.1). *A. hydrophila* suşları 25°C'de üretilmiştir ve suşlar kullanılıncaya kadar %20 gliserin içerisinde -80°C'de muhafaza edilmiştir (Ausubel vd., 1988).

Çizelge 3.1. Farklı koleksiyonlardan elde edilen *A. hydrophila* suşları

Sayı	Suş kodu	İzolasyon bölgesi	İzolasyon kaynağı
Referans Suş	ATCC 7966	Amerika Birleşik Devletleri	Süt
1. Suş	AH RSKK 05049	Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK)	RSKK
2. Suş	AH SAHA	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
3. Suş	AH S	Akdeniz/Türkiye	Sazan Balığı
4. Suş	AH J	Akdeniz/Türkiye	Japon Balığı
5. Suş	AH 2	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
6. Suş	AH 3	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
7. Suş	AH 4	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
8. Suş	AH 12.1	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
9. Suş	AH 14	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
10. Suş	AH 15	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
11. Suş	AH 16	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
12. Suş	AH 108	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
13. Suş	AH 113	İç Anadolu/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
14. Suş	AH 216	Ege/Türkiye	Kefal
15. Suş	AH 217	Ege/Türkiye	Levrek
16. Suş	AH 219	Ege/Türkiye	Tekir
17. Suş	AH 220	Ege/Türkiye	Çipura
18. Suş	AH 222	Ege/Türkiye	Kefal
19. Suş	AH 230	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı
20. suş	AH 232	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı

ATCC: American Type Culture Collection

RSKK: Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu

3.1.2. A. *hydrophila* suşlarının üretim ve depolanması

A. hydrophila suşları temin edildikten sonra 1 kez gençleştirilip her suştan 6 paralel olacak şekilde TSB ortamındaki cryo tüplere aseptik şartlarda ekilmiştir. Her test için suş içeren tek bir cryo tüp kullanılmış ve analiz sonucunda kullanılan cryo tüp atılmıştır.

Araştırmada kullanılan *A. hydrophila* suşu uzun süreli saklama amacıyla %20'lik gliserin içeren 2-3 ml TSB ortamında cryo tüplerde, -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için -80°C'den alınarak -20°C'de bekletildikten sonra aseptik şartlarda TSA besiyerlerine saf koloni olacak şekilde ekilmiştir. Ekimleri yapılan bakteriler 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla hazırlanan bu suşlar maximum 7 gün süreyle +4°C'de saklanmıştır.

3.1.3. Kullanılan fenolik bileşenler

A. hydrophila suşlarında çevreyi algılama sistemi üzerine inhibisyon etkisi tespitinde kullanılan fenolik bileşenlerden Sigma-Aldrich marka gallik asit (G7384-100G), rosmarinik asit (536954-5G), vanilik asit (94770-10G) ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.4. Besiyerleri ve çözeltiler

Araştırma da *A. hydrophila* suşlarını geliştirmek için kullanılan besiyeri ile çözeltilerin kompozisyon ve hazırlık durumları verilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *A. hydrophila* suşlarını araştırmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler

Besiyeri ve Çözeltiler	Kompozisyon (Gram/Litre)	Preparation (Hazırlık)
Tryptic Soy Agar (TSA)	1000 ml için 40 gr	1. 121°C'de 15 dk otoklavlama. 2. Petriler açık ve sarı
Tryptic Soy Broth (TSB)	1000 ml için 30 gr	1. 121°C'de 15 dk otoklavlama. 2. Tüpler açık ve sarı
O/F Basal Medium	900 ml için 11,0 gr O/F Agar Glikoz 100 ml için 1 gr	1. 121°C'de 15 dk otoklavlama. 2. Tüpler açık ve yeşil

Çizelge 3.2. *A. hydrophila* suşlarını araştırmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler (Devam)

Aeromonas Isolation Agar (Base)	500 ml için 28,15 gr	1. 121°C'de 15 dk otoklavlama. 2. Petriler yeşil
GSP Agar (Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base)	Sodyum L (+) glutamat (10,0) Nişasta (20,0) Potasyum dihidrojen fosfat (2,0) Magnezyum sülfat (0,5) Fenol kırmızısı (0,36) Agar-agar (12,0) Ayrıca eklenmesi gereken: Penisilin G 100,000 IU - eğer gerekliyse pimarisin (0,01)	1. 45 g/lt süspansiyon, 121°C'de 15 dk otoklavlama. 2. 45-50°C'de soğutma. 3. 100,000 IU penisilin g/lt ve eğer gerekliyse 0,01 pimarisin g/lt ekleme, karıştırma ve petrilere döküm pH: 25°C'de 7,2 ± 0,2 Petriler açık ve kırmızıdır.
Mueller Hinton Agar	35 gr Mueller Hinton Agar	1. 121°C'de 15 dk otoklavlama. 2. Petriler çok açık sarı renkte
Pimarisin	MERCK	MERCK
Penisilin G Potasyum Salt	MERCK	MERCK
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	ISOLAB	ISOLAB
Gallik Asit	SIGMA-ALDRICH	SIGMA-ALDRICH
Rosmarinik Asit	SIGMA-ALDRICH	SIGMA-ALDRICH
Vanilik Asit	SIGMA-ALDRICH	SIGMA-ALDRICH
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	SIGMA-ALDRICH	SIGMA-ALDRICH
Elastin Congo Red	SIGMA-ALDRICH	SIGMA-ALDRICH

3.2. Yöntem

3.2.1. *A. hydrophila* suşlarının identifikasyon testleri

Araştırmada farklı balık türlerinden izole edilen MAS hastalıklık etkeni *A. hydrophila* suşları kullanılmıştır. Bu suşların identifikasyonu GSP Agarda sarı koloni oluşturması, Gram boyama testi, vibriostat testi, O/F testi, suşların hareket testi, katalaz testi, sitokrom oksidaz testleri yapılarak teyidi yapılmıştır (Cappuccino ve Sherman, 1992; Lasee, 1995; Austin ve Austin, 2016).

3.2.2. *A. hydrophila* suşlarının GSP agar (Glutamate starch phenol red) *pseudomonas aeromonas selective agar base acc. to KIELWEIN* mediumda suş analizi

A. hydrophila suşları TSB besiyerinde ekilerek 25°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Üretilen genç suşlar TSA besiyerine çizgi tarzında ekilerek 25°C’de 24 saat tekrar üretilmiştir. GSP Agar (Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base) acc. to KIELWEIN petrilere kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 45 g/lt süspansiyon, 121°C’de 15 dk otoklavlanmıştır. 45-50°C’de soğutulmuştur. 100,000 IU penisilin g/lt ve eğer gerekliyse 0,01 pimarisin g/lt eklenmiş, karıştırılmış ve petrilere dökülmüştür. pH: 7.2 ± 0.2 ortam şartlarında besiyeri açık ve kırmızı renkte olarak elde edilmiştir (Stanier vd., 1966; Kielwein vd., 1969; Kielwein, 1969; Kielwein, 1971). TSA Agardan alınan *A. hydrophila* suşları GSP Agara ekim yapılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda GSP Agara ekim yapılan tüm *A. hydrophila* suşlarının koloni morfolojisi araştırıldığında sarı renkte koloni oluşumu ve koloni etrafında sarı renkli bölge oluşumu suşun teyit edilmesinde baz alınmıştır (Stanier vd., 1966; Kielwein vd., 1969; Kielwein, 1969; Kielwein, 1971). Besiyeri selektivitesini artırmak için penisilin G ve eğer gerekli ise antimikotik olan pimarisin ilave edilmiştir. 25°C 'da 3 gün yapılan inkübasyon sonunda oluşan 2–3 mm çaplı sarı renkli ve etrafı sarı zonlu koloniler *Aeromonas*, yine 2–3 mm çaplı kırmızı ve etrafı kırmızı zonlu koloniler *Pseudomonas* olarak değerlendirilmiştir. Testte pozitif kontrol olarak *A. hydrophila* ATCC 7966 suşu, negatif kontrol olarak *Pseudomonas* sp. kullanılmıştır. Test 3’er defa tekrarlanmıştır.

3.2.3. Antibiyotik duyarlılık testleri

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi

Antibiyotik duyarlılıkları Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) kriterleri temel alınarak Mueller Hinton agarda (MHA) Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşu ve *A. hydrophila* suşlarının antibiyotik direnç profilleri 28 farklı antibiyotiğe karşı disk difüzyon testi uygulanarak araştırılmıştır. Mc Farland 0.5 (Biosan DEN-1) bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan Müller Hinton Agar (Merck)

besiyerine 0,1 ml konularak besi yeri yüzeyine steril eküvyon çubuklar ile yayılması sağlanmıştır. Daha sonra petriler oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilmiştir. Agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler steril pens ile yerleştirilerek 25°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafında gelişen zonların çapları milimetrik olarak ölçülerek suşların duyarlı ve dirençli olup olmadıkları hassas (S), dirençli (R) ve orta derece de duyarlı (I) olarak CLSI, 2017 kriterlerine göre değerlendirilmiştir (Mueller ve Hinton, 1941; Hendriksen, 2002; Hudzicki, 2009; CLSI, 2017). Test 3 defa tekrarlanmıştır.

3.2.4. *ahyI*, *ahyR* genlerinin PCR ile analizi

DNA Ekstraksiyonu

Lizozim ve Proteinaz K tüplerine 275’er µl steril su ilave edilmiş ve -20 °C’de saklanmıştır.

1. Homojenize örnekten veya 24 saatlik bakteri kültüründen 1 ml alınarak steril 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 13,000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
2. Süpernatant dökülmüştür ve pelletin üzerine 564 µl Solüsyon SE eklenerek vortekslenmiştir.
3. 5 µl Peptit Kompleksi ve 30 µl SLS solüsyonu eklenip tüp ters/düz edilerek karıştırılmıştır, 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon solüsyonda berraklaşma ve viskozite görülünceye kadar sürdürülmüştür.
4. 100 µl Solüsyon SP eklenip karıştırılmış ve 65°C’de 2 dk inkübe edilmiştir. Önceden 65°C’ye getirilmiş 80 µl Solüsyon SLC çözeltisi eklenip karıştırılmış ve 65°C’de 10 dk inkübe edilmiştir.
5. Eşit hacimde [kloroform: izoamil alkol] (24:1) alınıp tüpün içine aktarılmıştır (yaklaşık 800 µL). 10,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Santrifüj sonrası üst faz steril bir tüpe alınmış ve üzerine eşit hacimde (yaklaşık 800 µL) [fenol: kloroform: izoamil alkol] (25:24:1) eklenip 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

7. Santrifüj sonrası DNA içeren üst faz steril bir tüpe aktarılmış ve üstüne eşit hacimde (yaklaşık 800 µL) [kloroform: izoamil alkol] (24:1) eklenip 10,000 rpm’de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
8. DNA içeren üst faz steril bir tüpe aktarılmış ve bu hacmin 0,7 kat hacminde (yaklaşık 560 µL) izopropanol eklenmiştir. Tüp çalkalanarak nükleik asitlerin çökmesi sağlanmıştır. 55-60 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
9. Tüp, 13,000 rpm’de 15-30 dk santrifüjlenmiştir. Bu aşamada DNA’nın tüpün dibinde beyaz bir çökelti gibi görülmesi beklenmiştir. İzopropanolden oluşan süpernatant dikkatlice dökülmüştür.
10. DNA pelleti 500 µl %70 EtOH ile 1 kez yıkanmış 13,000 rpm’de 15-30 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülmüştür.
11. DNA pelleti SpeedVac’de 5 dk kurutulmuş ve 100 µl SE’de çözülmüştür. DNA çözeltisi +4°C’de 2 hafta / -20°C’de daha uzun süre saklanmıştır.
12. DNA suşu hazırlanması için optimize edilen DNA izolasyon kiti

SentroPure® Bac-X Bakteriyel DNA İzolasyon Kiti (50)			
Kit İçeriği	Buffer	Miktar	Açıklama
	Solüsyon SLC (CTAB içerir)	42 ml	Hücre lizisi
	Solüsyon SLS	2 ml	Hücre lizisi
	Solüsyon SP	6 ml	Hücre lizatından DNA arıtma
	Solüsyon SE pH 8.5	40 ml	DNA toplama
	Peptit Kompleksi -20 °C’de saklayınız	2.75 mg	Degradasyon/inaktivasyon
	Kullanım Kılavuzu	1 adet	Protokol
Ek Malzeme	96-100% Etanol, İzopropanol, (Fenol, Kloroform, İzamil Alkol) ve 1,5 mL steril mikrosantrifüj tüpleri		

PCR Protokolü

1. PCR çalışması için gerekli tüm reagentlar buzda bekleterek çözündürülmüştür. Tüpler hafifçe vortekslenip santrifüjlenmiştir (spin).
2. Reaksiyon karışımını hazırlamak üzere hedef DNA dışında tüm reagentlar (SentroMix, primer, su) belirlenen miktarlarda tek tüpe eklenerek hafifçe vortekslenip santrifüjlenmiştir (spin).
3. Plate ya da tüplere önce reaksiyon karışımı, sonra da DNA örnekleri eklenmiş ve bekletmeden cihaza yerleştirilmiştir.

Toplam 25 µl'lik reaksiyona 8 µL SentroMix eklenir.

10 µM Forward primer 1.25 µl (500 nM)

10 µM Reverse primer 1.25 µl (500 nM)

SentroMix 8 µl

H₂O 12.5 µl

Hedef DNA 2 µl

25 µl

Protokol:

95°C 5:00 dk

95°C 0:30 dk

50-65°C 0:30 dk

72°C 1:30 dk

Go to Step 2, 40X

72°C 10:00 dk 4°C ∞

***ahyI* geni;**

İleri primer CTTTCGCAATCGCGTCTTCT

Geri primer ATCGAAACTGTCCTGCTCCA

***ahyR* geni;**

İleri primer CCCATCCTCTCCTGGATGTC

Geri primer CTCCTGAGGGTCATCTTCCC

Agaroz Jel Görüntüleme: %2 agaroz jel TAE buffer içinde 70V'da elektroforez cihazında 50 bp DNA markör ile yürütülmüştür. (Sentromer DNA, 2020; Fernández vd., 2008; Önem, 2013).

3.2.5. Fenolik bileşenlerle virülans üretim ve inhibisyon testleri

Biyofilm inhibitör konsantrasyonunun belirlenmesi (BİK)

Testler için çevreyi algılama sistemi inhibitörleri (QSI) GA, RA, VA Sigma'dan ticari olarak temin edildi. Farklı konsantrasyonlarda (250, 500, 750 ve 1,000 µg ml⁻¹) GA, RA ve VA bileşenlerinin *A. hydrophila*'nın biyofilm oluşturma kabiliyeti

üzerindeki etkisi Thenmozhi vd. (2009)'nın oranlarına göre araştırılmıştır. BİK, kontrolle kıyaslandığında biyofilm oluşumunda toksik etki göstermeyip sadece virulanse inhibe etkisi gösterdiği en etkili konsantrasyon değeri olarak belirlenmiştir (Thenmozhi vd., 2009). Test sonucunda biyofilm inhibisyonu için en etkili konsantrasyon değeri olarak BİK 750 µg ml⁻¹ olarak belirlenmiştir. β-Hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite için de 750 µg ml⁻¹ değeri tüm suşlar için çalışılmıştır.

3.2.5.1. Biyofilm oluşum testi

A. hydrophila suşlarında fenolik bileşenlerinin biyofilm oluşumuna etkisi kristal viyole (CV) yöntemiyle incelenmiştir. Bu amaçla bakteriler TSA besiyerinde 25°C'de 16-18 saat üretilmiştir. Ertesi gün biyofilm oluşumu tespiti için inhibisyon etkisi test edilecek olan fenolik bileşenler DMSO'da çözülerek hazırlanmış ve 200 µl TSB besiyeri olan ependorf tüplere 750 µg ml⁻¹ eklenmiştir. 16-18 saat üretilen bakteri kültürlerinin bulanıklığı 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bulanıklığa ayarlanarak 200 µl TSB+6 µl fenolik bileşen içeren ependorflara 10 µl ilave edilmiştir. Her molekül ve bakteri için üç plastik tüp kullanılmıştır. Her bakteri için besiyeri içeren plastik tüplere sadece bakteri kültürü eklenerek kontrol grupları oluşturulmuştur. Negatif kontrol için sadece TSB besiyeri içeren tüpler kullanılmıştır. 24 saat sonunda ependorf tüplerdeki kültürler OD 570 nm'de okunarak ve değerler kaydedilmiştir. Daha sonra kültür içeren ependorf tüplerin içeriği dökülerek 3 kez saf su ile yıkanmış ve yıkama işlemi tamamlandıktan sonra tüplere %0.1'lik kristal viyole çözeltisinden 250 µl eklenmiştir. 30 dakika kristal viyole ile muamele edilen ependorf tüpler 5 kez saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra 250 µl %95'lik etanol ilavesiyle 15 dakika muamele edilen örnekler 96 kuyucuklu mikropate içerisine aktarılmış ve ELİSA okuyucusunda optik yoğunluk sonuçları 570 nm'de okunmuştur. Sonuçlar biyofilm oluşturma özelliğine sahip olan referans suşla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Önem, 2013; Rajalaxmi vd., 2016; Rama Devi vd., 2016).

3.2.5.2. β-Hemolitik aktivite testi

β-Hemolitik aktivite kalitatif ve kantitatif metotlar kullanılarak tayin edilmiştir. %7 koyun kanı içeren TSA besiyerine belirlenen oranda inhibisyon etkisi araştırılacak

olan fenolik bileşenler 750 µg ml⁻¹ olacak şekilde eklenmiştir ve petri kaplarına döküm yapılmıştır. Daha sonra agar üzerine steril uçlarla çukurlar açılarak *A. hydrophila* suşları 10 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kolonilerin etrafında görülen zon β-hemolitik aktiviteyi göstermiştir. Zon oluşmaması durumunda fenolik bileşenlerin etkinliği belirlenmiştir. Kantitatif analizde ise 100 µl steril bakteri süpernatant kısmı 900 µl %2 yıkanmış koyun eritrositi içeren PBS (Phosphate Buffer Saline) ile karıştırılarak 20 dakika buzda bekletilmiştir. Santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısmı 530 nm de okunarak açığa çıkan hemogloblin miktarı belirlenerek β-Hemolitik aktivite tespit edilmiştir (Scheffer vd., 1988; Rama Devi vd., 2016).

3.2.5.3. Elastolitik aktivite testi

A. hydrophila suşları 10 ml TSB besiyerine inhibiyon etkisi araştırılacak olan fenolik bileşenlerin 750 µg ml⁻¹ eklenerek 25°C'de, çalkalamalı inkübatörde 14-16 saat inkübe edilmiştir. Bu kültürlerin supernatant kısmından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7.5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 25°C'de 3 saat 200 rpm de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve supernatant kısım OD 495 nm'de okunmuştur (Ohman vd., 1980). pH 7.5 dengelemesine gerek duyulduğunda pH'ı düşürmek için kuvvetli asit HCl ve pH'ı yükseltmek için kuvvetli baz NaOH kullanılarak sağlanmıştır (Scheffer vd., 1988).

3.2.6. Moleküler epidemiyolojik ilişki

Değişimli alan jel elektroforezi (pulsed field jel elektroforez, PFGE) yöntemi

Tez kapsamında türler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulmasında kullanılan PFGE yöntemi agaroz içine gömülü bakterinin yapısal bütünlüğünü bozmadan izole edilen kromozomunun, restriksiyon enzimi (RE) ile kesim profilinin belirlenmesi esasına dayanır (Durmaz vd., 2007). PFGE yöntemi uygulanırken aşağıdaki basamaklar izlenmiştir.

Suşların hazırlanması,

1. Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış bakterilerden kanlı triptikaz soy agar besiyerine tek koloni ekimi yapılmış ve bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edilmiştir.
2. Burada oluşan tek koloniden tekrar triptik soy agar besiyerine tek koloni ekimine uygun olarak pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
3. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak 1 (2-3 ml de olabilir) ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (10mM Tris- HCL, 50 mM EDTA, 20mM NaCl, pH 7.2) içinde süspanse edilmiş ve her hücre süspansiyonu 2500 x g'de (yaklaşık 11200 rpm) 4°C'de, 15 dk (alternatif olarak 13000 x g 4C'de 2 dk) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılmış ve pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek pipetaj yapılmıştır.
4. Bakteri yoğunluğu spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık Mc Farland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlanıp, bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dk) agaroz gömülecek ise oda ısısında bekletilmiştir.

Suşların agaroz gömülmesi

1. HST içerisinde %1'lik düşük erime ısıli agaroz (Gibco BRL Paisley, UK) hazırlanmıştır.

5 ml HST + 0,05 gr agaroz

3-5 sn mikrodalgada ara ara bekletilerek kaynatmadan agarozun tamamen erimesi sağlanmıştır.

%1'lik SDS eklenerek

Isı bloğu üzerine yerleştirilen ependorflara aktarılmış

Ependorf tüplere her örnek için 100 µl eklenmiştir.

2. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak 50°C de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısıli agaroz bulunan tüplere eklenip, üzerine 5 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenerek pipetaj yapılmıştır.
3. Bekletmeden hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına (10 mmx 5mmx 1,5 mm, Bio Rad Laboratories) dağıtılıp, kalıplar agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de 10 dk bekletilmiştir. Bu aşamada agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir. Böylece erken

hücre parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalırken agarozun homojen katılaşması sağlanır.

Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml lik steril kapaklı tüplere 0,5 ml hücre lizis solüsyonu (HLS-1) (50mM Tris-HCl (ph 8), 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konulup içerisinde bakteri bulunan agaroz kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilmiş.
2. 37°C de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir.
3. HLS-1 dökülerek yerine 0.5 ml hücre lizis solüsyonu -2 (HLS-2) [ES: 0,5 M EDTA, %1 sarkozil, 400 mg/ ml proteinaz K] eklenip, 55°C de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir.

Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dk bekletilip, HLS-2 dikkatlice aspire edilmiş ve agaroz kalıpları 4 kez (her biri 50°C'de 30 dk olmak üzere) TE [10mM Tris- HCl (pH 7.6), 0.1 mM EDTA] tamponuyla yıkanmıştır.

Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımı ile ¼ oranında kesilip, parçalardan biri 100 µl SpeI tamponu (fermantas–buffer tango) içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dk bekletilecektir (diğer parça -büyük olan daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içerisinde +4°C de saklanmıştır).
2. Her agaroz kalıbı için 10x SpeI tamponu, SpeI enzimi içeren tampon hazırlanıp, bu karışımdan 100 µl ependorf tüplere alınıp içerisine kesilen agaroz kalıplar konulacak ve çalkalamalı su banyosunda 37°C 2 saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dk bekletilecek olup, kalıplar elektroforez için hazır hale gelmiştir.

Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 0.5 X TBE (44.5 mM Trisma base, 44.5 mM Borik asit, 1mM EDTA, pH 8.4) içinde 100 ml olacak şekilde %1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Biorad Laboratories) hazırlanmıştır.
2. Agaroz dökülecek kaset hazırlanıp, sızdırmaması için etrafı bantlanmıştır.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (yani tarağı yatay pozisyonda tutup dişlerin uç kısmına ¼ oranında kesilmiş olan jeller dikkatlice yerleştirilmiştir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yerleştirilmiştir.
4. Kurutma kağıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvı fazlası alınıp, maksimum 5 dk oda ısısında bekletildikten sonra örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla tarak agaroz dökülecek kaset içerisine yerleştirilmiştir.
5. Sıcaklığı 45-50°C olan jel dikkatlice hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde kaset içerisine dökülmüştür.
6. Oda ısısında en az 20 dk katılaşmaya bırakılıp, tarak dikkatlice çıkarılmıştır.
7. Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılıp, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900-2000 ml 0.5 X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilecektir.

Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Biorad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları:

Başlangıç vuruş süresi: 5 sn

Bitiş vuruş süresi: 45 sn

Vuruş açısı: 120°

Akım: 6 V/cm²

Sıcaklık: 14°C

Süre: 20 saat

Sonucun gözlenmesi ve analiz

Elektroforez sonrası jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınıp 20 dakika boyanarak UV ışığı altında görüntülenmiş, biyoinformatik program olarak özel bir program olan BioNumerics 7.5 programı kullanılarak bant profilleri analiz edilmiştir. 'Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturulup ve kümeleşme analizi yapılmıştır. Bantlara bağlı 'Dice' benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlenmiştir (Yetkin vd., 2006). PFGE'de kullanılan "Dice" benzerlik katsayısı belirtilmiştir (%1,5 tolerans, %1 optimizasyon ile).

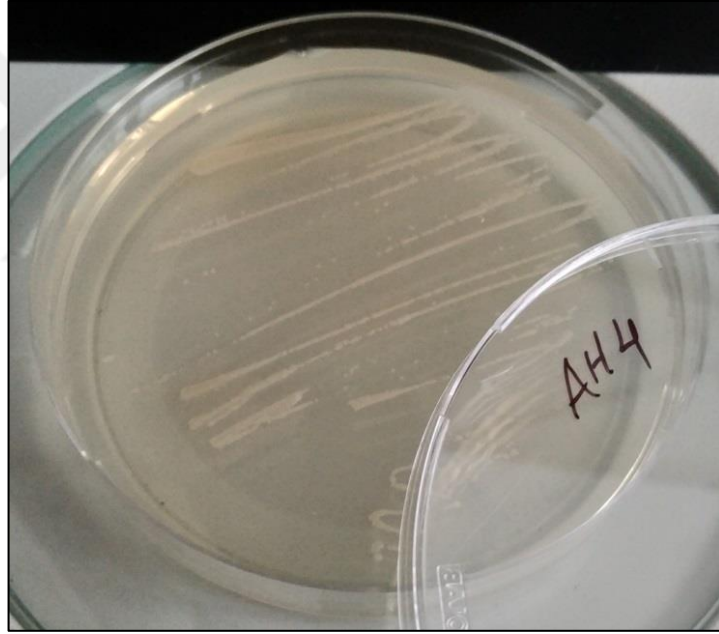
3.2.7. İstatistik

Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Veri setlerinin normallik dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Normal dağılım gösteren parametrik sonuçlar tek yönlü ANOVA testi, normal dağılım göstermeyen non-parametrik sonuçlar ise Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiştir. Farkların hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey HSD ve Dunnett's C post hoc testleri uygulanmıştır. Sonuçlar ile kontrol arasındaki fark $P \leq 0.05$ seviyesinde istatistik olarak değerlendirilmiştir.

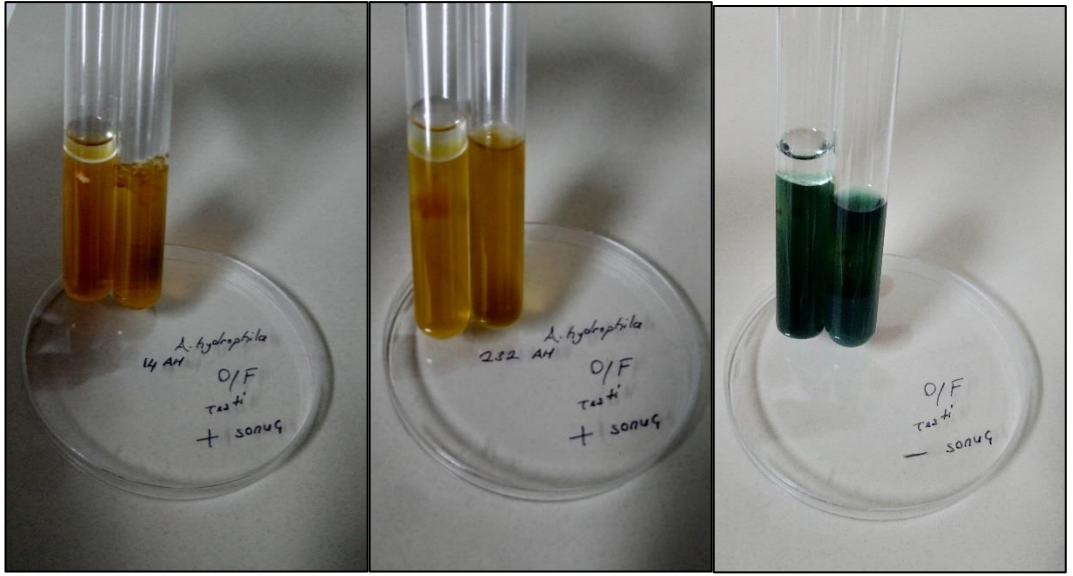
4. BULGULAR

4.1. *A. hydrophila* Suşlarının İdentifikasyonu

Farklı hasta balıklardan izole edilmiş farklı koleksiyonlardan temin edilen *A. hydrophila* suşlarının biyokimyasal özelliklerine ait test sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre suşların tamamının GSP Agarda sarı pigmentli koloni oluşturduğu, Gram (-), sitokrom oksidaz ve katalaz (+), vibriostata dirençli, O/F testinde fermentatif ve hareketlilik testinde hareketli olduğu belirlenmiştir. Böylece çalışılan tüm *A. hydrophila* suşlarının teyidi yapılmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Çizelge 4.1). *A. hydrophila* suşlarının TSA besiyerinde oluşturduğu koloni morfolojisi Şekil 4.1’de verilmiştir.



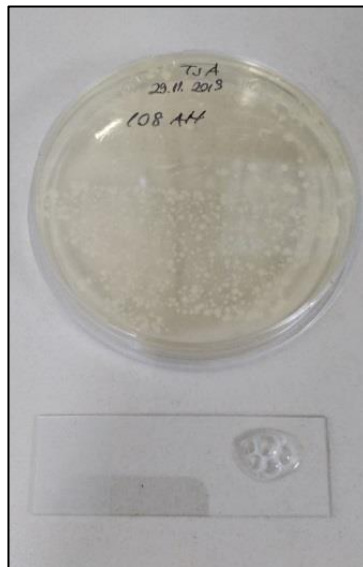
Şekil 4.1. *A. hydrophila*’nın koloni morfolojisi



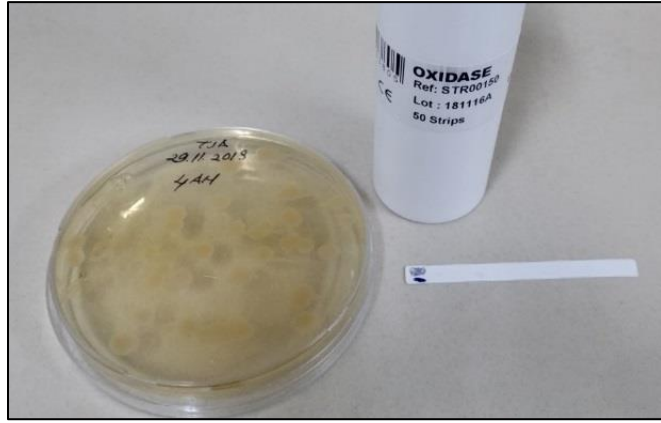
Şekil 4.2. *A. hydrophila* suşlarında O/F testi sonuçları



Şekil 4.3. *A. hydrophila* suşlarında vibriostat testi sonuçları



Şekil 4.4. *A. hydrophila* suşlarında katalaz testi sonuçları



Şekil 4.5. *A. hydrophila* suşlarında sitokrom oksidaz testi sonuçları

Çizelge 4.1. *A. hydrophila* suşlarında fenotipik identifikasyon

Suşı kodu	GSP Agar (Koloni rengi)	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	O/F	Katalaz	O/129 Vibriostat	TSA (Koloni rengi)	AIAB (Koloni rengi)	β-Hemoliz Kanlı Agar
ATCC 7966	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH RSKK 05049	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH SAHA	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH S	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH J	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 2	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 3	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 4	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 12.1	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 14	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 15	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 16	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 108	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 113	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 216	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 217	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 219	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 220	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 222	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 230	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)
AH 232	Sarı	-	+	+	+/+	+	R	Krem	Sarı-yeşil	+ (β)

R: Dirençli

O/F: Oksidatif/Fermentatif

GSP: Glutamate Starch Phenol Red Agar

TSA: Triptik Soy Agar

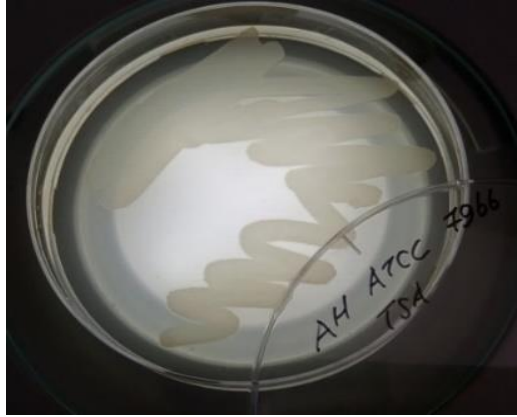
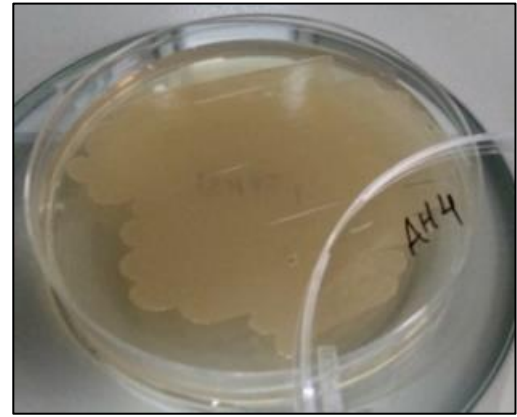
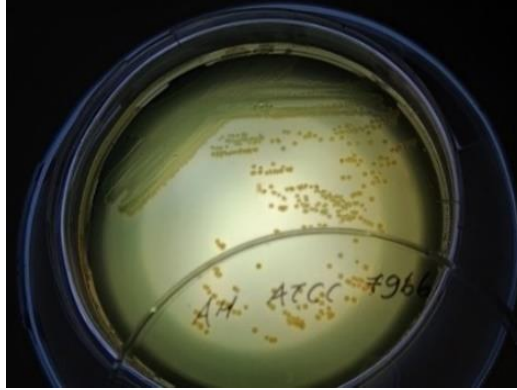
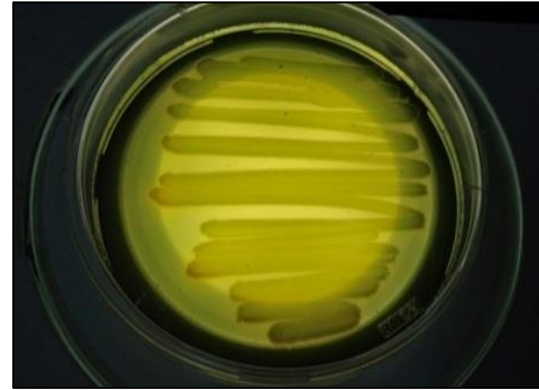
AIAB: Aeromonas Isolation Agar Base

4.3. Farklı Besiyerlerinde (TSA, Aeromonas Isolation Agar Base, GSP, Kanlı Agar) *A. hydrophila* Suşlarının Koloni Profilleri

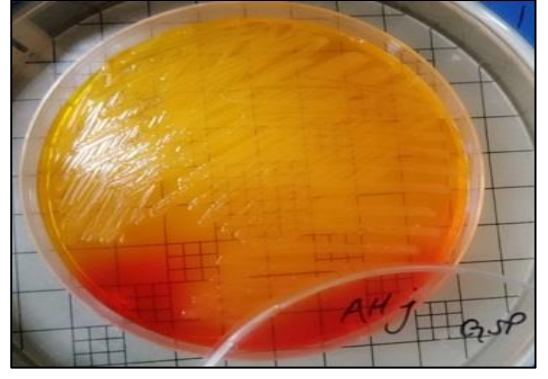
A. hydrophila suşlarının koloni profilleri Tryptic Soy Agar (TSA), Aeromonas Isolation Agar Base, Glutamate starch phenol red (GSP: Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base acc. to KIELWEIN Medium) ve Kanlı Agar besiyerlerinde *A. hydrophila*'nın koloni morfolojisi araştırılmıştır (Çizelge 4.2). Aynı zamanda tez protokolündeki 20 suşun referans suş *A. hydrophila* AH ATCC 7966 ile aynı morfolojide koloni oluşturduğu bulunmuştur.



Çizelge 4.2. TSA, Aeromonas Isolation Agar Base, GSP, Kanlı Agar besiyerlerindeki *A. hydrophila* suşlarının koloni profillerinin *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşuyla desteklenmesi

Bakteri	Besiyeri	Sıcaklık- süre	Koloni morfolojisi sonuç	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 suşunun koloni morfolojisi (Orijinal tez bulguları)	<i>A. hydrophila</i> 'nın diğer tüm suşlarının koloni morfolojisi (Orijinal tez bulguları)
<i>A. hydrophila</i>	Tryptic Soy Agar (TSA)	25°C – 24 h	Büyüme: İyi Koloni rengi: Krem Koloni yapısı: Büyük, 2-3 mm çapında, krem, karakteristik koloni		
<i>A. hydrophila</i>	Aeromonas Isolation Base Mediumda (AIAB)	25°C – 24 h	Büyüme: İyi Koloni rengi: Çok koyu sarı-yeşil Koloni yapısı: Büyük, 2-3 mm çapında, opak, karakteristik koloni		

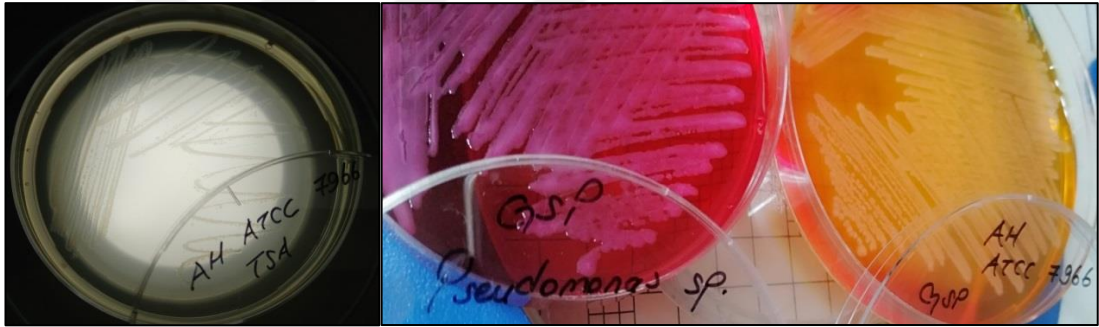
Çizelge 4.2. TSA, Aeromonas Isolation Agar Base, GSP, Kanlı Agar besiyerlerindeki *A. hydrophila* suşlarının koloni profillerinin *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşuyla desteklenmesi (Devam)

<i>A. hydrophila</i>	GSP Agar (Glutamate Starch Phenol Red) “Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base acc. to KIELWEIN Medium”	25°C – 24 h	Büyüme: İyi Koloni rengi: Sarı Koloni yapısı: Büyük, 2-3 mm çapında, sarı, sarı ile çevrili bölge		
<i>A. hydrophila</i>	Kanlı Agar	25°C – 24 h	Büyüme: İyi Koloni rengi: Krem Koloni Yapısı: Büyük, 2-3 mm çapında, düz, krem, dairesel ve dışbükey, β-hemoliz yapan koloni		

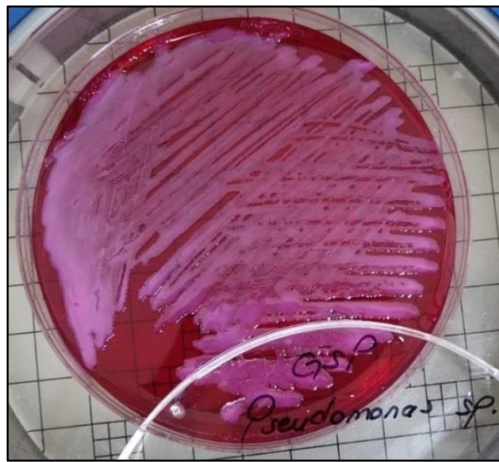
4.4. *A. hydrophila*'nın GSP Agar (Glutamate Starch Phenol Red) *Pseudomonas* Aeromonas Selective Agar Base acc. to KIELWEIN Mediumda Suş Analizi

Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen *Aeromonas* spp. tür ayrımında prensip *Pseudomonas* spp. türlerinin pembe pigmentli koloni oluştururken (Şekil 4.7), *Aeromonas* spp. türlerinin sarı pigmentli koloni oluşturmasıdır.

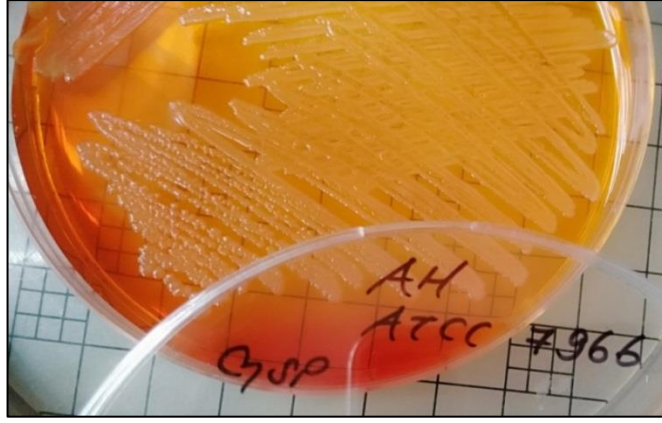
Doğası gereği TSA agarda krem pigmentli koloni oluşturan referans suş ile *A. hydrophila* suşlarının tamamının tür saptanmasında selektif bir besiyeri olan GSP agarda sarı pigmentli koloni oluşturarak pozitif sonuç verdiği ve *Aeromonas* spp. türü olduğu saptanmıştır (Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Testte pozitif kontrol olarak *A. hydrophila* ATCC 7966 suşu (Şekil 4.8) negatif kontrol olarak *Pseudomonas* spp. suşu (Şekil 4.7) kullanılmıştır.



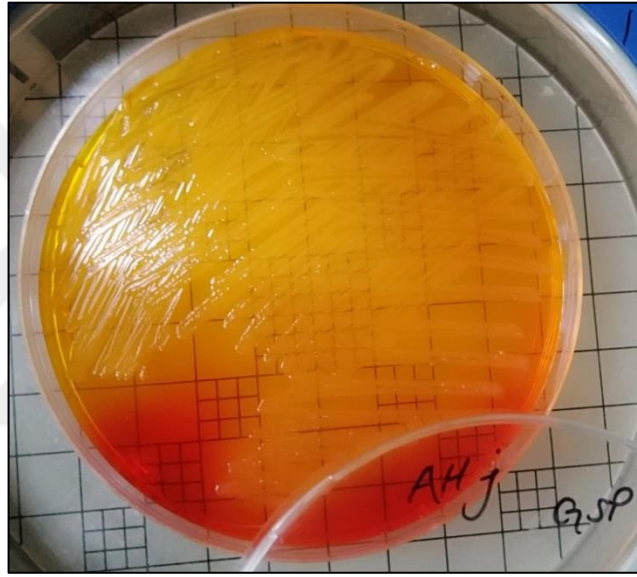
Şekil 4.6. Sırayla orijinal *A. hydrophila* suşu: krem pigmentli koloni, negatif sonuç: *Pseudomonas* sp. pembe pigmentli koloni ve pozitif sonuç: *Aeromonas* sp. sarı pigmentli koloni



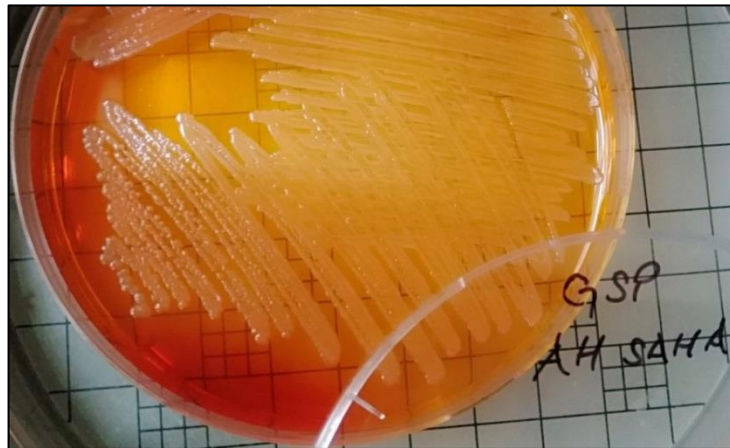
Şekil 4.7. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen negatif kontrol suşu *Pseudomonas* spp.



Şekil 4.8. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşu



Şekil 4.9. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen *A. hydrophila* AHJ suşu



Şekil 4.10. Glutamate starch phenol red (GSP) agarda üreyen *A. hydrophila* AH SAHA suşu

4.5. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemiyle Antibiyogram Testi Sonuçları

Zon çapları mm bazında ölçülerek yapılan bu testte farklı suşların farklı antibiyotiklere karşı oluşturdıkları direnç ve duyarlılıkları belirlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Çizelge 4.3).

Bu araştırmada 20 *A. hydrophila* suşu ve *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşunun antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları incelendiğinde, suşların duyarlılıklarının farklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). *A. hydrophila* suşlarının tamamının 28 antibiyotiğin, 14 tanesine duyarlı olduğu bulunurken 12 tanesine karşı dirençli olduğu ve 2 tanesine orta derecede duyarlı olduğu saptanmıştır.

Araştırma *A. hydrophila* suşlarının oksasilin (%100), ampisilin (%100), vankomisin (%100), penisilin G (%100), klindamisin (%95.23), tilosin (%95.23), oksitetrasiklin (%90.47), ciprofloksazin (%90.47), pristinamisin (%90.47), sefalotin (%80.95), oksolinik asit (%80.95), nitrofurantoin (%61.90) antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu göstermiştir. *A. hydrophila* suşlarının norfloksasin (%100), gentamisin (%95.23), enrofloksasin (%95.23), flumekuin (%90.47), kloramfenikol (%90.47), kolistin (%80.95), streptomisin (%80.95), nalidiksik asit (%71.42), sulfametoksazol/trimetoprim (%71.42), seftriakzon (%66.68), sefoperazon (%52.38), sülfadiazin (%47.61), kanamisin (%47.61), doksisisiklin (%42.85), karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. *A. hydrophila* suşlarının eritromisin (%76.19) ve apramisin (%57.14) antibiyotiklerine karşı orta derecede duyarlı olduğu bulunmuştur. Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *A. hydrophila* suşlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları (CLSI, 2017)

Antibiyotikler	Sensitivity; R: Resistans, S: Susceptible I: Intermediate (Zon çapı: mm) Suşlar																				
	ATCC 7966	AH RSKK 05049	AH SAHA	AH S	AH J	AH 2	AH 3	AH 4	AH 12.1	AH 14	AH 15	AH 16	AH 108	AH 113	AH 216	AH 217	AH 219	AH 220	AH 222	AH 230	AH 232
SD300	S(19)	R(0)	S(20)	R(0)	S(20)	S(16)	S(20)	S(23)	S(18)	I(14)	R(10)	R(0)	S(20)	S(22)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(18)	R(0)	I(13)
NA30	S(26)	R(0)	S(34)	S(30)	S(25)	S(27)	S(27)	S(26)	S(25)	R(0)	S(23)	R(0)	S(25)	I(18)	S(27)	S(22)	S(24)	S(21)	S(25)	R(0)	R(0)
ENR5	S(30)	S(28)	S(40)	S(34)	S(40)	S(31)	S(30)	S(30)	R(10)	S(25)	S(34)	S(35)	S(31)	S(26)	S(31)	S(34)	S(35)	S(34)	S(40)	S(33)	S(27)
CEP75	I(20)	I(19)	S(30)	I(20)	S(24)	I(20)	I(20)	S(22)	S(26)	S(29)	S(25)	I(20)	I(20)	S(30)	I(20)	S(27)	S(26)	R(14)	S(21)	S(22)	I(20)
CT10	S(12)	R(10)	S(13)	S(12)	S(12)	S(13)	S(12)	S(13)	S(14)	S(12)	R(0)	S(12)	S(11)	S(13)	S(20)	S(19)	R(0)	S(15)	S(11)	R(0)	S(13)
T30	R(0)	R(20)	I(23)	R(0)	R(20)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	I(22)	R(9)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(21)	R(0)	R(0)	R(16)	R(0)
NOR10	S(33)	S(33)	S(41)	S(33)	S(35)	S(32)	S(31)	S(32)	S(28)	S(23)	S(19)	S(32)	S(30)	S(20)	S(27)	S(34)	S(24)	S(26)	S(29)	S(24)	S(30)
CRO30	S(25)	S(42)	S(33)	S(24)	S(24)	S(26)	S(25)	S(26)	R(16)	S(31)	I(22)	S(28)	S(25)	R(18)	I(21)	S(30)	R(16)	R(15)	S(26)	R(9)	S(25)
OX1	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(9)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
APR15	I(15)	I(15)	I(15)	I(15)	R(13)	I(14)	I(15)	I(15)	S(18)	I(15)	R(12)	I(15)	I(15)	R(11)	R(13)	I(16)	S(18)	R(12)	R(13)	R(13)	I(16)
CIP5	S(35)	S(28)	S(42)	S(35)	S(38)	S(37)	S(37)	S(35)	S(34)	S(26)	S(33)	S(35)	S(36)	S(30)	S(33)	R(0)	S(37)	I(20)	S(38)	S(26)	S(29)
DA2	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(9)	R(8)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(9)	R(0)	R(0)	S(22)	R(0)
TY15	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(21)	R(0)
FLM30	S(34)	S(43)	S(36)	S(35)	S(34)	S(33)	S(34)	S(34)	S(32)	R(11)	S(31)	S(34)	S(25)	S(36)	S(35)	S(29)	S(31)	S(27)	S(35)	S(27)	I(22)
KF30	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(20)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(8)	R(0)	R(0)	R(10)	S(23)	S(22)	R(0)	S(22)	R(0)	R(7)	R(0)
PT15	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(11)	R(10)	R(0)	R(0)	R(10)	R(0)	R(0)	S(25)	R(10)	R(0)	S(25)	R(11)
F300	R(0)	R(13)	S(26)	R(0)	S(21)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(20)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	S(20)	S(17)	I(15)	R(0)	S(19)	S(23)
CN10	S(20)	R(11)	S(20)	S(20)	S(20)	S(21)	S(20)	S(21)	S(24)	S(20)	S(21)	S(20)	S(21)	S(15)	S(18)	S(21)	S(24)	S(23)	S(21)	S(21)	S(22)
SXT25	S(25)	R(0)	S(29)	R(0)	S(25)	S(27)	S(24)	S(26)	S(23)	S(16)	S(26)	S(25)	S(24)	S(27)	S(26)	R(0)	R(0)	R(0)	S(27)	R(0)	S(21)
OA2	R(0)	R(0)	I(26)	R(0)	I(27)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(18)	R(0)	R(0)	I(25)	R(17)	R(20)	R(20)	I(26)	R(0)	R(22)	R(0)
K30	S(18)	S(19)	S(18)	S(18)	I(16)	I(17)	I(17)	S(18)	S(19)	S(18)	S(20)	S(18)	I(14)	R(0)	R(0)	I(14)	I(17)	R(0)	S(21)	I(14)	I(17)
DO30	I(11)	S(24)	S(24)	S(24)	S(18)	R(10)	I(12)	I(11)	S(22)	S(25)	S(16)	I(12)	R(9)	R(0)	I(12)	I(13)	S(28)	I(13)	R(10)	S(23)	R(10)

Çizelge 4.3. *A. hydrophila* suşlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları (CLSI, 2017) (Devam)

Antibiyotikler	Sensitivity; R: Resistans, S: Susceptible I: Intermediate (Zon çapı: mm) Suşlar																				
	ATCC 7966	AH RSKK 05049	AH SAHA	AH S	AH J	AH 2	AH 3	AH 4	AH 12.1	AH 14	AH 15	AH 16	AH 108	AH 113	AH 216	AH 217	AH 219	AH 220	AH 222	AH 230	AH 232
C30	S(35)	S(36)	S(37)	S(36)	S(32)	S(25)	S(35)	S(36)	S(34)	S(32)	I(16)	S(35)	S(33)	S(18)	S(28)	S(24)	S(34)	S(22)	S(39)	S(30)	R(11)
S10	S(20)	S(21)	S(22)	S(20)	S(22)	S(20)	S(20)	S(20)	S(29)	S(20)	S(25)	S(20)	S(21)	S(18)	R(10)	I(14)	S(28)	I(12)	S(21)	S(16)	R(0)
AM10	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(9)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(9)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
E15	I(15)	I(15)	I(20)	I(14)	I(17)	I(16)	I(15)	I(15)	I(22)	I(13)	I(19)	I(14)	I(14)	R(0)	R(0)	R(0)	I(21)	R(0)	I(17)	S(31)	I(22)
VA30	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)
P10	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)	R(0)

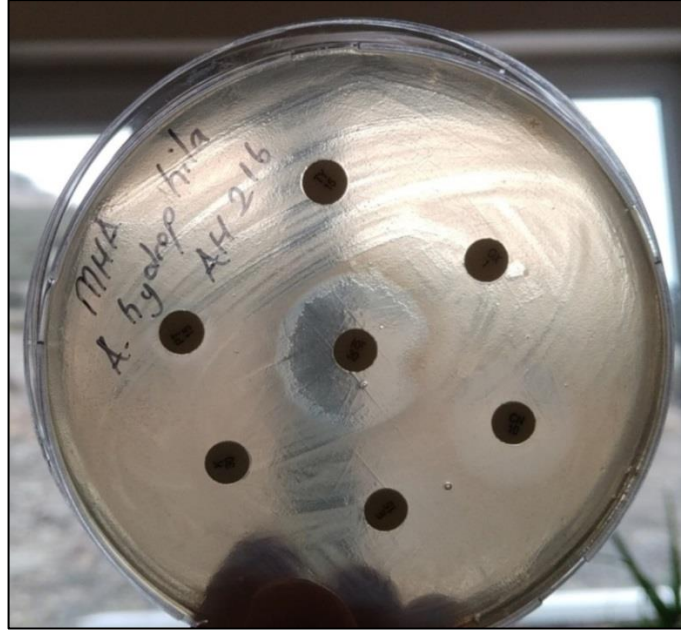
CLSI: The Clinical & Laboratory Standards Institute

R: Resistant: Dirençli, I: Intermediate: Orta duyarlı, S: Susceptible: Duyarlı

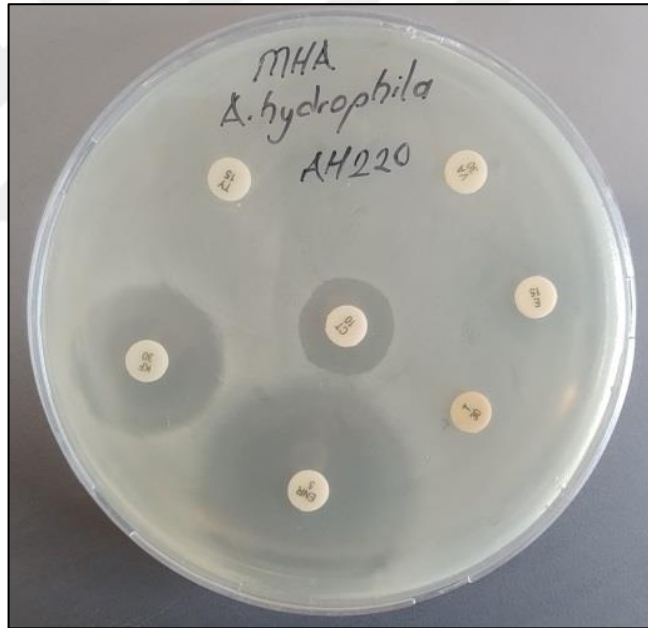
SD300: Sulfadiazine (Sülfadiazin), NA30: Nalidixic Acid (Nalidiksik Asit), ENR5: Enrofloxacin (Enrofloksasin), CEP75: Cefoperazone (Sefoperazon), CT10: Colistin (Kolistin), T30: Oxytetracycline (Oksitetrasiklin), NOR:10 Norfloxacin (Norfloksasin), CRO30: Ceftriaxone (Seftriakzon), OX1: Oxacillin (Oksasilin), APR15: Apramycin (Apramisin), CIP5: Ciprofloxacin (Siprofloksasin), DA2: Clindamycin (Klindamisin), TY15: Tylosin (Tilosin), FLM30: Flumequine (Flumekuini), KF30: Cephalothin (Sefalotin), PT15: Pristinamycin (Pristinamisin), F300: Nitrofurantoin (Nitrofurantoin), CN10: Gentamicin (Gentamisin), SXT25: Sulphamethoxazole/Trimethoprim (Sulfametoksazol/Trimetoprim), OA2: Oxolinic Acid (Oksolinik asit), K30: Kanamycin (Kanamisin), DO30: Doxycycline (Doksisiklin), C30: Chloramphenicol (Kloramfenikol), S10: Streptomycin (Streptomisin), AM10: Ampicillin (Ampisilin), E15: Erythromycin (Eritromisin), VA30: Vancomycin (Vankomisin), P10: Penicillin G (Penisilin G)

Çizelge 4.4. Antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

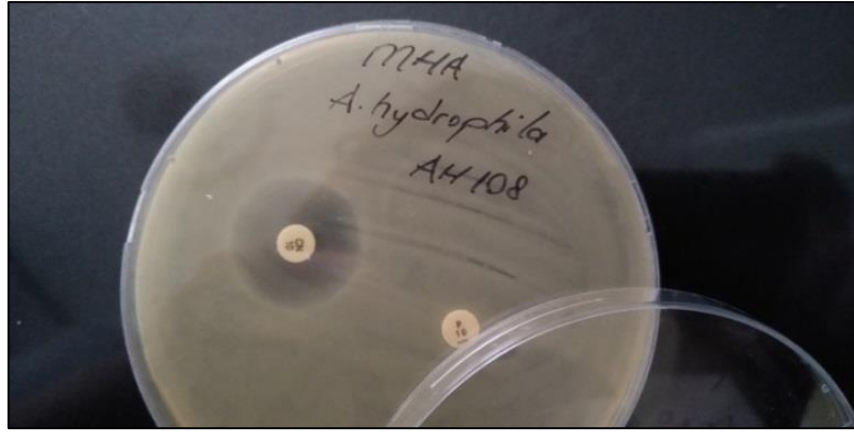
Antibiyotik	Antibiyotik Konsantrasyonu	Dirençli Suş Sayısı ve Yüzdesi	Orta Duyarlı Suş Sayısı ve Yüzdesi	Duyarlı Suş Sayısı ve Yüzdesi
SD300	(300 µg)	9 (%42,85)	2 (%9,52)	10 (%47,61)
NA30	(30 µg)	5 (%23,80)	1 (%4,76)	15 (%71,42)
ENR5	(5 µg)	1 (%4,76)	0 (%0)	20 (%95,23)
CEP75	(75 mcg)	1 (%4,76)	9 (%42,85)	11 (%52,38)
CT10	(10 mcg)	4 (%19,04)	0 (%0)	17 (%80,95)
T30	(30 mcg)	19 (%90,47)	2 (%9,52)	0 (%0)
NOR10	(10 mcg)	0 (%0)	0 (%0)	21 (%100)
CRO30	(30 mcg)	5 (%23,80)	2 (%9,52)	14 (%66,68)
OX1	(1 mcg)	21 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
APR15	(15 mcg)	7 (%33,33)	12 (%57,14)	2 (%9,52)
CIP5	(5 mcg)	1 (%4,76)	1 (%4,76)	19 (%90,47)
DA2	(2 µg)	20 (%95,23)	0 (%0)	1 (%4,76)
TY15	(15 mcg)	20 (%95,23)	0 (%0)	1 (%4,76)
FLM30	(30 µg)	1 (%4,76)	1 (%4,76)	19 (%90,47)
KF30	(30 mcg)	17 (%80,95)	0 (%0)	4 (%19,04)
PT15	(15 mcg)	19 (%90,47)	0 (%0)	2 (%9,52)
F 300	(300 µg)	13 (%61,90)	1 (%4,76)	7 (%33,33)
CN10	(10 µg)	1 (%4,76)	0 (%)	20 (%95,23)
SXT25	(25 µg)	6 (%28,57)	0 (%0)	15 (%71,42)
OA2	(2 µg)	17 (%80,95)	4 (%19,04)	0 (%0)
K30	(30 µg)	3 (%14,28)	8 (%38,09)	10 (%47,61)
DO30	(30 µg)	5 (%23,80)	7 (%33,33)	9 (%42,85)
C30	(30 µg)	1 (%4,76)	1 (%4,76)	19 (%90,47)
S10	(10 µg)	2 (%9,52)	2 (%9,52)	17 (%80,95)
AM10	(10 µg)	21 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
E15	(15 µg)	4 (%19,04)	16 (%76,19)	1 (%4,76)
VA30	(30 µg)	21 (%100)	0 (%0)	0 (%0)
P10	(10 UNITS)	21 (%100)	0 (%0)	0 (%0)



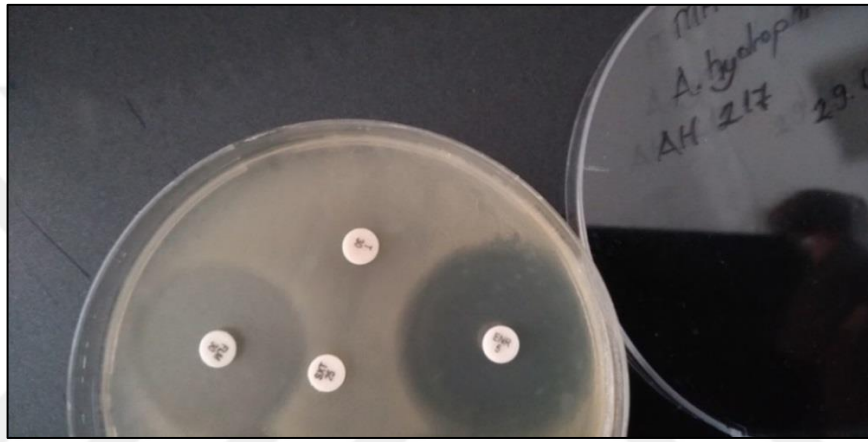
Şekil 4.11. *A. hydrophila* AH 216 suşunun KF30 ve CN10'a duyarlılığı, E15, K30, PT15, TY15, OX1'e karşı direnci



Şekil 4.12. *A. hydrophila* AH 220 suşunun antibiyogram sonucu



Şekil 4.13. *A. hydrophila* AH 108 suşunun CN10'a duyarlılığı ve P10'a direnci



Şekil 4.14. *A. hydrophila* AH 217 suşunun ENR5'e, FLM30'a duyarlılığı ve T30'a, SXT25'e direnci



Şekil 4.15. *A. hydrophila* AH 217 suşunun antibiyogram sonucu

4.6. *ahyI*, *ahyR* Genlerinin PCR ile Analizi Sonuçları

Araştırmada PCR yöntemiyle *A. hydrophila ahyI* ve *ahyR* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Suşlardan DNA ekstraksiyonu yapıp UV spektrofotometrede konsantrasyon ve saflık değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.6). Hedef genlere uygun primerler sentezlenip amplikon boyları *ahyI* geni için 78 bp, *ahyR* geni için 86 bp olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

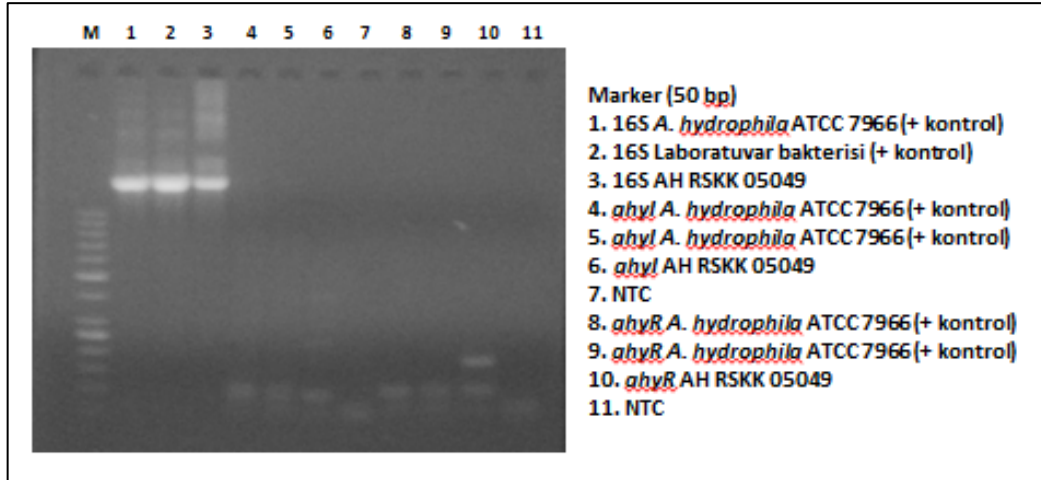
A. hydrophila suşlarının tamamında QS sistemine ait *ahyI*, *ahyR* genlerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).

Çizelge 4.5. *ahyI* ve *ahyR* genlerine sahip olan suşlar

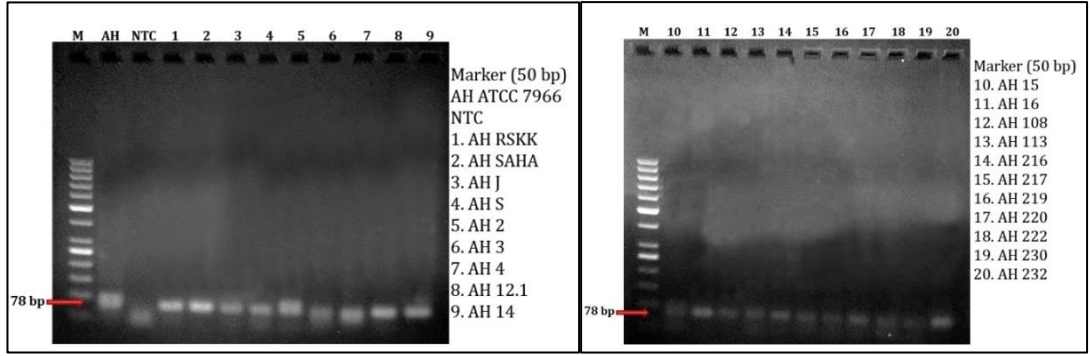
Suş Kodu	<i>ahyI</i> geni (78 bp amplikon)	<i>ahyR</i> geni (86 bp amplikon)
ATCC 7966	+	+
AH RSKK 05049	+	+
AH SAHA	+	+
AH S	+	+
AH J	+	+
AH 2	+	+
AH 3	+	+
AH 4	+	+
AH 12.1	+	+
AH 14	+	+
AH 15	+	+
AH 16	+	+
AH 108	+	+
AH 113	+	+
AH 216	+	+
AH 217	+	+
AH 219	+	+
AH 220	+	+
AH 222	+	+
AH 230	+	+
AH 232	+	+

Çizelge 4.6. Suşların UV-Spektrofotometre Sonuçları

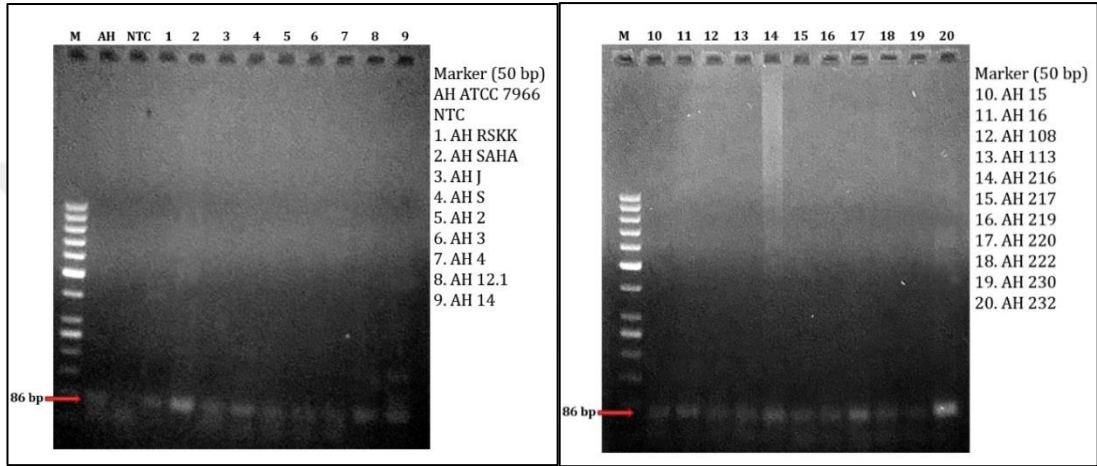
Suş Kodu	ng/ul	260/280	260/230
ATCC 7966	717.10	2.06	1.45
AH RSKK 05049	75.16	2.14	1.79
AH SAHA	288.01	2.00	1.86
AH S	585.19	2.05	1.91
AH J	435.69	2.03	2.04
AH 2	96.12	1.93	1.11
AH 3	1346.67	1.58	1.11
AH 4	84.42	2.02	1.34
AH 12.1	85.95	2.06	2.10
AH 14	137.54	2.08	1.93
AH 15	167.82	1.82	1.06
AH 16	302.90	2.06	1.95
AH 108	440.81	2.06	1.77
AH 113	553.01	2.13	1.92
AH 216	365.10	2.01	1.73
AH 217	145.31	1.72	1.01
AH 219	818.60	2.27	2.17
AH 220	553.60	1.99	2.01
AH 222	365.41	1.93	1.78
AH 230	251.45	2.16	1.88
AH 232	342.86	1.98	1.99



Şekil 4.16. AH RSKK 05049 suşunda 16S, *ahl*, *ahyR* genleri jel görüntüsü



Şekil 4.17. *ahyI* geni jel görüntüsü



Şekil 4.18. *ahyR* geni jel görüntüsü

4.7. Fenolik Bileşenlerle Virülans Üretim ve İnhibisyon Testlerinin Sonuçları

Virülans faktörleri üretim ve inhibisyon testlerinde kullanılan fenolik bileşenler Gallik Asit (GA), Rosmarinik Asit (RA) ve Vanilik Asit (VA)'tır.

4.7.1. Biyofilm oluşumu test sonuçları

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör adaylarının bakteri gelişimini engellemeyip sistem üzerine inhibisyon aktivitesinin olması istenmektedir. Yaptığımız bu çalışmada çevreyi algılama sistemi üzerine potansiyel inhibitör adayı olarak tespit edilen GA, RA ve VA fenolik bileşenleri çalışılmıştır.

A. hydrophila suşlarının tamamının biyofilm virülesini oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.19). Fenolik bileşenler GA, RA ve VA'nın çevreyi algılama sisteminin

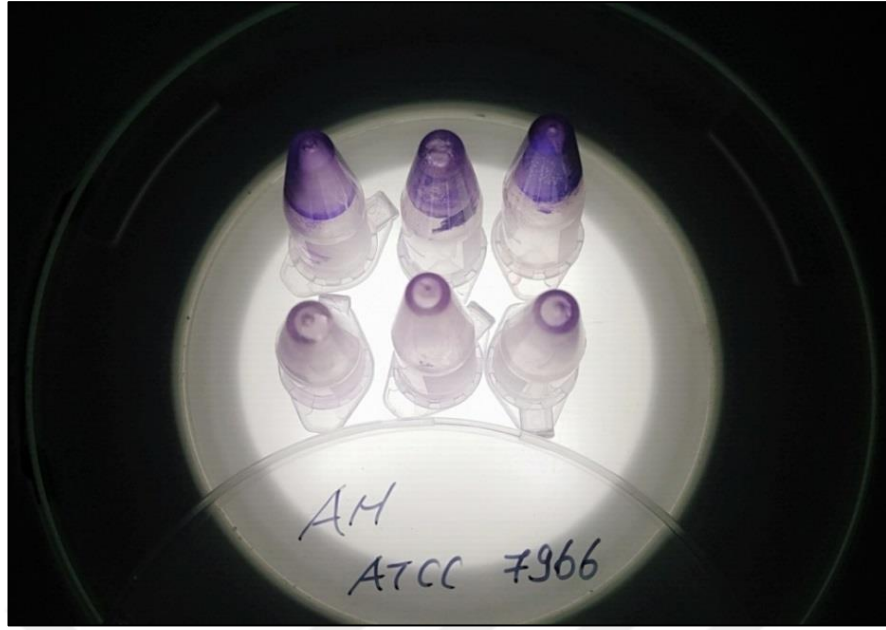
yönetimindeki bu virölans faktörünü tüm suşlarda engellediği bulunmuştur. *A. hydrophila* suşlarının biyofilm oluşumu ve biyofilm inhibisyon sonuçları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. Özellikle RA’in biyofilmi daha iyi engellediği belirlenmiştir.

Ön testlerde *A. hydrophila*’nın biyofilmi üzerinde inhibisyon etki noktası $750 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlenmiş ve bu orandaki gallik asit (GA), rosmarinik asit (RA) ve vanilik asit (VA) fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* suşlarının virölans gücü olan biyofilm üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

İnkübasyon sonucunda ependorflardaki *A. hydrophila* suşları dökülerek patojene ait biyofilm kristal viyoleyle boyanmıştır (Şekil 4.19) Stereo Mikroskop ışığının yardımıyla ependorflardaki *A. hydrophila*’nın biyofilm görüntüsü ve biyofilm inhibisyonu görüntüsü alınmıştır (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.19. Kristal viyole ile boyanma sonrası *A. hydrophila* suşlarının ependorfta biyofilm oluşumu



Şekil 4.20. *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşunun biyofilmi (üst) ve sırayla GA, RA ve VA fenoliklerinin biyofilm inhibisyonu (alt)



Şekil 4.21. *A. hydrophila* AH 220 suşunun biyofilmi (üst) ve sırayla GA, RA ve VA fenoliklerinin biyofilm inhibisyonu (alt)



Şekil 4.22. *A. hydrophila* AH 230 suşunun biyofilmi (üst) ve sırayla GA, RA ve VA fenoliklerinin biyofilm inhibisyonu (alt)

Çizelge 4.7. *A.hydrophila* suşlarının biyofilm virülansı ve biyofilm inhibisyon sonuçları

	Negatif	AH ATCC 7966	AH RSKK 05049	AH SAHA	AH S	AH J	AH 2	AH 3	AH 4	AH 12.1	AH 14	AH 15	AH 16	AH 108	AH 113	AH 216	AH 217	AH 219	AH 220	AH 222	AH 230	AH 232
Biyofilm	0,049	0,211	0,190	0,409	0,199	0,301	0,201	0,251	0,283	0,392	0,181	0,175	0,193	0,203	0,302	0,298	0,288	0,199	0,290	0,256	0,261	0,300
Biyofilm	0,049	0,222	0,188	0,402	0,201	0,297	0,205	0,259	0,291	0,385	0,189	0,156	0,199	0,218	0,322	0,281	0,290	0,191	0,289	0,248	0,263	0,309
Biyofilm	0,048	0,219	0,181	0,400	0,198	0,291	0,210	0,248	0,296	0,399	0,170	0,153	0,176	0,206	0,319	0,271	0,273	0,189	0,275	0,278	0,255	0,301
GA Biyofilm	0,050	0,131	0,140	0,301	0,109	0,258	0,161	0,184	0,203	0,292	0,149	0,101	0,162	0,132	0,222	0,202	0,202	0,109	0,195	0,176	0,193	0,284
GA Biyofilm	0,053	0,130	0,139	0,312	0,168	0,237	0,152	0,178	0,199	0,280	0,145	0,102	0,159	0,152	0,202	0,201	0,223	0,123	0,183	0,208	0,187	0,254
GA Biyofilm	0,060	0,101	0,145	0,317	0,182	0,232	0,148	0,167	0,203	0,287	0,160	0,129	0,142	0,148	0,243	0,251	0,213	0,134	0,178	0,212	0,200	0,203
RA Biyofilm	0,069	0,111	0,175	0,299	0,112	0,235	0,202	0,174	0,199	0,202	0,099	0,100	0,113	0,119	0,109	0,200	0,191	0,099	0,187	0,159	0,191	0,095
RA Biyofilm	0,061	0,105	0,108	0,279	0,121	0,207	0,191	0,159	0,200	0,181	0,091	0,106	0,112	0,108	0,107	0,192	0,187	0,111	0,172	0,142	0,199	0,101
RA Biyofilm	0,065	0,107	0,112	0,265	0,108	0,243	0,186	0,168	0,198	0,176	0,100	0,098	0,106	0,132	0,101	0,191	0,179	0,159	0,131	0,169	0,200	0,098
VA Biyofilm	0,061	0,178	0,190	0,323	0,099	0,243	0,098	0,131	0,200	0,300	0,100	0,099	0,133	0,184	0,192	0,098	0,201	0,109	0,090	0,136	0,161	0,222
VA Biyofilm	0,056	0,182	0,108	0,342	0,174	0,217	0,205	0,159	0,097	0,254	0,089	0,103	0,139	0,158	0,200	0,200	0,197	0,091	0,163	0,128	0,173	0,209
VA Biyofilm	0,051	0,139	0,121	0,301	0,128	0,211	0,162	0,200	0,189	0,200	0,079	0,106	0,115	0,102	0,189	0,171	0,183	0,089	0,157	0,078	0,151	0,201

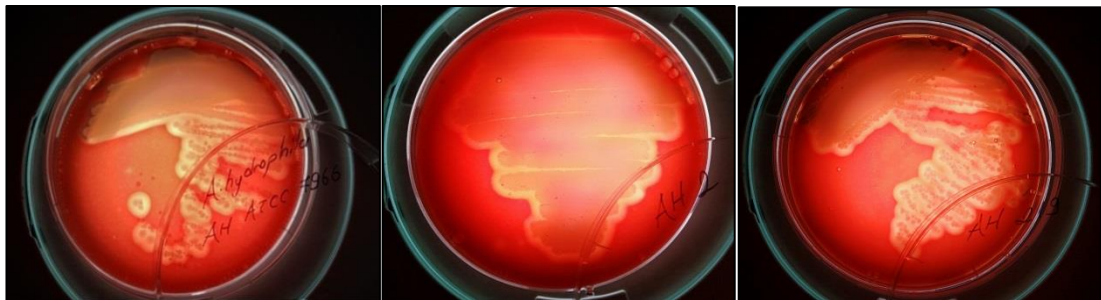
4.7.2. β -Hemolitik aktivite testi sonuçları

A. hydrophila suşlarının tamamının kanlı agarda eritrositleri büyük boyutlarda liziz etmesiyle β -hemolitik aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 4.23). Kalitatif ve kantitatif analizlerin ikisinde de tüm suşların β -hemolitik aktivitesi pozitif bulunmuş ve fenolik bileşenler GA, RA ve VA'nın çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki bu virülansı tüm suşlarda engellediği bulunmuştur.

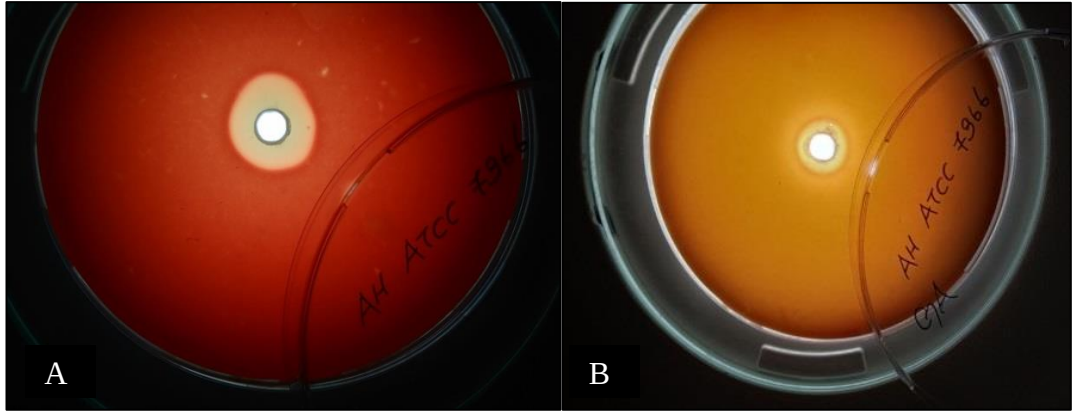
Ön testlerde *A. hydrophila*'nın β -hemolitik aktivitesi üzerinde inhibisyon etki noktası $750 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlenmiş ve bu orandaki gallik asit (GA), rosmarinik asit (RA) ve vanilik asit (VA) fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* suşlarının virülans gücü olan β -hemolitik aktivitesi üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30).

A. hydrophila'nın kanlı agarda yaptığı hemoliz zon çapı ölçülerek β -hemolitik aktivitesi kaydedilmiş ve Gallik Asit İçeren Kanlı Agar (GA-KA), Rosmarinik Asit İçeren Kanlı Agar (RA-KA) ve Vanilik Asit İçeren Kanlı Agar (VA-KA) olmak üzere fenolik içeren kanlı agarlarda da oluşturduğu zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirilmiş böylece inhibisyon tespit edilmiştir. Zon çapları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Kalitatif analizde zonlardaki küçülme fenolik bileşenlerin β -hemolitik aktiviteyi engellediği anlamına gelmektedir. En iyi inhibisyon etkisini VA'nın gösterdiği tespit edilmiştir. VA'nın bazı suşlarda hemoliz zon çapını sıfırladığının bulunması inhibisyon açısından çok dikkat çekicidir (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29).



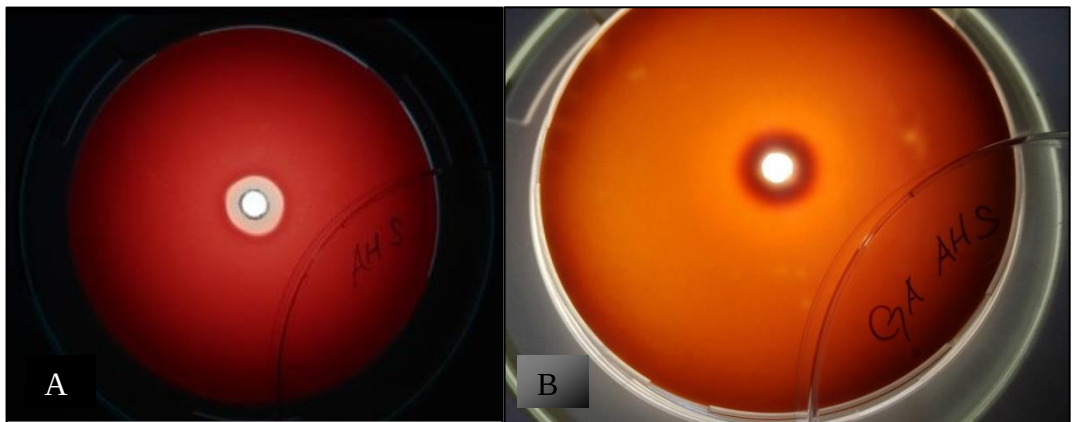
Şekil 4.23. *A. hydrophila* ATCC 7966, AH 2 ve AH 219 suşlarının kanlı agarda β -hemolitik aktivite oluşturmaları



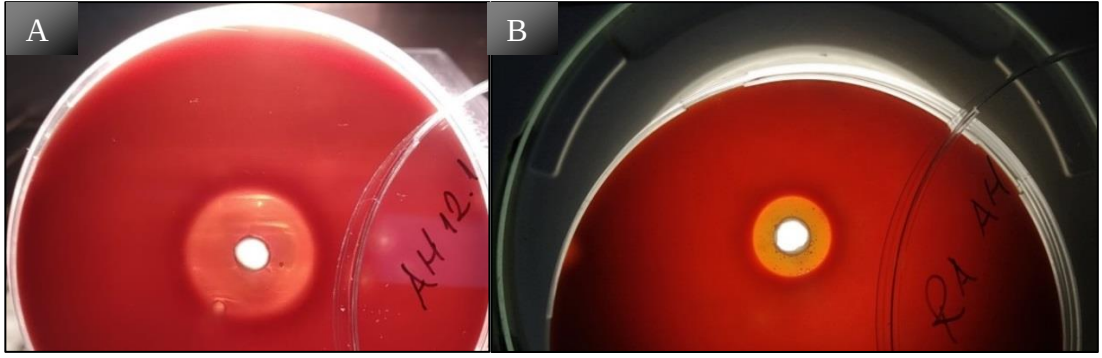
Şekil 4.24. A. *A. hydrophila* AH ATCC 7966 suşunun kanlı agarda 17 mm hemoliz zonu ve B. AH ATCC 7966 suşunda GA-KA'da 12 mm zonla 5 mm'lik hemoliz inhibisyonu



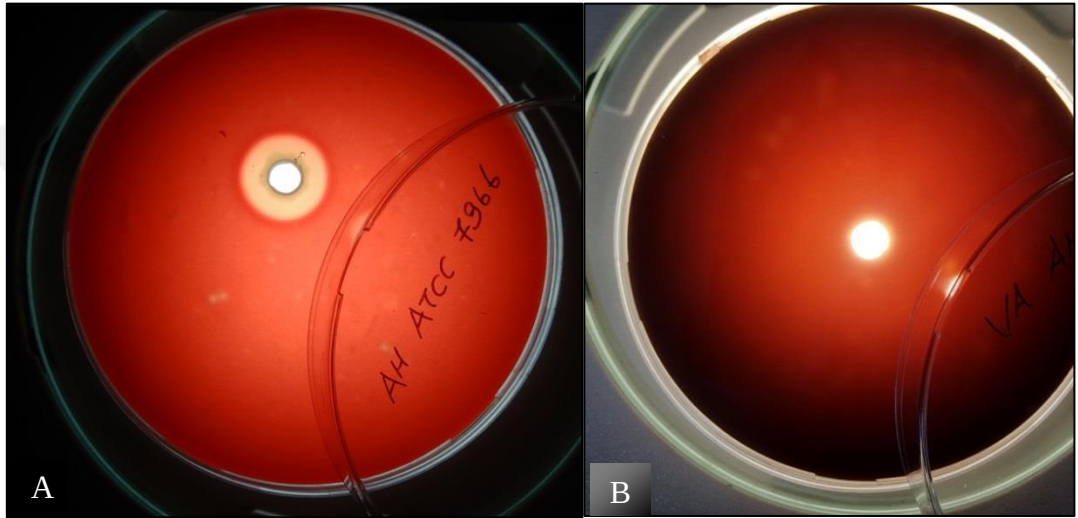
Şekil 4.25. A. *A. hydrophila* AH 219 suşunun kanlı agarda 17 mm hemoliz zonu ve B. AH 219 suşunda GA-KA'da 0 mm zonla 17 mm'lik hemoliz inhibisyonu



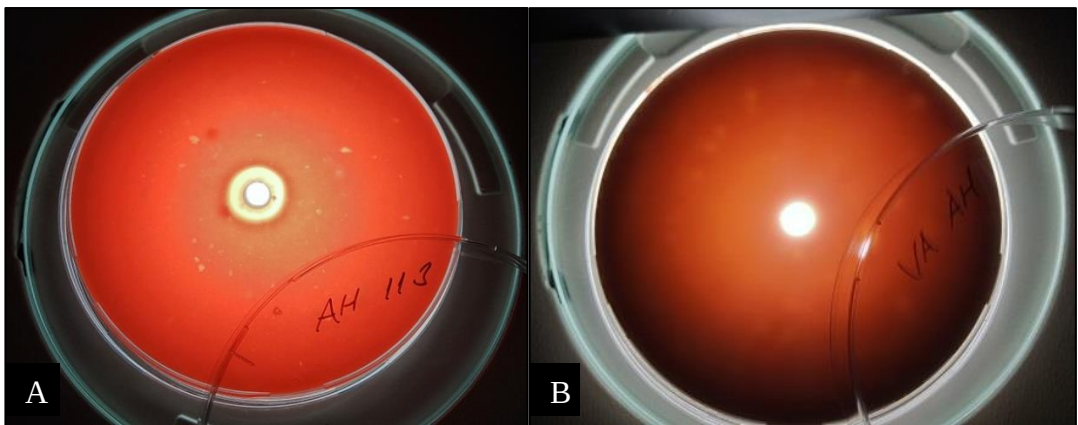
Şekil 4.26. A. *A. hydrophila* AH S suşunun kanlı agarda 13 mm hemoliz zonu ve B. AH S suşunda GA-KA 0 mm zonla 13 mm'lik hemoliz inhibisyonu



Şekil 4.27. A. *A. hydrophila* AH 12.1 suşunun kanlı agarda 24 mm hemoliz zonu ve B. AH 12.1 suşunda RA-KA 19 mm zonla 5 mm'lik hemoliz inhibisyonu



Şekil 4.28. A. *A. hydrophila* AH ATCC 7966 suşunun kanlı agarda 17 mm hemoliz zonu ve B. AH ATCC 7966 suşunda VA-KA'da 0 mm zonla 17 mm'lik hemoliz inhibisyonu



Şekil 4.29. A. *A. hydrophila* AH 113 suşunun kanlı agarda 12 mm hemoliz zonu ve B. AH 113 suşunda VA-KA'da 0 mm zonla 13 mm'lik hemoliz inhibisyonu

Çizelge 4.8. *A. hydrophila* suşlarının β -hemolitik aktivite zon çaplarının mm ölçüm sonuçları

	AH ATC C 7966	AH RSK K 0504 9	AH SAH A	AH S	AH J	AH 2	AH 3	AH 4	AH 12.1	AH 14	AH 15	AH 16	AH 108	AH 113	AH 216	AH 217	AH 219	AH 220	AH 222	AH 230	AH 232
Hemoliz Zonu (mm)	17	15	12	13	16	17	16	15	24	17	10	10	16	12	11	12	17	14	13	20	15
Hemoliz Zonu (mm)	16	15	13	14	16	17	16	15	24	16	10	9	15	12	11	11	17	15	13	20	15
Hemoliz Zonu (mm)	17	15	13	13	16	17	16	15	24	15	10	9	15	12	12	11	17	15	13	20	14
GA Hemoliz Zonu (mm)	12	13	9	0	10	14	12	11	22	15	9	10	14	10	9	12	0	14	13	12	14
GA Hemoliz Zonu (mm)	12	13	9	0	10	13	13	12	21	15	9	9	14	12	9	13	0	13	12	12	12
GA Hemoliz Zonu (mm)	12	12	11	0	10	14	12	11	22	15	8	9	14	12	10	12	0	15	13	13	14
RA Hemoliz Zonu (mm)	15	15	11	10	13	13	14	12	19	14	10	11	14	11	11	12	16	12	10	16	10
RA Hemoliz Zonu (mm)	14	13	12	13	13	13	14	12	19	13	10	10	16	12	11	10	15	12	13	17	10
RA Hemoliz Zonu (mm)	15	13	11	13	12	13	15	12	19	15	9	10	13	11	12	10	14	12	11	18	10
VA Hemoliz Zonu (mm)	0	9	8	0	0	10	7	13	9	11	10	8	9	0	7	0	0	0	9	0	7
VA Hemoliz Zonu (mm)	0	9	8	0	0	9	7	14	9	10	11	8	0	0	7	0	0	8	0	0	10
VA Hemoliz Zonu (mm)	0	9	9	0	0	9	7	13	9	11	9	8	0	0	7	7	0	0	0	0	10

Araştırmada kantitatif analizle açığa çıkan hemoglobin miktarı belirlenmiştir (şekil 4.30). β -hemolitik aktivitenin inhibisyonun kantitatif analiz sonularındada GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila*’nın bu virölans gücüne etki ettiği bulunmuştur. En iyi inhibisyon etkisini VA’in gösterdiği tespit edilmiştir. *A. hydrophila* suşlarının β -hemolitik aktivitesi ve β -hemolitik aktivitesinin inhibisyon sonuçları izelge 4.9’da gösterilmiştir.



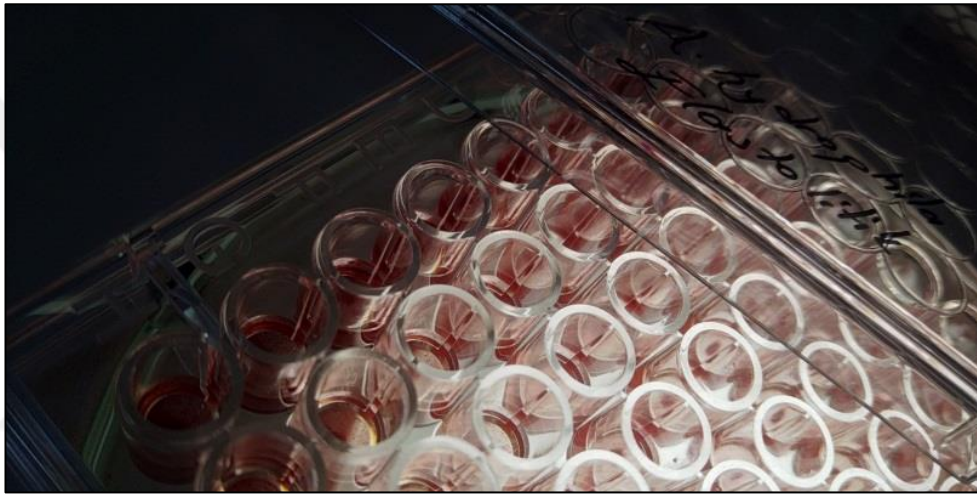
şekil 4.30. Kantitatif analiz için %2 yıkanmış koyun eritrositi içeren PBS ile karıştırılan ve buzda bekletilmek üzere hazırlanan *A. hydrophila* AH ATCC 7966 suşunun hemoglobin miktarı tespiti için santrifüje hazırlanması

Çizelge 4.9. *A.hydrophila* suşlarının β -hemolitik aktivitesi ve β -hemolitik aktivitesinin inhibisyon sonuçları

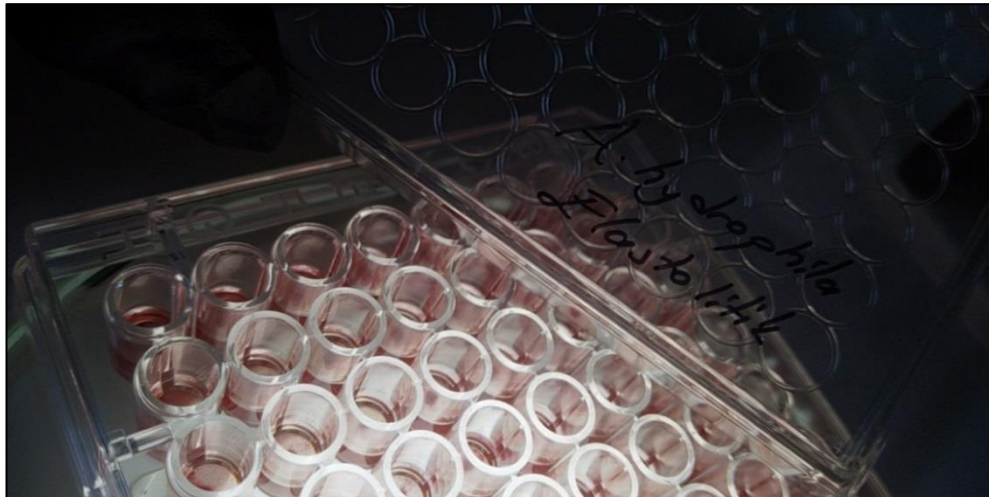
	Negatif	AH ATCC 7966	AH RSKK 05049	AH SAHA	AH S	AH J	AH 2	AH 3	AH 4	AH 12.1	AH 14	AH 15	AH 16	AH 108	AH 113	AH 216	AH 217	AH 219	AH 220	AH 222	AH 230	AH 232
β -hemolitik	0,050	0,111	0,100	0,209	0,301	0,350	0,069	0,121	0,120	0,391	0,151	0,075	0,092	0,034	0,102	0,148	0,088	0,091	0,091	0,096	0,111	0,092
β -hemolitik	0,051	0,102	0,191	0,213	0,203	0,341	0,101	0,13	0,292	0,302	0,111	0,099	0,089	0,092	0,111	0,111	0,029	0,091	0,077	0,098	0,093	0,099
β -hemolitik	0,048	0,216	0,151	0,207	0,317	0,295	0,121	0,149	0,202	0,203	0,121	0,059	0,101	0,206	0,112	0,121	0,073	0,088	0,075	0,078	0,09	0,103
GA β -hemolitik	0,031	0,101	0,091	0,179	0,294	0,235	0,061	0,091	0,102	0,321	0,101	0,071	0,091	0,034	0,092	0,081	0,081	0,071	0,071	0,076	0,101	0,081
GA β -hemolitik	0,051	0,101	0,131	0,183	0,171	0,302	0,091	0,104	0,272	0,262	0,100	0,091	0,069	0,072	0,101	0,071	0,089	0,082	0,067	0,078	0,073	0,089
GA β -hemolitik	0,048	0,201	0,131	0,197	0,265	0,221	0,082	0,109	0,302	0,153	0,100	0,079	0,099	0,186	0,022	0,091	0,056	0,068	0,055	0,069	0,079	0,093
RA β -hemolitik	0,050	0,102	0,091	0,173	0,271	0,301	0,061	0,101	0,092	0,311	0,101	0,054	0,101	0,052	0,094	0,111	0,081	0,088	0,063	0,076	0,101	0,088
RA β -hemolitik	0,031	0,102	0,161	0,183	0,183	0,311	0,099	0,102	0,202	0,284	0,112	0,073	0,081	0,071	0,082	0,101	0,034	0,091	0,071	0,090	0,049	0,099
RA β -hemolitik	0,044	0,201	0,131	0,167	0,267	0,221	0,101	0,119	0,176	0,183	0,098	0,059	0,099	0,166	0,101	0,111	0,071	0,062	0,081	0,093	0,059	0,081
VA β -hemolitik	0,051	0,111	0,078	0,109	0,201	0,157	0,061	0,101	0,012	0,302	0,101	0,067	0,081	0,084	0,031	0,083	0,065	0,079	0,067	0,065	0,100	0,092
VA β -hemolitik	0,05	0,095	0,101	0,111	0,103	0,171	0,101	0,093	0,191	0,234	0,078	0,091	0,073	0,109	0,078	0,081	0,067	0,074	0,071	0,058	0,083	0,069
VA β -hemolitik	0,041	0,116	0,101	0,119	0,199	0,185	0,101	0,079	0,152	0,165	0,082	0,068	0,101	0,096	0,094	0,12	0,061	0,081	0,071	0,091	0,079	0,073

4.7.3. Elastolitik aktivite testi sonuçları

Ön testlerde *A. hydrophila*'nın elastolitik aktivitesi üzerinde inhibisyon etki noktası $750 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlenmiş ve bu orandaki gallik asit (GA), rosmarinik asit (RA) ve vanilik asit (VA) fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* suşlarının virülans gücü olan elastolitik aktivitesi üzerinde önemli derecede inhibisyon etkisinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.31 ve Şekil 4.32). *A. hydrophila* suşlarının elastolitik aktivitesi ve elastolitik aktivitesinin inhibisyon sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Elastolitik aktivite üzerinde en iyi inhibe etkisini VA'nın gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 4.31. *A. hydrophila* suşlarının elastolitik aktivite ölçümü



Şekil 4.32. VA'nın *A. hydrophila* suşlarında elastolitik aktivite üzerine etkisi

Biyofilm, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite virülans güçleri ilgili genlerin ekspresyonu ile ortaya çıkmaktadır. Yapılan inhibisyon testleriyle GA, RA ve VA

fenolik bileşenlerinin biyofilm, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite virölans güçlerini önemli derece inhibe ettiği belirlenmiştir. Sonuçlar yorumlandığında biyofilm üzerinde RA'nın, β -hemolitik aktivite üzerinde VA'nın, elastolitik aktivite üzerinde VA'nın en iyi inhibe etkisi gösterdiği bulunmuştur.



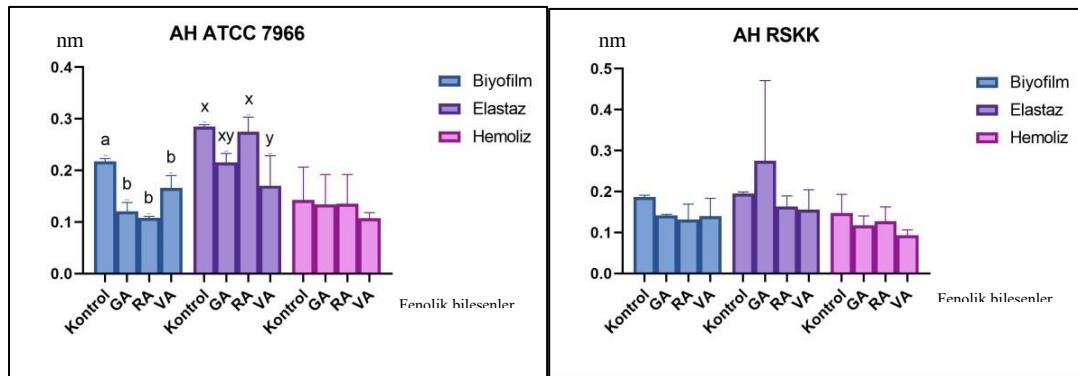
Çizelge 4.10. *A. hydrophila* suşlarının elastolitik aktivitesi ve elastolitik aktivitesinin inhibisyon sonuçları

	Negatif	AH ATCC 7966	AH RSKK 05049	AH SAHA	AH S	AH J	AH 2	AH 3	AH 4	AH 12.1	AH 14	AH 15	AH 16	AH 108	AH 113	AH 216	AH 217	AH 219	AH 220	AH 222	AH 230	AH 232
Elastolitik	0,044	0,282	0,191	0,389	0,204	0,489	0,263	0,291	0,281	0,401	0,200	0,281	0,279	0,376	0,299	0,212	0,275	0,201	0,202	0,283	0,290	0,301
Elastolitik	0,042	0,284	0,199	0,399	0,212	0,478	0,204	0,298	0,271	0,415	0,191	0,259	0,292	0,395	0,291	0,201	0,251	0,281	0,217	0,292	0,283	0,289
Elastolitik	0,043	0,289	0,195	0,401	0,267	0,491	0,219	0,234	0,256	0,398	0,187	0,292	0,299	0,399	0,300	0,178	0,234	0,265	0,173	0,294	0,251	0,291
GA Elastolitik	0,052	0,21	0,174	0,309	0,201	0,391	0,201	0,251	0,203	0,311	0,131	0,275	0,213	0,323	0,233	0,171	0,202	0,199	0,201	0,216	0,261	0,222
GA Elastolitik	0,051	0,202	0,501	0,299	0,213	0,307	0,217	0,259	0,201	0,293	0,108	0,156	0,229	0,338	0,272	0,195	0,199	0,191	0,193	0,198	0,233	0,279
GA Elastolitik	0,050	0,235	0,151	0,361	0,248	0,311	0,210	0,248	0,199	0,299	0,157	0,253	0,276	0,351	0,267	0,362	0,201	0,489	0,204	0,278	0,225	0,301
RA Elastolitik	0,049	0,279	0,181	0,312	0,177	0,349	0,211	0,222	0,179	0,355	0,143	0,279	0,258	0,341	0,299	0,042	0,195	0,201	0,202	0,233	0,282	0,276
RA Elastolitik	0,052	0,301	0,176	0,390	0,200	0,375	0,201	0,224	0,141	0,357	0,123	0,300	0,272	0,371	0,231	0,191	0,151	0,301	0,216	0,241	0,271	0,300
RA Elastolitik	0,059	0,245	0,134	0,311	0,201	0,382	0,101	0,165	0,186	0,310	0,172	0,201	0,259	0,369	0,285	0,178	0,094	0,262	0,173	0,278	0,211	0,295
VA Elastolitik	0,064	0,199	0,101	0,239	0,134	0,359	0,278	0,202	0,199	0,299	0,121	0,282	0,123	0,301	0,214	0,162	0,199	0,171	0,302	0,201	0,299	0,234
VA Elastolitik	0,042	0,209	0,193	0,211	0,112	0,318	0,165	0,217	0,184	0,230	0,101	0,139	0,262	0,312	0,263	0,181	0,171	0,181	0,117	0,134	0,203	0,212
VA Elastolitik	0,041	0,104	0,174	0,204	0,153	0,291	0,178	0,097	0,189	0,271	0,141	0,222	0,221	0,286	0,221	0,131	0,200	0,160	0,103	0,298	0,202	0,199

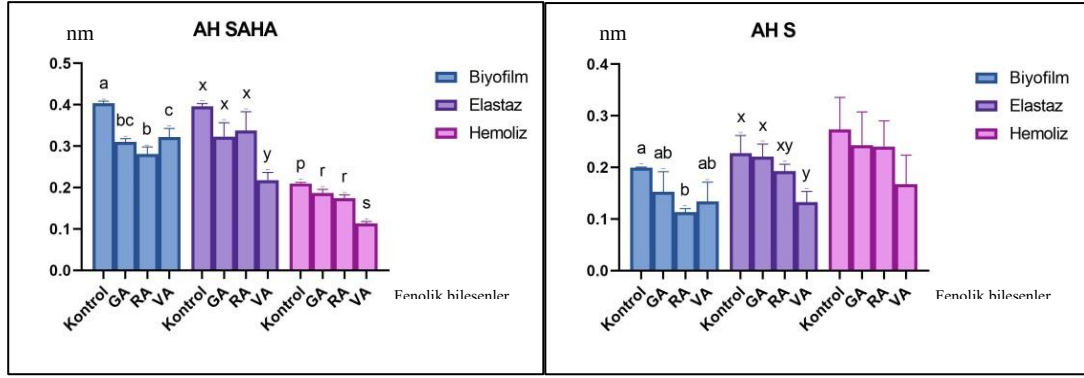
4.8. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin AH ATCC 7966, AH RSKK 05049, AH SAHA, AH S, AH J, AH 2, AH 3 Suşlarında Biyofilm Oluşumu, β -hemolitik Aktivite ve Elastolitik Aktivite Üzerine Etkisi

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör adaylarının bakteri gelişimini engellemeyip sistem üzerine inhibisyon aktivitesinin olması istenmektedir. Yaptığımız bu çalışmada çevreyi algılama sistemi üzerine GA, RA, VA bileşenlerinin toksik olmayıp en iyi inhibisyon etki gösterdiği 750 $\mu\text{g ml}^{-1}$ derişiminde çalışılmıştır. Biyofilm oluşum testi sonuçlarına göre ATCC 7966, AH SAHA, AH S, AH J, AH 3 suşlarında çalışılan derişimde her üç fenolik bileşğin de inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elastolitik aktivite üzerine ise AH ATCC 7966, AH SAHA, AH S suşlarında sadece vanilik asit inhibisyon etki gösterirken AH J suşu üzerine her üç fenolik bileşen de inhibisyon göstermiştir. AH 3'ün gösterdiği elastolitik aktiviteye ise etkisi araştıran fenolik bileşenlerden hiçbirinin anlamlı inhibisyon etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen suşlardan AH RSKK 05049, AH 2'nin ürettiği virülans faktörleri ile biyofilm oluşumu üzerine fenolik bileşenlerin hiçbirisi etkili olmamıştır (Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36).

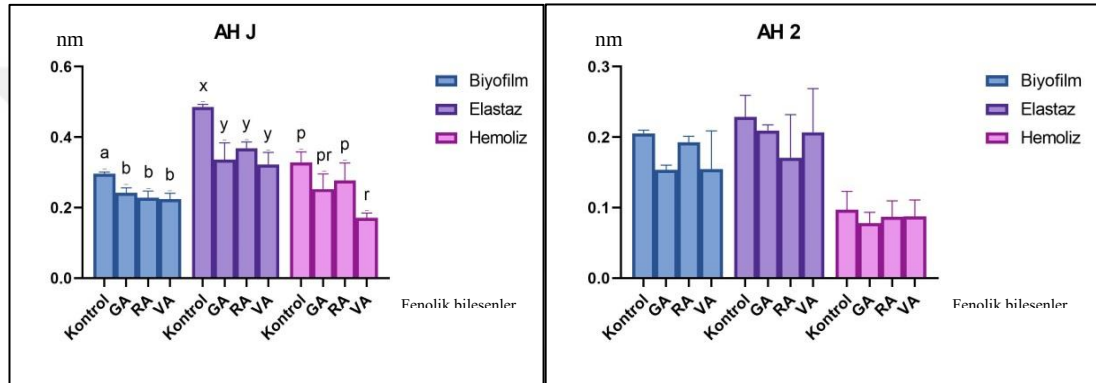
Fenolik bileşiklerin virülans faktörleri üzerinde gösterdiği inhibisyon etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.05$).



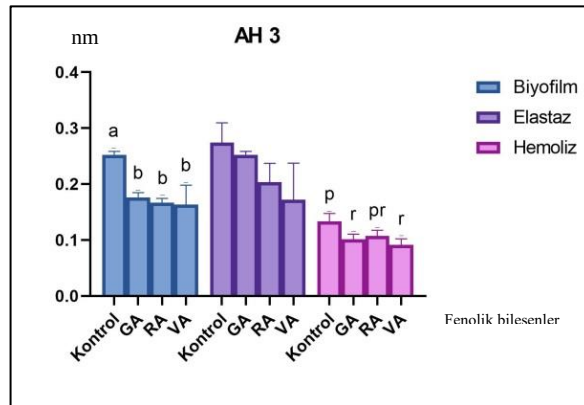
Şekil 4.33. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH ATCC 7966 ve AH RSKK 05049 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.34. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH SAHA ve AH S suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.35. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH J ve AH 2 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



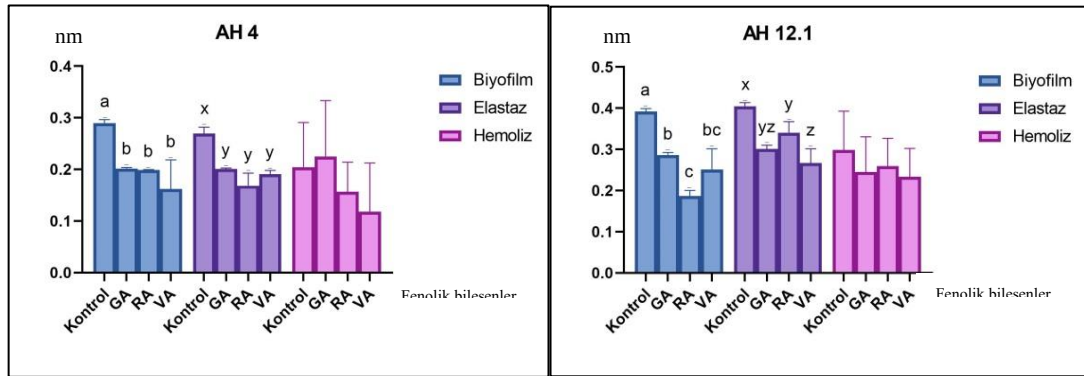
Şekil 4.36. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 3 suşunda biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi

4.9. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin AH 4, AH 12.1, AH 14, AH 15, AH 16, AH 108, AH 113 Suşlarında Biyofilm Oluşumu, β -hemolitik Aktivite ve Elastolitik Aktivite Üzerine Etkisi

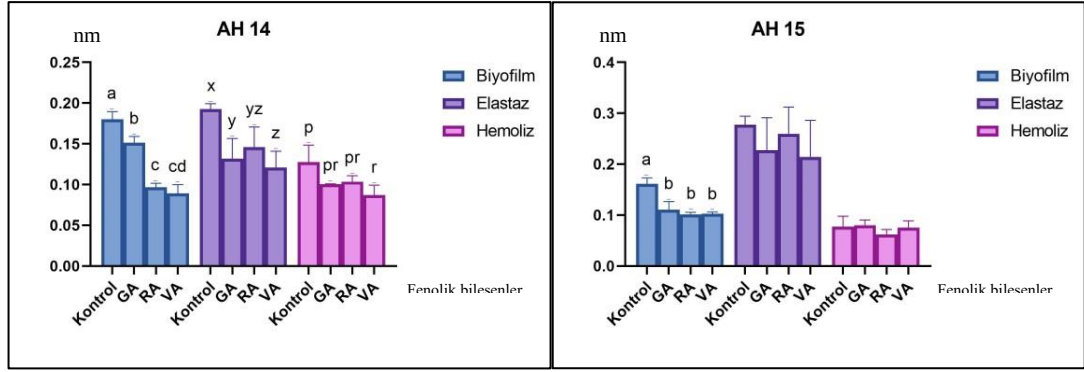
AH 4, AH 12.1, AH 14, AH 15, AH 16, AH 108, AH 113 suşlarında biyofilm oluşumu üzerine çalışılan derişimde ($750 \mu\text{g ml}^{-1}$) her üç fenolik bileşğin de inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Elastolitik aktivite üzerine ise AH 4, AH 12.1, AH 14 suşlarında üç fenolik bileşeninde inhibisyon etki gösterirken AH 15, AH 16, AH 108, AH 113 suşları üzerine üç fenolik bileşenin de anlamlı inhibisyon etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Araştırılan suşlardan sadece AH 14 suşunun β -hemolitik aktivitesi üzerine üç fenolik bileşeninde istatistiki açıdan anlamlı inhibisyon etki gösterirdiği belirlenirken AH 4, AH 12.1, AH 15, AH 16, AH 108, AH 113 suşlarının β -hemolitik aktivitesi üzerine fenolik bileşenlerin hiçbirinin istatistiki açıdan etkili olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39 ve Şekil 4.40).

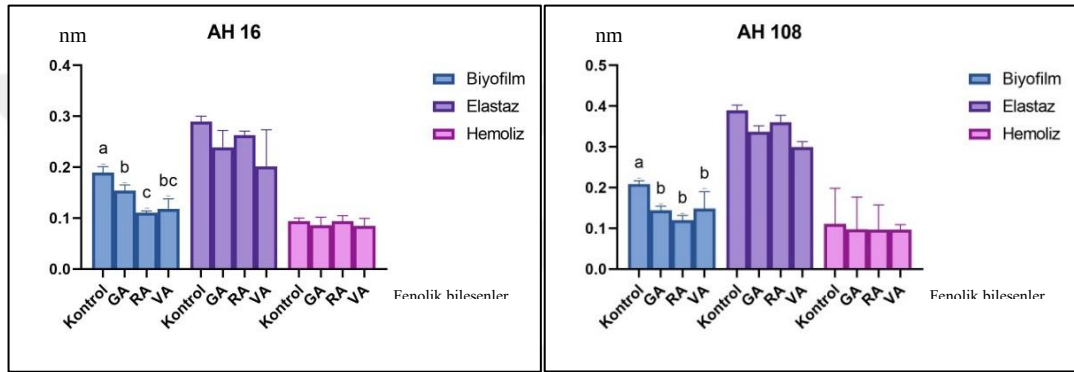
Fenolik bileşiklerin virölans faktörleri üzerinde gösterdiği inhibisyon etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.05$).



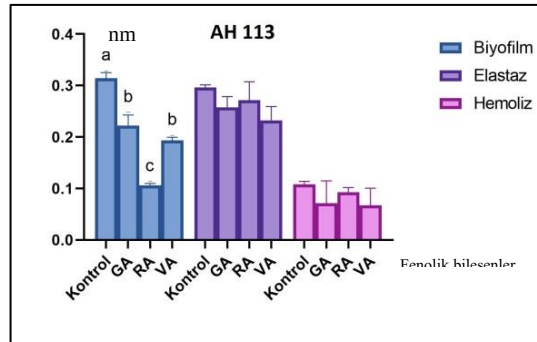
Şekil 4.37. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 4 ve AH 12.1 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.38. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 14 ve AH 15 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.39. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 16 ve AH 108 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



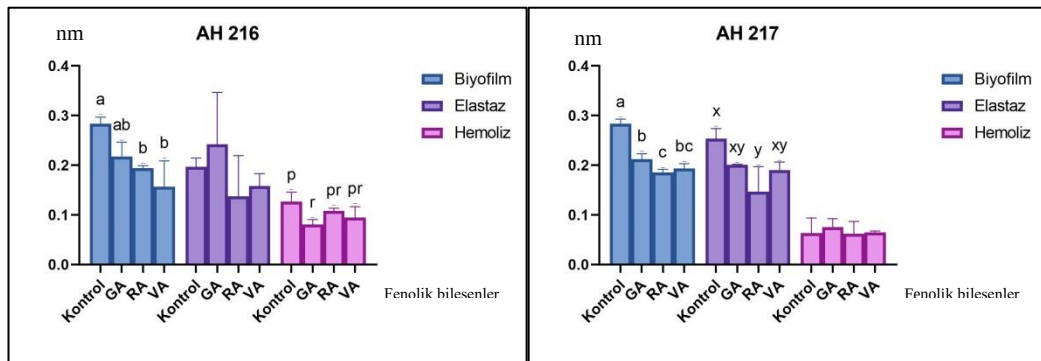
Şekil 4.40. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 113 suşunda biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi

4.10. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin AH 216, AH 217, AH 219, AH 220, AH 222, AH 230, AH 232 Suşlarında Biyofilm Oluşumu, β -hemolitik Aktivite ve Elastolitik Aktivite Üzerine Etkisi

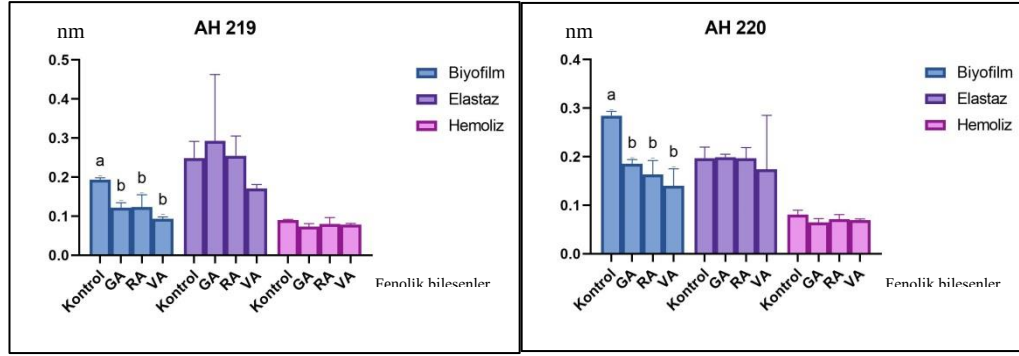
AH 216, AH 217, AH 219, AH 220, AH 222, AH 230, AH 232 suşlarının çalışılan derişimde ($750 \mu\text{g ml}^{-1}$) biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine etkisi araştırılan fenolik bileşenlerin değişik oranlarda inhibisyon etki gösterdiği gözlenmiştir. Bu sounuçlardan elastolitik aktivite üzerine sadece AH 217 suşunda üç fenolik bileşeninde inhibisyon etki gösterirken AH 216, AH 219, AH 220, AH 222, AH 230, AH 232 suşları üzerine üç fenolik bileşenin de anlamlı inhibisyon etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Araştırılan suşlardan sadece AH 216 suşunun B-hemolitik aktivitesi üzerine üç fenolik bileşeninde istatistiki açıdan anlamlı inhibisyon etki gösterirdiği belirlenirken AH 217, AH 219, AH 220, AH 222, AH 230, AH 232 suşlarının B-hemolitik aktivitesi üzerine fenolik bileşenlerin hiçbirinin istatistiki açıdan etkili olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43 ve Şekil 4.44).

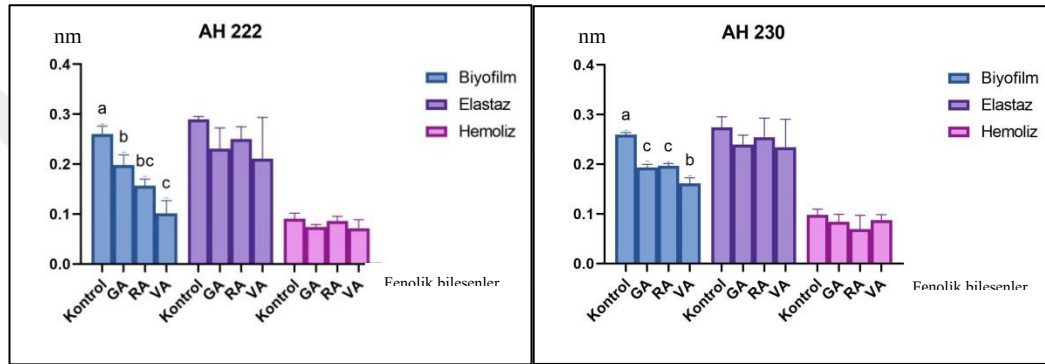
Fenolik bileşenlerin virülans faktörleri üzerinde gösterdiği inhibisyon etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.05$).



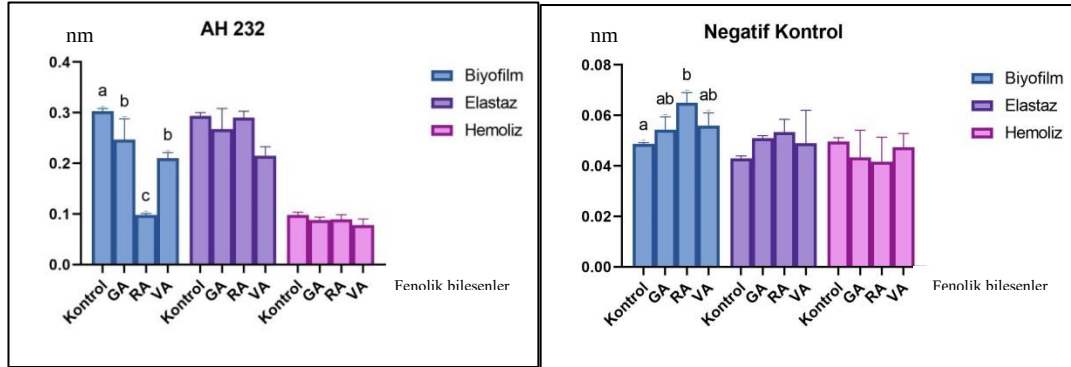
Şekil 4.41. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 216 ve AH 217 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.42. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 219 ve AH 220 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.43. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 222 ve AH 230 suşlarında biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi



Şekil 4.44. Negatif kontrol ve GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 232 suşunda biyofilm oluşumu, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine inhibisyon etkisi

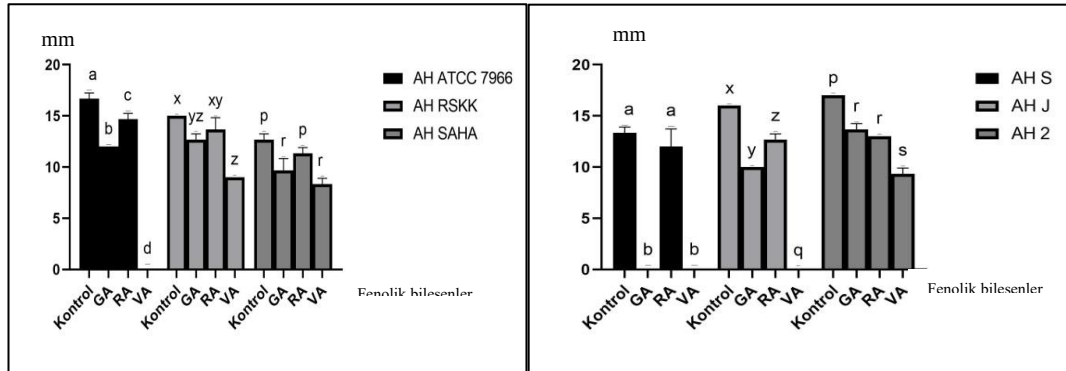
a b c d p r s x y z ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir.

4.11. GA, RA ve VA Fenolik Bileşenlerinin Tüm Suşlarda β -hemolitik Zon Çapı Üzerine Etkisi

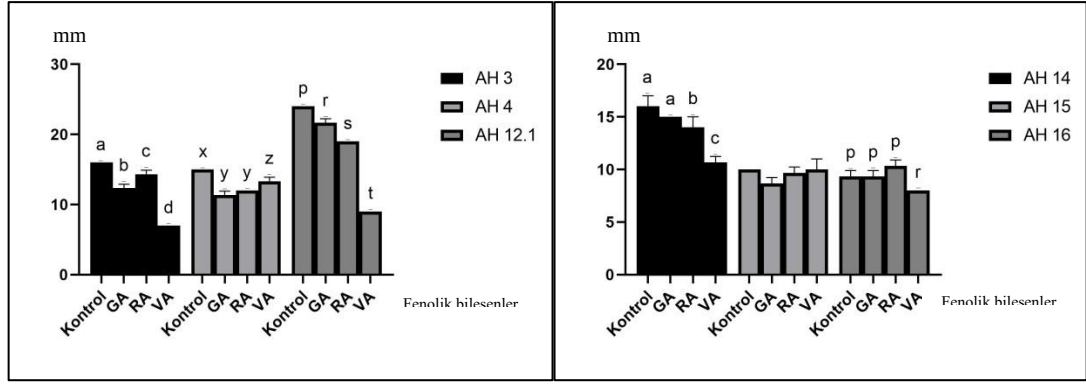
A. hydrophila suşlarının hastalık yapmada rolü olan β -hemolitik aktivite (kalitatif: zon çapı ölçümüyle araştırma) virülans faktörü üzerine inhibisyon etkisi araştırılan fenolik bileşenler GA, RA ve VA'nın inhibisyon etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışılan derişimde ($750 \mu\text{g ml}^{-1}$) β -hemolitik aktivite kalitatif yani zon çapı ölçümü testi sonuçlarına göre; AH ATCC 7966, AH RSKK 05049, AH SAHA, AH S, AH J, AH 2, AH 3AH 4, AH 12.1, AH 14, AH 16, AH 108, AH 113, AH 216, AH 217, AH 219, AH 220, AH 222, AH 230, AH 232 suşlarında çalışılan derişimde her üç fenolik bileşğin de istatistiksel olarak anlamlı inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Sadece AH 15 suşunda üç fenolik bileşeninde anlamlı inhibisyon etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.45, Şekil 4.46, Şekil 4.47 ve Şekil 4.48).

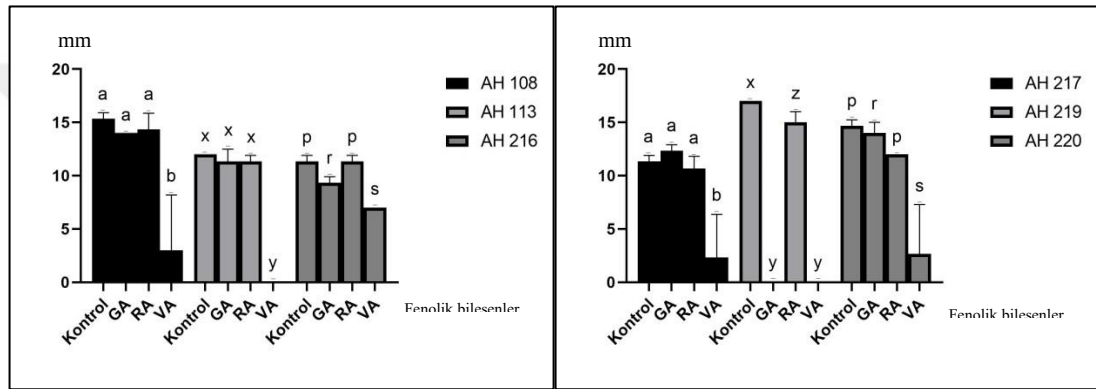
Fenolik bileşiklerin virülans faktörleri üzerinde gösterdiği inhibisyon etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.05$).



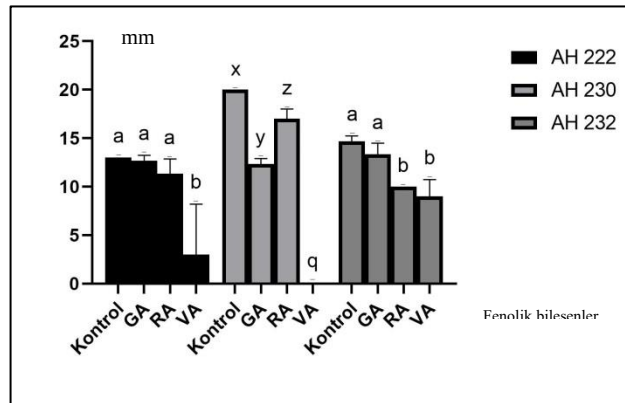
Şekil 4.45. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH ATCC 7966, AH RSKK 05049, AH SAHA, AH S, AH J, AH 2 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi



Şekil 4.46. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 3, AH 4, AH 12.1, AH 14, AH 15, AH 16 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi



Şekil 4.47. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 108, AH 113, AH 216, AH 217, AH 219, AH 220 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi



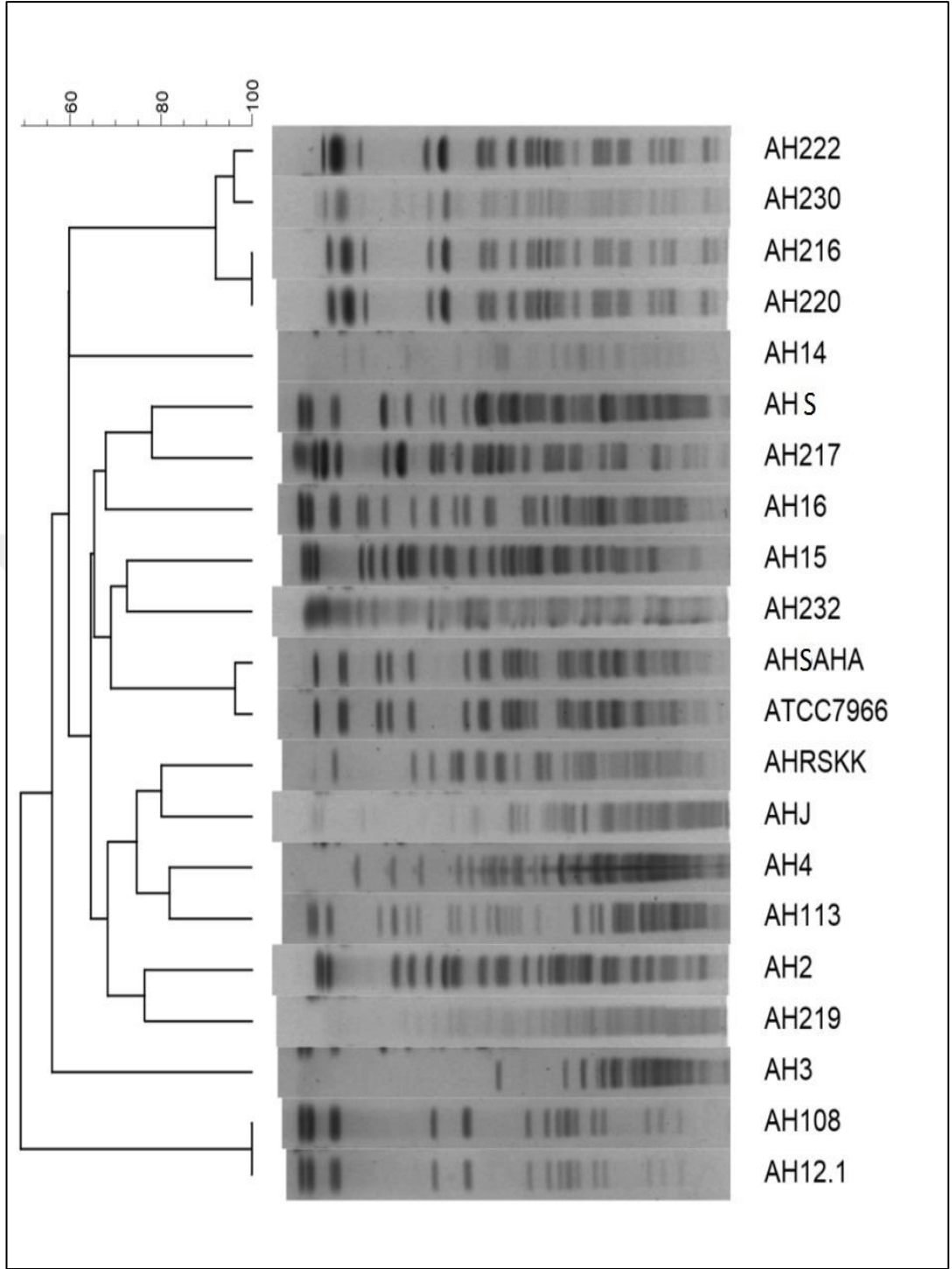
Şekil 4.48. GA, RA ve VA fenolik bileşenlerinin *A. hydrophila* AH 222, AH 230, AH 232 suşlarında β -hemolitik zon oluşumuna inhibisyon etkisi

a b c d p q r s x y z ile işaretli sonuçlarla kontrol arasındaki fark $P \leq 0.05$ seviyesinde önemlidir.

4.12. *A. hydrophila* Suşlarının PFGE ile Tiplendirilmesi

Suşlar arasındaki klonal ilişkinin saptanmasında Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi kullanılmış ve elde edilen DNA paternleri biyoinformatik program olarak özel bir program olan BioNumerics 7.5 programı ile değerlendirilmiştir. Moleküler epidemiyolojik çalışmada hasta balıklardan izole edilen *A. hydrophila*'nın 2 suşu BUÜ'nden, 4 suşu ISUBÜ'nden ve 14 suşu OMÜ'nden olmak üzere 4 farklı Üniversite koleksiyonlarından temin edilmiştir. 1 adet referans suş *A. hydrophila* ATCC 7966 ise USA'den temin edilmiştir. Toplamda 21 suşun genetik benzerlikleri karakterize edilmiştir. Hasta balıklardan izole edilen *A. hydrophila* suşlarının genomik DNA'larının benzerlik dendrogramı ve PFGE patternleri tespit edilmiştir (Şekil 4.49). *A. hydrophila*'nın 21 suşunun 19 farklı genotip (pulsotip) oluşturduğu saptanmıştır. 19 pulsotip içerisinde yer alan 4 izolat küme genişliği 2 olan 2 küme oluşturmuştur. Kümeleşme oranı $(4/20) = \%20$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11).

%95 ve üzeri benzerlik oranına göre ise Ege bölgesi-kefal AH 216 ve Ege bölgesi-çipura AH 220 suşlarının klonal yönden ilişkili olduğu ve Ege bölgesi-gökkuşağı alabalığı AH 108 ve Karadeniz bölgesi-gökkuşağı alabalığı AH 12.1 suşlarının aralarında moleküler epidemiyolojik yönden ilişkili olduğu belirlenmiştir. Böylece çalışılan suşlardan yakın coğrafik ve uzak coğrafik bölgelerdeki bazı suşların benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.49. *A. hydrophila* suşlarının PFGE dendrogram görüntüsü

Çizelge 4.11. PFGE sonucu belirlenen pulsotipler

Suş kodu	İzolasyon bölgesi	İzolasyon kaynağı	Pulsotip
AH 222	Ege/Türkiye	Kefal	1
AH 230	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	2
AH 216	Ege/Türkiye	Kefal	3
AH 220	Ege/Türkiye	Çipura	3
AH 14	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	4
AH S	Akdeniz/Türkiye	Sazan Balığı	5
AH 217	Ege/Türkiye	Levrek	6
AH 16	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	7
AH 15	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	8
AH 232	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	9
AH SAHA	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	10
AH ATCC 7966	Amerika Birleşik Devletleri	Süt	11
AH RSKK	Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (RSKK)	RSKK	12
AH J	Akdeniz/Türkiye	Japon Balığı	13
AH 4	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	14
AH 113	İç Anadolu/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	15
AH 2	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	16
AH 219	Ege/Türkiye	Tekir	17
AH 3	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	18
AH 108	Ege/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	19
AH 12.1	Karadeniz/Türkiye	Gökkuşaklı Alabalığı	19

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bakterilerin kullandıkları sinyallerin yapay sinir ağlarıyla benzerlikleri bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve bakterilerin sinir ağı barındırdığı bulgusundan hareketle bakteriler için düşük düzeyde bir zeka yapısı fikri de güçlenmiştir (Hellingwerf, 2005).

Bu nedenle bakteriyel direnç ve direncin geliştiği zeminler son yıllarda insanlık için ortak tehdit haline gelmiştir. Yirmi birinci yüzyılın başında, dünya çapında antibiyotiklere dirençli, hatta çoklu dirençli, patojenik bakterilerin sayısında ciddi bir artışın olduğu görülmektedir. Bu nedenle ‘enfeksiyon hastalıkları’ hala dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Robert Koch’un 1884 yılında yayınlanan varsayımlarının zaman içinde tartışılması sonucunda 1978’de Bill Costerton, kalıcı tıbbi cihazların takılı olduğu hastalardaki kronik enfeksiyonlarında etkenin, antibiyotik tedavilerine ve konak bağışık yanıtına dirençli, biyofilm oluşturan bakteriler olduğu konusunda uyarılarda bulunmuştur. 2012 yılında ise “biyofilmin babası” olarak anılan Costerton’a adanan “polimikrobiyal etkenlerin oluşturduğu biyofilm” teorisi ile konu daha farklı bir boyuta taşınmıştır. Geline bu noktada, Smith (1905), yılında ilk kez gündeme getirdiği “bakterilerin kendi aralarında haberleşmeleri” kavramı, ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin birbirileri ile haberleşmesi boyutuna kadar ayrıntılandırılan “çevreyi algılama” kavramı ile birlikte düşünölmeye başlanınca, enfeksiyon hastalıklarının değeriendirilmesinde yeni bir boyuta geçilmiştir. Günümüzde “mikroorganizmaların oluşturduğu sinyal moleküllerinin yönettiği biyofilm, hemoliz ve elastaz virölansları” kavramı içinde, türe özgü bir tanı ve tedavi düşünöldüğünde, nanobiyoteknoloji de dahil olmak üzere, yeni ve farklı stratejilerin göz önüne alınması gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Bayrakal ve Baskın, 2018).

Gerek insan gerekse balık hastalıklarına neden olan birçok patojen bakteri patojenitesinde çevreyi algılama sistemini virölans faktörlerinin sentezinde aktif olarak kullanmaktadır. Balıklarda hastalığa neden olan önemli patojenlerden biri *A. hydrophila* olup bu sistem aracılığı ile elastaz enzimi üretebilmekte, hemoliz reaksiyonları yapmakta ve biyofilm oluşumunu gerçekleştirmektedir. Yapılan son çalışmaları enfeksiyöz hastalıkları ile mücadelede sistemin inbisyonunun yeni ve umut

vaat eden bir seçenek olduğunu göstermiş ve sistemin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar son on yılda ivme kazanmıştır.

Bu amaçla yapılan bu tez çalışmasında farklı balıklardan izole edilen *A. hydrophila* suşlarında virülanstan sorumlu olan elastaz, hemoliz ve biyofilm oluşumu üzerine gallik asit, rosmarinik asit ve vanilik asitin inhibisyon etkileri araştırılmış, sistemden sorumlu olan genler tespit edilmeye çalışılarak, aralarındaki klonal ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır.

S-tabakası, hücre zarfının bir parçasıdır ve genellikle Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde bulunur. Yapısında protein ve glukoprotein vardır. Gram-negatif bakterilerde, S-tabakası doğrudan dış membrana bağlıdır. S-tabakası hücreyi iyon ve pH değişimleri dışında ozmotik basınç ve yabancı enzimlere karşı da korur. Ayrıca bazı bakteri hücrelerinde şeklin oluşumunda ve zarfın sağlamlığında rol oynar. Ancak, bu bir hücre membranı değildir. S-katmanı *A. hydrophila*'da virülans oluşturmada pigment üretiminde etkilidir (Ford ve Thune, 1992; Figueiredo ve Leal, 2008).

Singh (1997), Ryan's Aeromonas Medium (RAM), GSP agar Pseudomonas Aeromonas Selective Agar Base (GSP) ve Starch Ampicillin Agar (SAA) besiyerlerinde *Aeromonas* spp. türlerini araştırıldığı bir çalışma da GSP, SAA ve RAM besiyerlerinde *Aeromonas* spp. kolonilerini saptadığını ve bu agarların *Aeromonas* spp. türlerini belirleyici bir besiyeri olduğunu bildirmiştir.

Telaumbanua vd. (2019), tarafından TSA agarda krem renkteki *A. hydrophila*'nın GSP agarda sarı koloni oluşturduğu rapor edilmiştir. Araştırmamızda da aynı durum söz konusu olup TSA agarda orijinal rengi krem olan *A. hydrophila*'nın tüm suşları GSP agarda sarıya dönüşmüştür. *A. hydrophila* suşlarının GSP agarda sarı koloni oluşturmaya çalışılan tüm suşların *A. hydrophila* olduğu saptanmış ve raporlanmıştır.

Birçok antibiyotiğe karşı gerek intrinsik gerekse kazanılmış direnç göstererek sınırlı tedavi seçeneğine sahip olan, özellikle glikopeptid grubu antibiyotiklere direnci diğer bakterilere kolaylıkla transfer edebilen ve bağırsak florasında asemptomatik kalıcı

kolonizasyon gösteren bakterilerin hastalıklardaki önemi giderek artmaktadır (Uttley vd., 1988; Leclercq vd., 1988).

Aeromonasların, penisilin G, ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, streptomisin, sefalotin ve 1. ve 2. kuşak sefalosporinlerin çoğuna karşı dirençli; çoğu aminoglikozide, azlosilin, piperasilin kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, kinolonlar ve 3. kuşak sefalosporinlere duyarlı oldukları belirtilmektedir (Baron ve Finegold, 1990; Von-Graevenitz vd., 1991). Araştırmamızda da enrofloksasin, sefoperazon, siprofloksazin, gentamisin, kloramfenikol, flumekuin antibiyotiklerine karşı tüm suşların duyarlı olduğu sadece 1'er suşun direnç gösterdiği belirlenmiştir ve bu ilgili antibiyotiklerin tedavide tercih edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca *A. hydrophila*'nın tüm suşlarının norfloksasine duyarlı olduğu tespit edilmiştir ve tedavide norfloksasinin tercih edilebileceği düşünülmektedir. Araştırmamızda suşların direnç profili güçlü bulunarak oksasilin, ampisilin, vankomisin, penisilin G antibiyotiklerine karşı tüm *A. hydrophila* suşlarının dirençli olduğu belirlenmiş klindamisin ve tilosin antibiyotiklerine karşı ise 1 suş dışında tüm suşların dirençli olduğu belirlenmiştir.

Sarkodie vd. (2019), tarafından *A. hydrophila*'nın 15 klinik suşu antibiyotik hassasiyetleri açısından incelenmiş ve neredeyse birçok antibiyotiğe direnç geliştirdiği bulunmuştur. Hatta *A. hydrophila* hastalıklarının tedavisinde penicillin ve tetracyclinden kaçınılması gerektiğini savunmuşlardır. Araştırmamızda da benzer durum söz konusu olup araştırılan *A. hydrophila* suşlarının nerdeyse yarısının tüm antibiyotiklere direnç geliştirdiği görülmüştür ve penicillin G (%100) ve oxytetracycline (%90.47) karşı gördüğümüz direnç Sarkodie vd. (2019) ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Hossain vd. (2019), tarafından zebra balığı kaynaklı 43 *Aeromonas spp.* suşlarının antibiyogramı, antimikrobiyal direnç genleri ve integronları çalışılmıştır. Suşların altı farklı *Aeromonas* türü olduğunu bildirerek *A. veronii* biovar *veronii* (n=26), *A. veronii* biovar *sobria* (n=3), *A. hydrophila* (n=8), *A. caviae* (n=3), *A. enteropelogenes* (n=2) ve *A. dhakensis* (n=1) şeklinde suşları tanımlamıştır. Tanımlanan bu suşların antibiyogramını, amoksisiline (%100.00), nalidiksik aside (%100.00), oksitetrasikline (%100.00), ampisiline (%93.02), tetrasikline (%74.42),

rifampisine (%67.44) ve imipeneme (%65.15) karşı dirençli olarak rapor etmiştir. Araştırmamızda da benzer olarak oksitetrasikline 19 suş (%90.47), ampisiline 21 suş (%100.00) direnç gösterirken nalidiksik aside sadece 5 suş (%23.80) direnç göstermiştir.

Zhu vd. (2020), tarafından çoklu-ilaç direnci olan *A. hydrophila*'nın neden olduğu sepsiseminin son on yılda katlanarak arttığını ve endişe verici bir orana ulaştığını bildirmiştir. Hasta balıklardan izole ettikleri suşların antibiyotik hassasiyetlerinin tüm suşlarda farklılık gösterdiği ve her suşun farklı bir antibiyotiğe dirençli olduğunu rapor etmiştir. Araştırmamızda da aynı durum söz konusu olup her suşun farklı bir antibiyotiğe dirençli olduğu saptanmıştır.

Radu vd. (2003), balıklarda *Aeromonas* hastalıklarında antibiyotik direncini araştırmış ampisilin, karbenisilin, eritromisin ve streptomisine karşı oldukça dirençli olduğunu bildirmiştir.

Onuk vd. (2017), farklı oranlarda ilaç direncinin saptanmış olması hem balık hem de insan hastalıklarının tedavisinde uygun antimikrobiyel ajanların seçilmesinin önemini ortaya koymakla birlikte *Aeromonas* türleri için etkin ulusal antimikrobiyal direnç izleme sistemlerine ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda da aynı durum söz konusu olup farklı oranlarda ilaç direnci tespit edilmiştir.

Aeromonas suşları genel olarak amnoglikozitlere duyarlı olarak bilinmektedir (Laith ve Najiah, 2013). Araştırmamızda da bir aminoglikozit olan gentamisine karşı suşların %95.23'i duyarlı olarak bulunmuştur. Akşit vd. (2008) test ettikleri *Aeromonas* suşlarının tamamının gentamisine duyarlı olduğunu saptamışlardır. Araştırmamızda da benzerlik söz konusu olup suşların gentamisine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir.

Durmaz ve Türk (2009), Streptomycin, oxytetracycline, trimethoprim ve nitrofurantoin gibi antibiyotiklere karşı Motil *Aeromonas*'ın direnç kazandıkları saptamıştır. Antibiyotiklere bu denli direnç kazanmış *A. hydrophila*'yla savaşta artık yeni önlemlerin geliştirilmesi ve söz konusu patojen üzerinde çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu gibi fenomen stratejilerin denenmesi şarttır.

Kirke vd. (2004) ve Swift vd. (1997), tarafından PCR ile yaptıkları bir araştırmada *A. hydrophila*'da çevreyi algılama sistemi AHL molekülü olan *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) sinyal molekülünün üretimini *ahyI* ve *ahyR* geniyle kodladığını, bunun sonucunda da *A. hydrophila*'nın virülans faktörü olan biyofilm ve serine proteaz üretimini gerçekleştirdiğini bildirilmiştir. Araştırmamızda da aynı durum söz konusu olup PCR yöntemiyle *A. hydrophila* suşlarının tamamının *ahyI* ve *ahyR* genlerinin ikisi de tespit edilmiştir.

Swift vd. (1999) ve Lynch vd. (2002), tarafından *A. hydrophila* çevreyi algılama sistemin yönetimindeki *ahyR* geni BHL molekülüyle biyofilm oluşumunu ve extrasellüler proteaz üretimini gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Araştırmamızda benzer şekilde PCR yöntemiyle *A. hydrophila* suşlarının tamamında *ahyR* geni tespit edilmiştir.

Swift vd. (1999), göre *A. hydrophila*'da *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (C4-HSL) çevreyi algılama sinyal molekülü sentezi için gerekli proteini *ahyI* geni kodladığı ve *A. hydrophila*'daki *ahyI* geni inaktive edilerek bu moleküllerinin oluşmasının engellenebileceğini ifade etmiştir. Bu tez araştırmasında *A. hydrophila* suşlarında virülans faktörlerinin üretiminden sorumlu *ahyI* ve *ahyR* genlerinin her ikisi de saptanmış ve tüm suşların bu genlere sahip olmasına rağmen farklı oranlarda virülans kapasiteleri olduğu gözlenmiştir.

Kostakioti vd. (2009), tarafından *E. coli* bakterisi *QseB* ve *QseC* gen sistemleriyle bakteri iletişimine cevap verdiği ve virülans faktörlerini sentezlemek için kullandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada *QseC*'nin engellenmesinin, tür içi iletişimi kesdiği ve virülansi önemli ölçüde azalttığıda bildirilmiştir. Sarkodie vd. (2019) *A. hydrophila*'nın AHL molekülleriyle iletişime geçtiğini, virülans faktörlerini ürettiğini ve aynı çalışmada Kozlova vd. (2012)'nin belirttiği gibi *A. hydrophila*'da çevreyi algılama sistemi yönetimindeki AHL molekülleriyle iletişim olduğu gibi aynı zamanda *QseB* ve *QseC* sisteminin de bulunduğunu bildirilmiştir. *A. hydrophila*'daki AHL ile *QseB* ve *QseC* gen sistemi arasında türler arası iletişimde olduğu bildirilmiştir. *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemiyle tür içi iletişime geçtiği bilinirken bu çalışmayla türler arası iletişime geçtiğininde vurgulanmasıyla *A. hydrophila* dikkatleri üzerine çekmektedir. Bu klinik balık patojenin çevreyi algılama

sistemiyle organize olması, aynı anda etki göstererek virölans faktörleriyle balıklarda çeşitli şekillerde hastalıklara sebep olması nedeniyle çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu tedavi dünyası açısından çok önemlidir.

Çevreyi algılama sisteminin inhibisyonu yeni anti-enfektif ajanların gelişimi için çekici bir hedeftir. Son zamanlarda bazı bileşenler yeni, güvenli ve etkili QS engelleyici madde olarak büyük ilgi görürler. QS engelleyicileri olarak fenolikler, flavonoidler, alkaloidler, terpenoidler ve poliasetilenler içerdikleri ikincil derece metabolitlerin spektrumu nedeniyle mikrobiyal hastalık kontrolünde oldukça çekicidir. Bu anti-QS bileşikler bakteriyel patojeniteyi önler (Asfour, 2018).

Smith (1905), çok sayıdaki bakterinin birkaç bakteriden güçlü olduğunu, ancak bu birkaç bakterinin de birlik olarak engelleri aşabildiğini söylemiştir (Baskın, 2005). İşte bu sözlerden yıllar sonra bakterilerin birbirileri ile iletişim kurduğu ve yanıt verebildikleri ispatlanmıştır (Baskın, 2005). Bakteriler arası iletişim sisteminin bozulmasıyla bakteriler koordineli davranamayacaklar, konakta kolonize olamayacaklar ve bunun sonucunda başarılı bir hastalık süreci ortaya koyamayacaklardır (Rasko ve Sperandio, 2010).

Bilim insanları QS sistemlerinin kontrol ettiği biyofilmlerin karmaşık yapım ve bileşim süreçlerini anlamaya başlamıştır. Tedavi yaklaşımları konusunda <https://patents.google.com/> adresinden patent sorgusu “quorum sensing inhibitor” olarak yapıldığında bu konuda 1134 patentin, “biofilm inhibitor” olarak yapıldığında ise 875 patentin içeriğinde “quorum sensing” ve biyofilm kavramlarının yer aldığı görülmektedir (Bayrakal ve Baskın, 2018).

Biyofilm ilişkili hastalıklarda antimikrobiyalın biyofilm içindeki mikroorganizmalara etki edebilmesi için normalin 10-100-1000 kat yüksek konsantrasyonda uygulanması gerekmektedir (Stewart ve Costerton, 2001). Antibiyotik tedavilerinin başarısının düşük olmasından dolayı çevreyi algılamanın inhibisyonu günümüzde “ilaç” değerindedir.

Williams (2007), QS sistemine bağımlı AHL’nin kontrolündeki bazı fenotipleri bildirdiğinde *A. hydrophila*’nın C4-HSL ve C6-HSL moleküllerini üretterek biyofilm

ve virölans faktörlerini oluşturduğunu bildirmiştir. Kumar vd. (2019), *A. hydrophila*'nın çok güçlü biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında da *A. hydrophila*'nın çok güçlü biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Biyofilmin oldukça etkili bir virölans gücü olduğu, kronik hastalıklarda alt yapının oluşmasında ne denli etkili olduğu da yapılan birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Birçok literatürde bahsedilen *A. hydrophila*'nın biyofilminin engellenmesi için stratejiler geliştirilmektedir, bu araştırma sorusunda da fenolik bileşenlerle (GA, RA ve VA) engellenme stratejisi denenmiştir.

Rama Devi vd. (2016), *A. hydrophila* suşlarına karşı rosmarinik asitin (RA) çevreyi algılama inhibitörü (QSI) potansiyeli açısından değerlendirdiği bir çalışmada enfekte zebra balığından izole edilen *A. hydrophila* suşlarının tür spesifik gen (*rpsL*) amplifikasyonun tanımlanması ve biyokimyasal analizlerle identifikasyonu yapmıştır. *Ahh1*, *aerA*, *lip* ve *ahyB* gibi doğrulanan virölans genlerinin gen ekspresyon analizini yapmıştır. *A. hydrophila* suşlarına karşı RA'nın biyofilm inhibitör konsantrasyonunun (BİK) 750 µg ml⁻¹ olduğunu bulmuş ve bu konsantrasyonda RA'nın, *A. hydrophila*'da QS yönetimindeki hemoliz, lipaz ve elastaz üretimini azalttığını belirtmiştir. FT-IR analizinde, RA ile muamele edilen *A. hydrophila* hücrelerinin hücresel bileşenlerinde bir azalma gösterdiği belirlenmiştir. *A. hydrophila* ile enfekte olmuş zebra balığının RA ile tedavi edilmesiyle yaşama oranlarının arttığını ve RA'nın *A. hydrophila*'da QS yönetimindeki biyofilm oluşumunu ve virölans faktör üretimini kontrol etmek için değerli bir fitoterapötik bileşik olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da aynı durum söz konusu olup 750 µg ml⁻¹ konsantrasyonunun *A. hydrophila*'da biyofilm, β-hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite virölans faktörlerinin üretimini engellediği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarımız Rama Devi vd. (2016) RA'nın *A. hydrophila*'da QS yönetimindeki biyofilm oluşumunu ve virölans faktör üretimini kontrol etmek için değerli bir fitoterapötik bileşik olduğu iddiasını destekler niteliktedir, aynı fikir tarafımızca da savunulmaktadır.

Ponnusamy vd. (2009), doğal ortamlarda bir mikroorganizmanın biyofilm oluşumuna neden olan farklı QS moleküllerini ürettiğini birçok makalede olduğu gibi söz konusu yazarlarda belirtmişlerdir. Biyofilm oluşumunun QSI olarak çevre dostu maddeler kullanarak azaltılabileceğini de ifade etmişlerdir. İyi bilinen bir gıda

tatlandırıcı olan vanilini, biyosensör suşları kullanılarak acyl homoserin lakton (AHL) moleküllerine karşı QSI özelliği bakımından incelemişlerdir. Vanilinin, kısa zincirli [C4-HSL (%69) ve 3-Okso-C8-HSL (%59.8)] ve uzun zincirli AHL moleküllerinde belirgin inhibisyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Vanilinin QSI aktivitesini, biyofilm bakterileri *A. hydrophila* üzerinde ters osmoz (RO) membranı teknolojisinde test etmişlerdir. Polistiren yüzeyi üzerinde biyofilm oluşumu %46,3'e kadar inhibe edildiğini görmüşlerdir. Sonuçlarında vanilinin, RO membranlarında biyofilm oluşumunu azaltacak potansiyel bir QSI bileşiği olarak kullanılabileceğini önermişlerdir. Araştırmamızda da vanilik asidin bakteriyel balık patojeni *A. hydrophila*'nın önemli virülanslarından olan biyofilmi dikkat çekici şekilde engellediği tespit edilmiştir, iyi bir çevreyi algılama sistemi inhibitörü olabileceği tarafımızca da savunulmaktadır.

Chu vd. (2014), balık patojeni *A. hydrophila*'nın biyofilm oluşumuna ve virülans faktörlerinin üretilmesine *Bacillus sp.* QSI-1'in quorum quencher olarak etkisini araştırmışlardır. *A. hydrophila* YJ-1 ile QSI-1'in birlikte kültürlendiğinde (co-culture) QSI-1'in *A. hydrophila* YJ-1'in büyümesini etkilemediğini ancak AHL'lerin birikimini azalttığını görmüşlerdir. Sonuçta QSI-1'in süpernatantının *A. hydrophila* YJ-1'de proteaz üretiminde (%83.9), hemolitik aktivitede (%77.6) ve biyofilm oluşumunda (%77.3) önemli derecede inhibisyon etkisi gösterdiğini raporlamışlardır. Biyokontrol deneyinde, QSI-1, zebra balığı (*Danio rerio*)'da *A. hydrophila* suş YJ-1'in patojenitesini önemli ölçüde azalttığını görmüşlerdir. QSI-1 ile beslenen balıkların %80.8'lik hayatta kalma oranı gözlenmiştir. Sonuçlarında AHL bloke eden bakterilerin, su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel balık hastalıklarının biyokontrolünde antibiyotiğe alternatif olarak düşünüldüğü savunmuşlardır. LBA (Luria Bertani Agarda) QSI-1 süpernatantını içeren kuyucuktaki bakterilerin koyun eritrositleri üzerindeki hemoliz zonundaki küçültmeyi gösteren bulgu resmiyle de net olarak ortaya koymuşlardır. Tez araştırmamızda quorum quencher olarak *Bacillus sp.* QSI-1 kullanılmamış ancak bazı fenolik bileşenler quorum quencher olarak düşünülmüş ve çalışılmıştır. Sonuçta tez araştırmamızda da *A. hydrophila*'da biyofilm, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite virülanslarını GA, RA ve VA'nin engellemesinin bulunuşuyla bu fenolik bileşenlerin *Aeromonas* kaynaklı hastalıkların biyokontrolünde iyi bir Quorum Sensing İnhibitörü (QSI) olabileceği tarafımızca iddia edilmektedir. Ayrıca GA, RA ve VA'nin β -hemolitik aktiviteyi engellemesiyle

eritrositlerin parçalanmasındaki azalma yani hemoliz zonundaki küçülme tezde de net olarak ortaya konmuştur. Özellikle vanilik asidin hemoliz zon çaplarını oldukça küçültmesi hatta bazı suşlarda hemoliz zonunu sıfıra indirmesi çok çarpıcı bir sonuçtur.

Annapoorani vd. (2012), rosmarinik asidin, insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa*'nın biyofilm mimarisini etkili bir şekilde bozduğunu ve biyofilm oluşumunu azalttığını rapor etmiştir. Çalışmamızda *A. hydrophila*'nın biyofilm oluşumunu en etkili oranda engelleyen bileşenin rosmarinik asit olduğu tespit edilmiştir.

Borges vd. (2012), galik asit, *Listeria monocytogens*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* bakterilerinin biyofilm oluşumunu önlediğini bildirmiştir. Ayrıca, galik asidin gram-pozitif bakterilere kıyasla gram-negatif bakteriler tarafından önceden oluşturulmuş biyofilm biyokütlesini azaltma potansiyelinin olduğunu göstermişlerdir. Toplam biyofilm tamamen yok edilememesine rağmen, biyofilmin metabolik aktivitesini bu fenolik asit tarafından güçlü bir şekilde azaltıldığını, bu durumda bakterilerin yüzeye yapışmasını önemli derecede engellediğini rapor etmişlerdir. Tez araştırmamızda da Borges vd. (2012), benzer olarak *A. hydrophila*'nın galik asitle maruz kaldığında çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki biyofilm oluşturmalarının engellendiği bulunmuştur.

Larrosa vd. (2010) ve Sarabhai vd. (2013), galik asit türevleri ve polifenol bileşenlerinin *N*-Acyl homoserin laktonlara müdahale ederek bakteriler arası etkileşimi engellediklerini savunmuşlardır. Lu vd. (2016), galik asidin *A. hydrophila* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmamızda galik asitin *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemiyle yönettiği biyofilmi, β -hemolitik aktiviteyi ve elastolitik aktiviteyi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Dusane vd. (2015), Karbenisilinle tedaviye cevap vermeyen biyofilm ilişki *Chromobacterium violaceum* CV026 vakalarında hızlı gelişen biyofilmi engellemede galik asit etkili olduğunu literatürlere eklemişlerdir. Başka bir çalışma da Sendamangalam vd. (2011), *Streptococcus mutans* galik asit ve türevi metil gallatın *in vitro* çalışmasında biyofilm oluşumunu engellediğini bildirmiştir. Tüm bu

çalışmalarda olduğu araştırmamızda da gallik asidin *A. hydrophila*'nın biyofilmini engellemesiyle bu fenolik bileşenin iyi bir çevreyi algılama sistemi inhibitörü olabileceği düşünölmektedir.

Choo vd. (2006), vanilya ekstraktlarının *C. violaceum*'da çevreyi algılama sistemini inhibe yeteneğinde olduğunu saptamışlardır. Bu nedenle vanilya içeren besinlerin tüketimlerinin faydalı olabileceğini savunmaktadırlar.

Ponnusamy vd. (2009), vanilik asitin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde), acyl homoserin lakton moleküllerini (C4-HSL ve 3-Oxo-C8-HSL) önemli ölçüde etkileyerek çevreyi algılama sistemi üzerindeki inhibisyonunu tespit etmişlerdir ve Vanilya çekirdeklerinin önemli bir bileşeni olan vanilinin, *A. hydrophila*'da biyofilm oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir. Tez araştırmamızda vanilik asit *A. hydrophila*'da biyofilm oluşumunu etkileyerek azaltmıştır.

Truchado vd. (2012), birçok gıda fitokimyasalının çevreyi algılama biyosensör suşu olan *C. violaceum*'daki QS sinyallerini inhibisyon potansiyelini araştırdığı bir çalışmada, fenolik asitlerden gallik asit ve vanilik asidin (vanilin) QS inhibisyonuyla violaceini azalttığını bulmuştur. Araştırmamızda da gallik asit ve vanilik asidin *A. hydrophila*'nın biyofilm, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite virölanslarını engellediği bulunmuştur.

Virölent *A. hydrophila* aerolizin, gözenek oluşturucu toksinler (PFT) ve hemolizin, gözenek oluştırmayan toksinler olmak üzere iki tip hemolizin üretmektedir (Wang vd., 2003). Bu virölans faktörleri *A. hydrophila*'nın virölent oluşunda β -PTF kontrolündeki en önemli virölans güçleridir (Szczesny vd., 2011).

Nurcan (2010), araştırmasında *C. violaceum* CV026 ile *Agrobacterium tumefaciens* NT1 biyosensör suşları kullanılarak yaptıkları testlerde *A. hydrophila* suşlarının *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) ile *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL) sinyal moleküllerini ürettiğini tespit etmiştir ve çevreyi algılama sistemi yönetimindeki virölans güçlerinden *A. hydrophila*'nın hemolitik aktivitesinin çok güçlü olduğunu bildirmiştir.

Luis vd. (2014), *Staphylococcus aureus* suşlarının α toksin olan hemolitik aktivitesini gallik asidin azalttığını rapor etmişlerdir. Tez araştırmamızda Luis vd. (2014)'nin çalışmasından farklı olarak *A. hydrophila* çalışılmış ve gallik asidin hemolitik zon çapını küçülterek inhibe ettiği raporlanmıştır.

Samayanpaulraj vd. (2020), *A. hydrophila*'nın hemoliz ve elastaz virülanslarını ürettiğini rapor etmiştir. İlgili bilim adamlarının bahsettiği bu β -hemolitik ativite ve elastolitik aktivite virülanslarını tez araştırmamızda *A. hydrophila*'nın tüm suşlarının ürettiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda tezin esas gündemlerinden biri olan çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki bu virülansların GA, RA ve VA fenolik bileşenleriyle inhibe edildiği de ortaya konmuştur.

Hossain vd. (2017), tarafından model ester olarak gallik asit metil esteri Metil Gallat (MG) fenolik bileşeninin anti-QS etkisini değerlendirmek için *C. violaceum* ve *P. aeruginosa* suşları çalışılmıştır. *C. violaceum*'da AHL sinyal moleküllerinin sentezine etkisi ve *P. aeruginosa*'da biyofilm, motilite, proteolitik, elastaz, piosiyanın, ramnolipid aktivitelerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçta MG'nin *P. aeruginosa*'da QS genlerinin ekspresyonunu etkilediği, çevreyi algılama yönetimindeki virülans faktörlerini engellediği ve *C. violaceum*'da AHL'nin hem sentezini hem de aktivitesini engellediği bildirilmiştir. MG konsantrasyonunun *in vitro* çalışmasında toksik olmadığı ve *P. aeruginosa*'nın *lasI/R*, *rhII/R* ve *pqsA* ekspresyonunu baskıladığı ifade edilmiştir. Bu çalışmanın MG'nin anti-QS mekanizmasının ilk raporu olduğu da bildirilmiştir. Tez araştırmamızda patojen ve fenolik bileşenler farklı olsa da bu çalışmayla aynı amaç söz konusudur. Tez araştırmamızda da bu *in vitro* çalışma için belirlenen fenolik asit konstanrasyonun toksik olmadığı ve *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemiyle düzenlediği virülans faktörlerinden biyofilmi, β -hemolitik aktiviteyi, elastolitik aktiviteyi fenolik bileşenler rosmarinik asit, vanilik asit ve gallik asidin engellediği ispatlanmıştır.

Lu vd. (2016), tarafından gallik asidin *A. hydrophila* üzerindeki antibakteriyel etkisi bildirilmiştir. Rodrigues vd. (2016), *Eugenia brasiliensis* bitkisinden elde edilen fenolik bileşenlerin *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemi yönetimindeki hareketini inhibe ettiğini bildirmişlerdir ve yine aynı çalışmada fenolik bileşenlerin genel olarak Gram-negatif bakterilerde iyi bir çevreyi algılama inhibitörü (QSI)

olabileceğini savunmuşlardır. *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemini engelleme araştırmaları farklı bilim insanları tarafından çalışılsa da tez araştırmamızın esas gündemlerinden biri olan *A. hydrophila*'nın çevreyi algılama sistemi yönetiminde gerçekleştirdiği virülans güçlerinden biyofilm, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivitenin gallik asit, rosmarinik asit ve vanilik asit fenolik bileşenleriyle inhibisyonunun güçlü olduğunun tarafımızca bildirilmesi ülkemiz adına ilk rapordur.

Epidemiyolojik araştırmalarda araştırmacılar *Aeromonas* spp.'ların patojenik suşlarını ve patojenik olmayan suşlarını ayırt etmek için genetik marker olarak virülans faktörlerini baz alırlar (Kingombe vd., 1999; Wang vd., 2003; Sen ve Rodgers, 2004).

PFGE *E. coli* (Preston vd., 2000), *Salmonella* (Old vd., 1999), *Neisseria gonorrhoeae* (Van Looveren vd., 1999), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (Grady vd., 1999), *Acinetobacter baumannii* (Marcos vd., 1995) gibi birçok Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterinin tiplendirilmesinde kullanılmıştır (Durmaz ve Durmaz, 2001).

Dempsey vd. (1991), PFGE'nin büyük DNA parçalarını ayırıştırma özelliğinin, bakteriyel genom analizleri için yeni yaklaşımlar sağladığını bildirmişlerdir. Farklı enzimler kullanılarak oluşturulan DNA parçalarının PFGE analizinin, bakteriyel genomun büyük parçalardan küçük parçalar halinde hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlayan güçlü bir teknik olduğunu vurgulamışlardır.

PFGE'nin, bakterilerin karakterizasyonunda etkili olduğu gibi, genom büyüklüğünün hesaplanması ve kromozom haritalarının oluşturulmasında da etkili bir metot olduğu kanıtlanmıştır (Churin vd., 1995; Basım vd., 1999).

Gardiner (1991), maya yapay kromozomu kütüphanelerinin PFGE yöntemiyle oluşturulduğunu bildirmiştir.

Modern taksonomi bakterileri, atasal ilişkilerine göre belirlemektedir. PFGE, yüksek derecedeki polimorfizmleri belirleyebilmiştir (Grothues ve Tümmler, 1991).

Tamplin vd. (1996), kabuklu deniz ürünleri, deniz suyu ve sediment örneklerinden izole edilen 78 adet çevresel; hastanelerden izole edilen 53 adet klinik *Vibrio vulnificus* suşunun PFGE analizini yapmışlardır. Çevresel ve klinik örneklerin profilleri arasında yüksek oranda çeşitlilik görülmüştür. Bunun tersine ribotipleme sonucunda ribotip profilleri arasında mükemmel derecede benzerlik tespit edilmiştir. Çevresel ve klinik örneklerin ribotiplemesi sonucunda dört baskın grup ortaya çıkmıştır. PFGE'nin, klinik suşları çevresel suşlardan ayırt etme gücünün çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

Talon vd. (1996), yaklaşık 1 ay boyunca meydana gelen hastane kaynaklı enfeksiyon kümesinden izole edilen *A. hydrophila* suşlarını karakterize etmek için PFGE yöntemini kullanmışlardır. Hastalardan 5 suş ve su kaynağından 10 suş biyotipleme ve antibiyotik duyarlılık paternleri araştırılmıştır. Ayrıca hastalardan ve sudan izole edilen birbirinden bağımsız 10 suşun DNA kromozomunu PFGE ile parçalayarak epidemiyolojik olarak karşılaştırmasını yapmışlardır. 5 sudan izole suşun ve 4 klinik suşun biyotip ve antibiyotik duyarlılık patern tipinin aynı olduğunu bulmuşlardır. Endonükleazlar XbaI, SpeI ve SmaI ispat edici profiller verirken DraI'nın vermediğini belirtmişlerdir. Profillerin stabil, tekrarlanabilir ve ayırt edici olduğunu da bildirmişlerdir. Epidemiyolojik olarak birbirinden bağımsız 10 suşun en ucuz, uygun endonükleaz olan XbaI ile parçalandıktan sonra 10 farklı model sergilediğini bulmuşlardır ve PFGE'nin, ortak bir hastalık kaynağından şüphelenilen *A. hydrophila*'nın tiplendirilmesi için hızlı ve ayırt edici bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. Tezde *A. hydrophila* suşlarının genomik DNA'larının benzerlik dendrogramı ve PFGE patternleri tespit edilerek 21 suşun 17 farklı genotip (pulsotip) oluşturduğu saptanmıştır. %95 ve üzeri benzerlik oranına göre suşların %38'u klonal yönden ilişkili bulunmuştur.

Körkoca vd. (2013), tarafından PFGE ile diyareli insanlardan (14 suş), sağlıklı gıda işçilerinden (2 suş), hayvanlardan (24 suş) ve içme sularından (12 suş) izole edilen 52 *Aeromonas* suşu arasındaki klonal ilişki araştırılmıştır. Bir diyareli insan suşı ve bir sığır suşı arasında klonal ilişki tespit edildiği, insan ve su suşları arasında klonal ilişki tespit edilmediği ve balıklardan izole edilen *A. caviae* ve *A. sobria* suşlarının ayırt edilemez PFGE paterni tespit edildiği bildirilmiştir. %95 benzerlik oranına göre Ege bölgesi-kefal AH 222 ve Ege bölgesi-gökkuşuğu alabalığı AH 230

suşlarının aralarında klonal yönden ilişkili olduğu, Karadeniz bölgesi-gökkuşuğu alabalığı AH SAHA ve Amerika Birleşik Devletleri-süt AH ATCC 7966 suşlarının aralarında klonal yönden ilişkili olduğu belirlenmiştir. %100 benzerlik oranına göre ise Ege bölgesi-kefal AH 216 ve Ege bölgesi-çipura AH 220 suşlarının klonal yönden ilişkili olduğu ve Ege bölgesi-gökkuşuğu alabalığı AH 108 ve Karadeniz bölgesi-gökkuşuğu alabalığı AH 12.1 suşlarının aralarında klonal yönden ilişkili olduğu belirlenmiştir. Böylece çalışılan suşlardan yakın coğrafik ve uzak coğrafik bölgelerdeki bazı suşların benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir.

Yu vd. (2004), tarafından *A. hydrophila*'da PFGE, PCR, DNA manüplasyonları, Southern hibridizasyon, DNA dizilimini ve mutantlarının yapısını bir dizi yöntemlerle araştırdığı bir çalışmada *A. hydrophila*'nın patojenitesini gerçekleştirdiği Tip III sekresyon sisteminin (TTSS) gen dizisinin karakterini ve dizilimini yaparak ilk kez raporlamışlardır. Tez araştırmamız kapsamında hasta balıklardan izole edilen *A. hydrophila* suşlarının genomik DNA'larının benzerlik dendrogramı ve PFGE patternleri ortaya konmuştur.

Araştırmacılar klinik bakteriyoloji ve mikrobiyoloji araştırmalarında uzun zamandır tek hücreli/monoklonal organizmaları “saf suşlar” ilkesine bağlı kalarak analizlerini gerçekleştirmiştir. Bu ilke çok doğru olmakla birlikte, bilim insanları artık çok hücreli/poliklonal yaşam tarzı, biyofilm oluşumu ve çevreyi algılama sistemi gibi araştırma sorularıyla da bakterileri anlamak için bakterilerin sosyo-mikrobiyolojik yönlerini giderek ortaya çıkarmaktadır.

The guardian (2020), antibiyotik direnci hakkında yapılan araştırmalar kapsamında yeni antibiyotikler geliştirilemezse, 2050 yılına kadar her yıl 10 milyon canlının hastalıklardan dolayı risk altında olabileceği konusunda uyarmıştır. Öte yandan en güçlü veya en zeki olan değil, değişime en çok uyum sağlayabilen hayatta kalır Megginson (1963), ifade ettiği gibi bakterilerde çevrenin değişimine uyum sağlamış antibiyotik direncini neredeyse zirveye çıkarmıştır. Günümüzde 400 farklı mikroorganizmaya ait 20.000'in üzerinde potansiyel direnç geninin (R geni) varlığının bilindiği (Aksoy, 2015) antibiyotik direnci sadece bugünü değil geleceği de ilgilendiren ve tüm dünyayı tehdit eden önemli bir sorundur. Biyofilm matriksinde

bulunan ve enfeksiyona neden olan bakterilerin antibiyotik dirençlilik problemi, yüz yüze kalınan büyük problemlerden birisidir (Costerton vd., 1999).

Bakteriyel hastalıkların ilaç tedavisinde antibiyotiklerin rastgele kullanımları direnç gelişmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla, bakterilerle savaş yeteneğimizin azaldığı post-antibiyotik bir dönemle karşı karşıya kalmış ve hastalıklarla başa çıkmak için yeni stratejilere ihtiyaç artmıştır. Bakterilerin virülans faktörlerini bakteriler arası iletişim sistemini kullanarak düzenlendiklerinin keşfi, bakteriler arası iletişim sistemini engellemeyi tedavi için cazip bir hedef haline getirmiştir. Bakterileri öldürmeden patogenezi hedef almak, direnç gelişimi için daha az seçici baskı uygulayabilmektedir, bu nedenle bakteriyel iletişim inhibitörleri kullanarak bakteriler arası iletişimin engellenmesi hastalıkların tedavisi için büyük umut olarak görülmektedir (Bosgelmez-Tinaz, 2013).

Bakterilerin sistemleşmiş milyarlarca hücreden oluşan balıklarda hastalık oluşturarak doğal ortamda ve yetiştiricilik ünitelerinde ne kadar ciddi kayıplara sebep olduğu sorusunun cevaplarından birisi: çevreyi algılamadır. Çevreyi algılamanın kontrolündeki en etkili virülans faktörü olan biyofilm “mikroplar şehri” (Watnick ve Kolter, 2000) olarak nitelenmiştir. Bütün bunlar ne akıllıca davrandıklarını ispatlar niteliktedir. Çevreyi algılama bakterilerin düşünerek hareket ettiklerinin de bir göstergesidir. Aralarındaki bakteriyel iletişimin kesilmesi ile balıklar üzerindeki olumsuz etkilerinin de büyük oranda biteceği öngörülmektedir.

Bütün bu durumlar değerlendirildiğinde bakteriler birbirleri ile iletişime geçip henüz hastalığı oluşturmamış iken QS sisteminin durdurulması mücadele de oldukça önemlidir. Patojenlerin iletişime geçişi esnasında sinyal moleküllerin tespiti ve imhası hastalık oluşumunun engellenmesinde başarılı bir profil çizecektir.

Bilim adamları, bakterilerin direnç geliştiremediği “süper antibiyotik” geliştirmeyi başarmıştır. Nature Chemical Biology dergisinde yayımlanan makaleye göre, New York’taki Albert Einstein Fakültesi’nde görevli bilim adamı Vern Schramm ve ekibi yeni geliştirdikleri antibiyotiği kolera ve *E. coli* bakterilerinde denemiştir. Deney sonucunda bu antibiyotikle yapılan 26. tedavinin bile ilk tedavideki gibi sonuç verdiğini dikkat çekilmiştir. Yeni antibiyotiğin bakteriyi öldürmediğini belirten bilim

adamları, bu yöntemin bakterilerin direnç geliştirmesine neden olduğunu hatırlatmıştır. Süper antibiyotik, bakterilerin birbirleriyle iletişimini, bir enzimi bloke ederek kesmektedir ve böylece bakteriler bağışıklık sisteminden korundukları biyofilmleri geliştirememektedir (Gutierrez vd., 2009).

Çevreyi algılama bakteriye güç katarak patojenite de oldukça etkilidir. Bu nedenle QS moleküllerinin üretiminin önlenmesi, parçalanması veya inhibisyonu, QS sinyalinin alınmasının önlenmesi stratejileri üzerinde durmak önemlidir. Bu anlamda bakteri dünyasındaki iletişimin kesilmesi su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodudur. Bakteri hücreleri arasındaki iletişimin engellenmesiyle antibakteriyel etki elde etme çalışmaları gelecek için umut vaadeden bir alan olarak görülmektedir. Aynı zamanda çevreyi algılama sinyal moleküllerinin tespitiyle bu moleküllerin oluşumunun durdurulması hastalıkta erken teşhis kavramını gündeme getirmekte ve bu durumda profilaksi de çığır açması hedeflenmektedir.

Tez araştırmasında *A. hydrophila* suşlarının tamamında çevreyi algılama sisteminden sorumlu *ahyI* ve *ahyR* genleri tespit edilmiştir. *A. hydrophila* suşlarının tamamında çevreyi algılama sisteminin yönetimindeki biyofilm, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite virülansları raporlanmıştır. Çevreyi algılama sistemi yönetimindeki bu virülans güçleri üzerine araştırılan gallik asit, rosmarinik asit ve vanilik asitin önemli derecede inhibisyon etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu üzerine RA, β -hemolitik aktivite ve elastolitik aktivite üzerine ise VA fenolik bileşenlerinin en etkili şekilde inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca suşlar arasındaki moleküler epidemiyolojik ilişkiye göre yakın coğrafik alanlardaki suşların benzer küme oluşturduğu ve bu benzer suşların farklı hasta balık türlerinden izole edildiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bakterilerin her geçen gün antibiyotiklere gösterdikleri direnç ve özellikle biyofilm oluşumu ile de artıyor olması bakterilerle mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu nedenle araştırmacılar konularını çevreyi algılama sistemiyle yönetilen biyofilmin inhibisyonu üzerine yoğunlaştırmıştır. Bu ciddi durum karşısında şimdiye kadar çevreyi algılama sistemi inhibisyonu üzerine yapılmış çok fazla çalışma bulunmakta ve sistem üzerine

inhibisyon etkisi görmek için çok sayıda doğal ya da sentetik moleküller denenmektedir. Yaptığımız tez kapsamında inhibisyon etkisi araştırılan fenolik bileşenlerin çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülans faktörleri üretimi üzerine farklı oranlarda inhibisyon etkisinin olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile çevreyi algılama sistemi inhibitörü olduğu tespit edilen fenoliklerin daha sonraki çalışmalarda yeni çevreyi algılama sistem inhibitör fenolik adaylarının belirlenmesinde öncü olabileceği, klinik öneme sahip diğer patojen bakterilerde de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu araştırma sorusunun antibiyotiklere karşı giderek güçlenen *A. hydrophila*'ya karşı antibakteriyel ilaç geliştirilmesinde fenolik bileşenlerin kullanımının farmakolojik literatürlere geçmesi açısından değerli olduğu aynı zamanda bu tez *in vivo* çalışmalara ışık tutacak bir araştırma niteliğinde olduğu da düşünülmektedir.

Ayrıca bakterilerin birbirleriyle iletişimini, bir enzimi bloke ederek kesen ve böylece bakterilerin bağışıklık sisteminden korundukları biyofilmleri geliştiremediğini bulan Vern Schramm ve ekibinin geliştirdikleri 26. tedavide bile başarısı kanıtlanmış ‘‘süper antibiyotiği’’ su ürünleri alanına da kazandırmak adına bu tezin devamındaki araştırmalara yön vereceğine inanılmaktadır.

Tezde PFGE yöntemiyle araştırılarak rapor edilen balık hastalıkları ajanlarından *A. hydrophila* suşlarının akrabalık ilişkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir. Aynı türe ait farklı suşlar arasındaki ilişkiyi derecelendirmede, genom büyüklüklerinin araştırılmasında, gen haritalama gibi konularda güçlü ve etkili olan PFGE yönteminin *A. hydrophila* ajanı kaynaklı hastalıklarının araştırılmasında uzun-dönem ve kısa-dönem salgın sürveyansında güvenilir, yüksek ayırım gücüne sahip sıklıkla tercih edilebilecek bir moleküler epidemiyolojik yöntem olduğu kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbott, S.L., Cheung, W.K.W. & Janda, J.M. (2003). *Aeromonas* cinsi: biyokimyasal özellikler, atipik reaksiyonlar ve fenotipik tanımlama programları. *Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 41(6), 2348-2357.
- Açıkgöz, E. (2012). Quorum Quenching. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)*, 10(2), 27-44. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702120203.pdf.
- Afifi, S.H., Al-Thobiati, S. & Hazaa, M.S. (2000). Bacteriological and Histopathological Studies on *Aeromonas hydrophila* Infection of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) From Fish Farms In Saudi Arabia. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 84, 195-205.
- Agger, W.A., McCormick, J.D. & Gurwith, M.J. (2018). *Aeromonas hydrophila* ilişkili ishalin klinik ve mikrobiyolojik özellikleri. *Journal Clinical Microbiology*, 2(18), 22-26.
- Aksoy, A. (2015). Antibiyotik Direnci Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri-Farmakoloji ve Toksikoloji-Özel Konular*, 15(1), 34-45.
- Akşit, A. & Kum, V. (2008). Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19, 1-7.
- Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K.A., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A.S.G., Sirajul Islam, M., Bradley Sack, R. & Mollby, R. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3785-3790.
- Alcaide, E., Blasco, M.D. & Esteve, C. (2005). Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3348–3350. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3348-3350.2005>.
- Al-Fatlawy, H.N.K. & AL-Hadrawy, H. (2014). Isolation and Characterization of *A. hydrophila* from the Al-Jadryia River in Baghdad (Iraq), *American Journal of Educational Research*, 2(8), 658-662. <https://doi.org/10.12691/education-2-8-14>.
- Andrei, A. & Zervos, M.J. (2006). The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 130(5), 662-668.
- Andrew, P. (2004). *The Constituents of Medicinal Plants*. (2nd ed.), Allen & Unwin, 29–30.

- Angka, S.L. (1990). The pathology of the walking catfish, *Clarias batrachus* (L) infected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila*. *The Asian Fisheries Science*, 3(3), 343-351.
- Anguita, J., Rodríguez-Aparicio, L.B. & Naharro, G. (1993). Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8), 2411-2417.
- Angulo, F.J. & Griffin, P.M. (2000). Changes in antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 6, 436-438.
- Angulo, F.J., Nargund, V.N. & Chiller, T.C. (2004). Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine*, 51(8-9), 374-379. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00789.x>
- Annapoorani, A., Umamageswaran, V., Parameswari, R., Pandian, S.K. & Ravi, A.V. (2012). Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against *LasR* and *RhlR* receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(9), 1067-1077.
- Aoki, T. (1999). *Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. 11, Motil Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). *Fish Diseases and Disorders*. Editors: Woo, P.T.K. and Bruno, D.W., Tokyo University of Fisheries, Japan: Tokyo.
- Asfour, H.Z. (2018). Anti-quorum sensing natural compounds. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 6(1), 1-10.
- Austin, B. & Austin, D.A. (2016). *Bacterial fish pathogens*. 6. th edition. Springer International Publishing, Switzerland, pp: 21-82, 161-321, 323-396, 643-721.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moor, D., Seidman, J., Smith, J. & Staehle, K. (1988). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley Intersciences, 1(2), 146.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M. & Terao, J. (2004). Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life sciences*, 75(2), 165-178.
- Bainton, N.J., Stead, P., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B. & Williams, P. (1992). *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochemical Journal*, 15, 997-1004.
- Baran, I., Timur, M., Aydın, N., İstanbulluoğlu, E. & Aydıntuğ, M.K. (1980). Çifteler-Sakaryabaşı balık üretim ve araştırma istasyonunda, alabalıklarda

(*Salmo gairdneri*) görülen bakteriyel hemorajik sepsisemi hastalığı üzerine incelemeler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(1), 467-473.

Baron, E.J. & Finegold, S.M. (1990). *Vibrio* and related species: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Campylobacter*, and others'', Bailey-Scott's Diagnostic Microbiology, 8th Edition. The C.V. Mosby Company, St. Luis, p 431-445.

Basım, H., Stall, R.E., Minsavage, J. & Jones, J. (1999). Chromosomal gene transfer among strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* by conjugation. *Phytopathology*, 89, 1044-1049.

Baskın, H. (2005). *Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: "quorum sensing" (çoğunluğu algılama)*. Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 9-10.

Baylan, O. & Yılmaz, S. (2004). İntestinal ve Ekstraintestinal Enfeksiyonların Bir Etkeni: *Aeromonas*. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34(4), 262-272.

Bayrakal, V. & Baskın, H. (2018). *Quorum Sensing ve Biyofilm. Biyofilm Enfeksiyonları*. (1. Basım) 4-13. Editör: Sakarya S. Ankara: Türkiye Klinikleri.

Boran, H., Terzi, E., Altınok, I., Capkin, E. & Bascinar, N. (2013). Bacterial diseases of cultured mediterranean Horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages. *Aquaculture*, 396, 8-13.

Boşgelmez-Tınaz, G. (2003). Quorum sensing in gram-negative bacteria. *Turkish Journal of Biology*, 27, 85-93.

Bottarelli, E. & Ossiproni, M. C. (1999). *Aeromonas* Infections: An update. *Gastroenterology Clinics*, 30(3), 24-29.

Bruhn, J.B., Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen, J.L. & Gram, L. (2005). Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65(1), 43-52. <https://doi.org/10.3354/dao065043>

Burke, V., Cooper, M., Robinson, J., Gracey, M., Lesmana, M., Echeverria, P. & Janda, J.M. (1984). Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. *Journal of clinical microbiology*, 19(1), 39-43.

Cabello, F.C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>

Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (1992). Biochemical activities of microorganisms. In: Microbiology. A Laboratory Manual. The Benjamin/Cummings Publishing Co. California, USA. 76 s.

- Carl Wilhelm Scheele, (1786). Om Sal esansı Gallarum eller Gallåple tuzu (Safra tuzunun veya safra tuzunun esansiyel tuzunda). *Kongliga Vetenskaps Academiens nya Handlingar (İsveç Kraliyet Bilimi Bildirileri)*, 7, 30-34.
- Carpenter, C.F. & Chambers, H.F. (2004). Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 38(7), 994-1000. <https://doi.org/10.1086/383472>
- Carpentier, B. & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 499-511.
- Cascón, A., Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M., Hernanz, C., Luengo, J. M. & Naharro, G. (2000). A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 68(6), 3233-3241. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3233-3241.2000>
- Castro, G. (2002). Characterisation of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 2612, 1-9.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J.D. & Rakariyatham, N. (2007). Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Food Chemistry*, 100(3), 1044-1048. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.008>
- Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z. & Li, X. (2013). Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17477-17500.
- Choo, J.H., Rukayadi, Y. & Hwan, J.K. (2006). Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 42, 637–641.
- Chopra, A.K., Xu, X.J., Ribardo, D., Gonzalez, M., Kuhl, K., Peterson, J.W. & Houston, C.W. (2000). The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infection and Immunity*, 68(5), 2808-2818. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2808-2818.2000>
- Christy, G., Kusdawarti, R. & Handijatno, D. (2019). Determination of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* using the polymerase chain reaction (PCR) technique. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 236(1), 012097, IOP Publishing.
- Chu, T., Ni, C., Zhang, L., Wang Q., Xiao J., Zhang, Y. & Liu, Q. (2015). A quorum sensing-based in vivo expression system and its application in multivalent bacterial vaccine. *Microbial Cell Factories*, 14, 37.

- Chu, W., Zhou, S., Zhu, W. & Zhuang, X. (2014). Quorum quenching bacteria *Bacillus* sp. QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection. *Scientific Reports*, 4, 5446, <https://doi.org/10.1038/srep05446>.
- Churin, Y.N., Shalak, I.N., Borner, T. & Shestakov, S.V. (1995). Physical and genetic map of the chromosome of the unicellular *Cyanobacterium synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 177, 3337-3343.
- Civolani, C., Barghini, P., Roncetti, A.R., Ruzzi, M. & Schiesser, A. (2000). Ferulik asidin, *Pseudomonas fluorescens* suşu BF13'ün vanilya-negatif bir mutanını vasetasiyla vanilik aside biyo-dönüşümü. *Baş. Environmental Mikrobiyoloji*, 66 (6), 2311-2317. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2311,2317.2000> . PMC 110519 . P MID 10831404.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed., CLSI Supplement M100, USA.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. & Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 435-464.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. & Cheng, G.K. (1976). How bacteria stick. *Scientific American*, 238, 86-956.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A common Cause of Persistent Infections, *Science*, 284, 1318-1322.
- Covas, M.I., Nyssönen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.J.F., Kiesewetter, H. & Nascetti, S. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of internal medicine*, 145(5), 333-341.
- Çiftçi, Z. (2005). *Kronik Tonsillitte Biofilmin Rolü*. (Uzmanlık Tezi, T.C. İstanbul. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği)
- D Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- Dalla Serra, M., Coraiola, M., Viero, G., Comai, M., Potrich, C., Ferreras, M., Baba-Moussa, L., Colin, D.A., Menestrina, G., Bhakdi, S. & Prévost, G. (2005). *Staphylococcus aureus* bicomponent γ -hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *Journal of chemical information and modeling*, 45(6), 1539-1545. <https://doi.org/10.1021/ci050175y>.

- Davies, A., Capell, C., Jehanno, D., Nychas, G.J.E. & Kirby, R.M. (2001). Incidence of Foodborne Pathogens on European Fish. *Food Control*, 12, 67-71.
- Davies, D. (2003). Understveing biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-22.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. & Greenberg, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. & Verstraete, W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240, 69-88.
- Demircan, E. (2016). *Elma Kabuklarından Elde Edilen Fenolik Bileşiklerin Lipozom ile Enkapsülasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Dempsey, J.A.F., Livaker, W., Madhure, A., Snodgrass, T.L. & Cannon, J.G. (1991). Physical map of the chromosome of *Neisseria gonorrhoea* FA1090 with locations of genetic markers, including opa and pil genes. *Journal of Bacteriology*, 173, 5476-5486.
- Denshaw-Burke, Mary (2006-11-07). "Methemoglobinemia", Retrieved 2008-03-31, 1(5), 23-45.
- Dong, Y.H. & Zhang, L.H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *The Journal of Microbiology*, 43(1), 101-109.
- Dong, Y.H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.L. & Zhang, L.H. (2002). Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1754-1759.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z. & Zhang, L.H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy*, 97, 3526-3531.
- Donlan, R.M. & Costerton, W.J. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinical Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- Duman, M. (2017). *Gökkuşığı Alabalıklarında Görülen Motil Aeromonas (Aeromonas hydrophila, A. sobria, A. caviae), Yersinia ruckeri ve Lactococcus garvieae Bakterilerinin Antimikrobiyal Duyarlılıkları ve Duyarlılıkta Rol Oynayan Genlerin Tespiti*. (Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Durmaz, B. & Durmaz, R. (2001). *Pulsed field gel electrophoresis, Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji* (2. Basım). Editor: Durmaz, R. Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti., Adana, 161-168.

- Durmaz, R. (2001). *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji*. (2. Basım). Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti., Adana, 139-147.
- Durmaz, R. (2007). *Moleküler tiplendirmenin temel ilkeleri*, IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007, Malatya, 27-38.
- Durmaz, R. (2008). *Bakteri tiplendirme çalışmaları niçin gerekli?* XXXIII. Türk mikrobiyoloji kongresi, İstanbul, Kongre Kitabı, 27-30.
- Durmaz, Y. & Türk, N. (2009). Alabalık İşletmelerinden Motil Aeromonasların İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Saptanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Research Article*, 15(3), 357-361.
- Dusane, D.H., O'May, C. & Tufenkji, N. (2015). Effect of tannic and gallic acids alone or in combination with carbenicillin or tetracycline on *Chromobacterium violaceum* CV026 growth, motility, and biofilm formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(7), 487-494.
- Edwin, R.R.S. (2007). Hydroxycarboxylic Acids, Aromatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (7th ed.), Wiley, p.6.
- Elder, M.J., Stapleton, E.E. & Dart, K.G. (1995). Biofilm related infections in ophthalmology, *Eye*, 9, 102-109.
- El-Fatlawy, H.N.K. (2014). Bağdat'taki El-Jadryia nehrinden *A. hydrophila*'nın izolasyonu ve karakterizasyonu. *Amerikan Eğitim Araştırmaları Dergisi*, 2(8), 658-662.
- Erer, H. (2002). *Balık Hastalıkları* (2. Basım). Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Fang, H.M., Ge, R. & Sin, Y.M. (2004). Cloning, characterisation and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. *Fish and Shellfish Immunology*, 16, 645-658.
- Feil, E.J. & Enright, M.C. (2004). Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology (COMICR)*, 7(3), 308-313.
- Fernández, L., Álvarez, B., Menéndez, A., Méndez, J. & Guijarro, J.A. (2008). Molecular Tools for Monitoring Infectious Diseases in Aquaculture, Dynamic Biochemistry. *Process Biotechnology and Molecular Biology*, 2(1), 33-43.
- Figueiredo, H.C.P. & Leal, C.A.G. (2008). Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *R. Bras. Zootec*, 37, 8-14.
- Filik, F. & Kubilay, A. (2019). Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumunun Farklı In Vitro Metodlarla Tespiti. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 378-390. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537796>

- Filik, N. & Kubilay, A. (2020). *Aeromonas hydrophila* Balık Patojeninde Biyosensör Suşlar Aracılığıyla Çevreyi Algılama Sisteminin Tespiti ve Virülens Faktörleri. *Su Ürünleri Dergisi (EgeJFAS) Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 29-36. <https://doi.org/10.12714/egejfas.37.1.04>
- Fiuza, S.M., Gomes, C., Teixeira, L.J., Girão da Cruz, M.T., Cordeiro, M.N.D.S., Milhazes, N., Borges, F. & Marques, M.P.M. (2004). Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl, and octyl esters of caffeic and gallic acids (PDF). *Bioorganic & Medicinal Chemistry. Elsevier*, 12(13), 3581–3589.
- Ford, L.A. & Thune, R.L. (1992). Immunization of channel catfish with a crude, acid-extracted preparation of motile *Aeromonas* S-layer protein. *Biomed Lw*, 47, 355-62.
- Fuqua C., Winans S.C. & Greenberg E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.
- Fussenegger, M. (2010). Synthetic biology: Synchronized bacterial clocks. *Nature*, 463(7279), 301.
- Gado, M.S.M. (1998). Studies on The Virulence of *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Assiut Veterinary Medical Journal*, 40, 190-200.
- Gálvez, M.C., Barroso, C.G. & Pérez-Bustamante, J.A. (1994). Analysis of polyphenolic compounds of different vinegar samples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 199, 29–31. <https://doi.org/10.1007/BF01192948>.
- Game Changer Detox, (2018). How does Biofilm explain the Flare Up and Remission Cycle? Biofilm city. <http://gamechangerdetox.com/how-does-biofilm-explain-the-flare-up-and-remission-cycle/> (Son erişim tarihi: 03 Ekim 2019).
- Gardiner, K. (1991). Pulsed-field gel electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63, 658-665.
- Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomás, J.M., Gryllos, I. & Shaw, J.G. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular microbiology*, 43(2), 383-397.
- Goering, R.V. (2004). Pulsed-field gel electrophoresis, In: Persing, Editors: D.H., Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y.W., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J., *Molecular Microbiology; Diagnostic Principles and Practice*, ASM Press, Washington, D.C., 185-196.

- Grady, R., Desai, M., O'Neill, G., Cookson, B. & Stanley, J. (1999). Genotyping of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage type 15 isolates by fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3198-3203.
- Gray, K.M. & Garey, J.R. (2001). The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology*, 147, 2379-2387.
- Green, M.R. & Sambrook, J. (2019). Screening colonies by polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb-prot095224. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095224>.
- Greenberg, E.P. (1997). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*, 63, 371-377.
- Grigoriev, I.V., Nordberg, H., Shabalov, I., Aerts, A., Cantor, M., Goodstein, D., Kuo, A., Minovitsky, S., Nikitin, R., Ohm, R. A., Otilar, R., Poliakov, A., Ratnere, I., Riley, R., Smirnova, T., Rokhsar, D. & Otilar, R. (2012). The genome portal of the department of energy joint genome institute. *Nucleic acids research*, 40(D1), D26-D32. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr947>
- Grothues, D. & Tümmler, B. (1991). New approaches in genome analysis by pulsed-field gel electrophoresis: application to the analysis of *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology*, 5, 2763–2776.
- Gutierrez, J.A., Crowder, T., Rinaldo-Matthis, A., Ho, M.C., Almo, S.C. & Schramm, V.L. (2009). Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nature chemical biology*, 5(4), 251.
- Gülay, Z. (2010). İnfeksiyon Patogenezi. Solunum Sistemi İnfeksiyonları. 11, 47, <http://www.toraks.org.tr>. http://www.toraks.org.tr/toraks-kitappdf/solunum_sistemi_PDF/03.pdf. (Son erişim tarihi: 14 Nisan 2010)
- Güvener, R.P. (2001). *A study on the diagnosis of the aeromonad enfections in some aquarium fishes*. (Ms.c. thesis, Istanbul University)
- Hardman, A.M., Stewart, G.S.A.B. & Williams, P. (1998). Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 199-210.
- Hartman, G. & Wise, R. (1998). Quorum sensing: potential means of treating gram-negative infections?. *The Lancet*, 351(9106), 848-849.
- Hazen, T.C., Flierman, C.B., Hirsch, R.P. & Esch, G.W. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United State. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 731-738.
- Hellingwerf, K.J. (2005). Bacterial observations: a rudimentary from of intelligence?. *Trends in Microbiology*, 13(4), 152-158.

- Hendriksen, R.S. (2002). A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. Global Salm-Surv, Laboratory Protocols, Level 2 Training Course, Susceptibility testing of Salmonella using disk diffusion 3rd Ed. July. 2002.
- Henke, J.M. & Bassler, B.L. (2004). Bacterial social engagements, *Trends in Cell Biology*, 14(11), 648-656.
- Hentzer, M. & Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1300-1307.
- Honig, G.R. (2000). Hemoglobin disorder. In: Behrman RE, Kleigman RM, Jenson HB (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders, 1478-1488.
- Hossain, M.A., Lee, S.J., Park, N.H., Mechesso, A.F., Birhanu, B.T., Kang, J., Reza, M.A., Suh, J.W. & Park, S.C. (2017). Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.
- Hossain, S., Dahanayake, P.S., De Silva, B.C.J., Wickramanayake, M.V.K.S., Wimalasena, S.H.M.P. & Heo, G.J. (2019). Multidrug resistant *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*): antibiogram, antimicrobial resistance genes and class 1 integron gene cassettes. *Letters in Applied Microbiology*, 68(5), 370-377.
- Hudzick, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology.
- Ishida, T., Ikeda, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Ohtake, H. & Kato, J. (2007). Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by *N*-Acyl Cyclopentylamides. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3183-3188.
- Jangid, K., Kong, R., Patole, M.S. & Shouche, Y.S. (2007). *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. *BMC Microbiology*, 7(93), 1-11.
- Jayaraman, A. & Wood, T.K. (2008). Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, 145–67.
- Kamio, Y., Rahman, A., Nariya, H., Ozawa, T. & Izaki, K. (1993). The two Staphylococcal bi-component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Letters*, 321(1), 15-18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80611-w](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80611-w)
- Kaper, J.B., Lockman, H., Colwell, R.R. & Joseph, S.W. (1980). *Aeromonas hydrophila*: ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *Journal of Applied Microbiology*, 50, 359–377.

- Karadeniz, F. & Ekşi, A. (2001). Elma Suyunda Fenolik Madde Dağılımı Üzeride Araştırma. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 7(3), 135-141.
- Keçeli, T. & Gordon, M.H. (2001). The Antioxidant Activity and Stability of the Phenolic Fraction of Green Olives and Extra Virgin Olive Oil22. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1391-1396.
- Keçeli, T. (2000). Antimicrobial and antioicidant Activity of Olive Oil Phenolics, in Food Science and technology. *The University of Reading: Reading*. 312 s.
- Kielwein, G. (1969). Ein Nährboden zur selektiven Züchtung von *Pseudomonaden* und *Aeromonaden*. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 20, 131-133.
- Kielwein, G. (1971). *Pseudomonaden* und *Aromonaden* in Trinkmilch: Ihr Nachweis und ihre Bewertung. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 22, 15-19.
- Kielwein, G., Gerlach, R.U. & Johne, H. (1969). Untersuchungen über das Vorkommen von *Aeromonas hydrophila* in Rohmilch. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 20, 34-38.
- Kingombe, C.I.B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M.J., Swings, J., Peduzzi, R. & Jemmi, T. (1999). PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5293–5302. 10.1128/AEM.65.12.5293-5302.1999.
- Ko, W.C., Lee, H.C., Chuang, Y.C., Liu, C.C. & Wu, J.J. (2000). Clinical features and therapeutic implications of 104 episodes of monomicrobial *Aeromonas* bacteremia. *Journal of Infectious*, 40, 267-73.
- Koch, R. (1884). Die Aetiologie der Tuberkulose. *Mitt Kaiser Gesundh*, 2, 1-88.
- Korun, J. & Toprak, H.B. (2010). Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’nin bağırsağından izole edilen hareketli *Aeromonas* suşlarının antibiyotik hassasiyetleri üzerine NaCl’un etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(2), 193-198.
- Koyama, K., Goto-Yamamoto, N. & Hashizume, K. (2007). Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71,(4), 958–65. <https://doi.org/10.1271/bbb.60628>
- Kozlova, E.V., Khajanchi, B.K., Popov, V.L., Wen, J. & Chopra, A.K. (2012). Impact of QseBC System in cdi-GMP-Dependent Quorum Sensing Regulatory Network in a Clinical Isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *Microbial Pathogenesis*, 53, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.05.008>
- Körkoca, H., Berktaş, M., Durmaz, R. & Gürsoy, N.C. (2013). The Research of Clonal Relationship Among *Aeromonas* Strains Isolated from Human,

Animal and Drinking Water by PFGE. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 271-276, <https://doi.org/10.9775/kvfd.2012.7659>.

- Kumar, S.P., Shankar, R.S., Pasım, R.K., Sabayasaohı, P. & Kumar, D.B. (2019). Pathogenic status, antibiogram, adhesive characteristics, heavy metal tolerance and incidence of integrons of infected fish-isolated *Aeromonas* sp. *Journal of Sustainability Science and Management*, 14(2), 21-35.
- Kumarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S. & Krishnan, P. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 597- 602. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
- Kusdarwati, R., Kurniawan, H. & Prayogi, Y.T. (2017). Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia* sp. on catfish (*Clarias gariepinus*) in floating cages in Bozem Moro Krembangan Surabaya, In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 55(1), 012-038, IOP Publishing.
- Lade, H., Paul, D. & Kweon, J.H. (2014). Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), 550-565.
- Laith, A.R. & Najiah, M. (2013). *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5(2), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000215>.
- Lallier, R. & Higgins, R. (1988). Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas* spp. isolated from diseased mammals, moribund and healthy fish. *Veterinary Microbiology*, 18, 63-71.
- Larrosa, M., González-Sarrias, A., Yáñez-Gascón, M.J., Selma, M.V., Azorín-Ortuño, M., Totia, S., Tomás-Barberán, F.A., Dolara, P. & Espín, J.C. (2010). Antiinflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolics metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 717–725.
- Lasee, B.A. (1995). Introduction To Fish Health Management, U.S. Fish and Wildlife Service La Crosse Fish Health Center 555, Lester Avenue Onalaska, Wisconsin, 54650.
- Leblanc, D., Mittal, K.R., Olivier, G. & Lallier, R. (1981). Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(1), 56-60.
- Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J. & Courvalin, P. (1988). "Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*", *The New England Journal of Medicine (NEJM)*, 319, 157-161.

- Lee, H.J., Cho, H.S., Park, E., Kim, S., Lee, S.Y., Kim, C.S., Kim, D.K., Kim, S.J. & Chun, H.S. (2008b). Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*, 250(2-3), 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.06.010>
- Lee, J., Jung, E., Koh, J., Kim, Y. S. & Park, D. (2008a). Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis. *The Journal of dermatology*, 35(12), 768-771.
- Lehone, L. & Rawlin, G.P. (2000). Fish Diseases and Human Health in Aquaculture. *Medical Journal of Australia*, 173(5), 256-259.
- Lerat, E. & Moran, N.A. (2004). The Evolutionary History of Quorum Sensing Systems in Bacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 903-913.
- Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J.F., Ceccaldi, B.C., Brunerie, P. & Asther, M. (1996). *Aspergillus niger* ve *Pycnoporus cinnabarinus*'u birleştiren ferulik asitten vanilin üretimi için iki aşamalı bir biyolojik dönüşüm süreci. *Journal of Biotechnology*, 50(2-3), 107–113. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(96\)01552-0](https://doi.org/10.1016/0168-1656(96)01552-0) . PMID 8987621.
- Ljungh, A., Wretling, B. & Möllby, R. (1981). Separation and Characterization of Enterotoxin and Two Haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 89B(1-6), 387-397.
- Lu, J., Wang, Z., Ren, M., Huang, G., Fang, B., Bu, X., Liu, Y. & Guan, S. (2016). Antibacterial Effect of Gallic Acid against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* Through Damaging Membrane Integrity. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(13), 1153-1158.
- Lu, L., Hume, M.E., Sternesc, K.L. & Pillaia, S.D. (2004). Genetic diversity of *Escherichia coli* isolates in irrigation water and associated sediments: Implications for source tracking. *Water Research*, 38, 3899-3908.
- Lukistyowati, I. (2012). Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih (Detection of Aerolysin Gen from *Aeromonas hydrophila* In Common Carp Fed With Garlic Extract. *Journal Veteriner Maret*, 13(1), 43-50.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E.R. & Williams, P. (2002). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, 4, 18–28.
- MacIntyre, S. & Buckley, J.T. (1978). Presence of Glycerophospholipid: Cholesterol Acyltransferase and Phospholipase in Culture Supernatant of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 135(2), 402-407.
- Madigan, M.T. (2010). *Brock Biology of Microorganisms*. 13th Edition. p. 804. ISBN 978-0-321-64963-8.

- Maheswaran, S.K. & Lindorfer, R.K. (1967). Staphylococcal beta-hemolysin. II. Phospholipase C activity of purified beta-hemolysin. *Journal of Bacteriology*, 94(5), 1313–9.
- Mämmelä, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J. & Vartiainen, T. (2000). Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00624-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00624-5).
- Mancini, M. A., Galetto, M., Gonzalez Quintana, H. (1997). Identification, clinical signs and histopathological lesions of *Aeromonas hydrophila* in fishes (*Odontesthes bonariensis*). *Revista de Medicina Veterinaria Buenos Aires*, 78(1), 65-68.
- Manefield, M., de Nys, R., Naresh, K., Roger, R., Givskov, M., Peter, S. & Kjelleberg, S. (1999). Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 145(2), 283-291.
- Marcos, M.A., Jimenez de Anta, M.T. & Vila, J. (1995). Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medical Microbiology*, 42, 328-335.
- Mateos, D., Anguita, J., Rivero, O., Naharro, G. & Paniagua, C. (1992). Comparative study of virulence and virulence factors of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from water and sediments of a river. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin= International journal of hygiene and environmental medicine*, 193(2), 114-122.
- Mathewson, J.J. & Dupont, H.L. (1992). *Aeromonas* species: role as human pathogens. In: Remington, J. S., Swartz, M. N. (eds.), *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, Vol12e. Cambridge: Blackwell Scientific. 26–36.
- McGillivray, D.J., Valincius, G., Heinrich, F., Robertson, J.W.F., Vanderah, D.J., Febo-Ayala, W., Ignatjev, I., Lösche, M. & Kasianowicz, J.J. (2009). Structure of functional *Staphylococcus aureus* α -hemolysin channels in tethered bilayer lipid membranes. *Biophysical Journal*, 96, 1547. PMC (60 citations).
- Middleton, B., Rodgers, H.C., Camara, M., Knox, A.J., Williams, P. & Hardman, A. (2002). Direct detection of *N*-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiology Letters*, 207, 1-7.
- Morinaga, N., Kaihou, Y. & Noda, M. (2003). Purification, cloning and characterization of variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of staphylococcal bi-component leukotoxin family. *Microbiology and Immunology*, 47(1), 81-90. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb02789.x>

- Mueller, H.J. & Hinton, J. (1941). A protein-free medium for primary isolation of the Gonococcus and Meningococcus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 48, 330-333.
- Nakai, S. (2000). *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*, *Water Research*, 34(11), 3026-3032. [https://doi.org/doi:10.1016/S0043-1354\(00\)00039-7](https://doi.org/doi:10.1016/S0043-1354(00)00039-7)
- National Center Biotechnology Information, (2019a). Gallic Acid. U.S. National Library of Medicine. Pub Chem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/370> (Son erişim tarihi: 08 Ekim 2019)
- National Center Biotechnology Information, (2019b). Rosmarinic Acid. U.S. National Library of Medicine. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rosmarinic-acid> (Son erişim tarihi: 07 Ekim 2019)
- National Center Biotechnology Information, (2019c). Vanillin. U.S. National Library of Medicine. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1183> (Son erişim tarihi: 09 Ekim 2019)
- Naylor, R. & Burke, M. (2005). Aquaculture and ocean resources: raising tigers of the sea. *Annual Review of Environment and Resources*, 30, 185–218.
- NCBI Genome Project, (2006). *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genomeprj&cmd=ShowDetailView&TermToSearch=16697> (Son erişim tarihi: 16 Ekim 2019)
- Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., & Larsen, J.L. (2001). Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?. *Diseases of aquatic organisms*, 46(1), 23-29.
- Nieto, T.P., Santos, Y., Rodriguez, L.A. & Ellis, A.E. (1991). An Extracellular Acetyl Choline Estrase Produced by *Aeromonas hydrophila* is A Major Lethal Toxin For Fish. *Microbial Pathogenesis*, 11, 101-110.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I.V. & Dubchak, I. (2014). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute, 2014 updates. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D26-D31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1069>
- Nurcan, N. (2010). *Bazı Gram-Negatif Bakteriyel Balık Patojenlerinde Çevreyi Algılama Sisteminin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)

- Ohman, D.E., Cryz, S.J. & Iglewski, B.H. (1980). Isolation and Characterization of A *Pseudomonas aeruginosa* PAO Mutant That Produces Altered Elastase. *Journal of Bacteriology*, 142, 836-842.
- Old, D.C., Rankin, S.C. & Crichton, P.B. (1999). Assessment of strain relatedness among *Salmonella* serotypes Salinatis, Duisburg, and Sandiego by biotyping, ribotyping, IS200 fingerprinting, and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1687-1692.
- Onuk, E.E., Tanrıverdi Çaycı, Y., Çoban, A.Y., Çiftci, A., Balta, F., Didinen, B.I. & Altun, S. (2017). Balık ve yetiştirme suyu kökenli *Aeromonas* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması. Kısa Bilimsel Çalışma/Short Communication. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64, 69-73.
- Önem, E. (2013). *Çevreyi Algılama (Quorum Sensing) İnhibitörü Olarak Tasarlanan Moleküllerin Etkileri Üzerine Çalışmalar*. (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı)
- Öztürk, D., Adanır, R. & Turutoğlu, H. (2007). Bir sazan (*Cyprinus carpio*) işletmesinde *Aeromonas hydrophila* izolasyonu ve antibiyotik duyarlılığı. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, at Mugla.
- Öztürk, R.Ç. & Altınok, İ. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1), 275-297.
- Pandurangan, A.K., Mohebbali, N., Norhaizan, M.E. & Looi, C.Y. (2015). Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Design Development and Therapy*, 9, 3923-3934. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86345>
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L, Cronan, J.E. & Greenberg, E.P. (1999). Acyl homoserine lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy*, 96, 4360–4365.
- Pathiratne, A., Widanapathirana, G.S. & Chandrakanthi, W.H.S. (1994). Association of *Aeromonas hydrophila* with epizootic ulcerative syndrome (EUS) of freshwater fish in Sri Lanka. *Journal of Applied Ichthyology*, 10, 204–8.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGravin, M.J. & Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence o microorganisms to host tissue. *Annual Review of Microbiology*, 48, 585-617.
- Petersen, A, Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T. & Dalsgaard, A. (2002). Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Applend and Environmental Microbiology*, 68, 6036–6042.
- Petersen, M. & Simmonds, M.S.J. (2003). Rosmarinic acid. *Molecules of Interest. Phytochemistry*, 62(2), 121-125.

- Pfaller, M.A. (2001). Molecular approaches to diagnosis and managing infectious diseases: Practicallity and costs. *Emerging Infectious Diseases (EID)*, 7, 312-318.
- Pier, G.B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(5), 277-295.
- Ponnusamy, K., Paul, D. & Kweon, J.H. (2009). Inhibition of Quorum Sensing Mechanism and *Aeromonas hydrophila* Biofilm Formation by Vanillin. *Environmental Engineering Science*, 26(8), <https://doi.org/10.1089=ees.2008.0415>
- Preston, M.A., Johnson, W., Khakhria, R. & Borczyk, A. (2000). Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2366-2368.
- Psotova, J., Svobodova, A., Kolarova, H. & Walterova, D. (2006). Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(3), 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2006.02.012>
- Radu, S., Ahmad, N., Ling, F.H. & Reezal, A. (2003). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 81(3), 261-266. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00228-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00228-3)
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D. & Young, J.M. (2005). Bacterial Communication (“Quorum Sensing”) via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 417-423.
- Rahman, M.H., Kawai, K. & Kusuda, R. (1997). Virulence of starved *Aeromonas hydrophila* to cyprinid fish. *Journal of Fish Pathology*, 32, 163-168.
- Rajalaxmi, M., Beema Shafreen, R., Iyer, P.M., Sahaya Vino, R., Balamurugan, K., & Pandian, S.K. (2016). An in silico, in vitro and in vivo investigation of indole-3-carboxaldehyde identified from the seawater bacterium *Marinomonas* sp. as an anti-biofilm agent against *Vibrio cholerae* O1. *Biofouling*, 32(4), 439-450.
- Rama Devi, K., Srinivasan, R., Kannappan, A., Santhakumari, S., Bhuvaneswari, M., Rajasekar, P. & Veera Ravi, A. (2016). In vitro and in vivo efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*. *Biofouling*, 32(10), 1171-1183. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1237220>

- Rasko, D. & Sperandio, V. (2010). Anti-Virulence Strategies to Combat Bacteria-Mediated Disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 117-128.
- Rasmussen-Ivey, C.R., Figueras, M.J., McGarey, D. & Liles, M.R. (2016). Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 7(1337), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01337>
- Ray, C.G., Ryan, K.J. & Kenneth, R. (2004). *Sherris Medikal Mikrobiyoloji: Enfeksiyon Hastalıklarına Giriş* (4. basım). McGraw Hill, 237. ISBN 978-0-8385-8529-0. LCCN 2003054180 . OCLC 52358530.
- Rehulka, J. (2002). *Aeromonas* causes severe skin lesions in Rainbow trout, Clinical pathology, haematology and biochemistry. *Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology*, 71, 351-360.
- Rey, G., Fouillet, A., Bessemoulin, P., Frayssinet, P., Dufour, A., Jougla, E. & Hémon, D. (2009). Heat exposure and socio-economic vulnerability as synergistic factors in heat-wave-related mortality. *European Journal of Epidemiology*, 24(9), 495-502. <https://doi.org/10.1007/s10654-009-9374-3>
- Richards, J.J. & Melveer, C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, 10(14), 2287-94.
- Roberts, R.J. & Shepherd, C.J. (2001). *Alabalık ve Salmon Hastalıkları*. (Handbook of Trout and Salmon Diseases), (Çevirmen: Vatansever, H.). Akademi-ÜĞÜRER Tarımsal Kitap Tanıtım ve Pazarlama Hizmetleri, Kayseri, s.254.
- Rodrigues, A.C., Oliveira, B.D., Silva, E.R.D., Sacramento, N.T.B., Bertoldi, M.C. & Pinto, U.M. (2016). Anti-quorum sensing activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). *Food Science and Technology*, 36(2), 337-343.
- Rodriguez, L.A., Ellis, A.E. & Nieto, T.P. (1992). Effects of Acetylcholinesterase Toxin of *Aeromonas hydrophila* on The Central Nervous System of Fish. *Microbial Pathogenesis*, 14, 411-415.
- Romero, J., Feijoó, C.G. & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture-Use, Abuse and Alternative. *INTECH Open Access Publisher*, 159-198, <https://doi.org/10.5772/28157>
- Sader, H.S., Pignatari, A.C., Leme, I.L., Burattini, M.N., Tancredi, R., Hollis, R.J. & Jones, R.N. (1993). Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 17, 13–18.
- Sağlam, Y.S., Işık, N., Arslan, A. & Erer, H. (2006). Erzurum Bölgesindeki Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792) *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* İzolasyonu ve Patolojik İncelemeler. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1(1-2), 6-10.

- Salyers, A.A. & Whitt, D.D. (1994). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 1st ed. Washington, D.C: ASM Press, 260-268, USA.
- Samayanpaulraj, V., Sivaramapillai, M., Palani, S. N., Govindaraj, K., Velu, V. & Ramesh, U. (2020). Identification and characterization of virulent *Aeromonas hydrophila* Ah17 from infected *Channa striata* in river Cauvery and in vitro evaluation of shrimp chitosan. *Food Science & Nutrition*, 8(2), 1272-1283.
- Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R. & Yoshikawa, T. (2003). Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(8), 1060-1069. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00040-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00040-6)
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.C., Nieto, T.P. & Villa, T.G. (1998). Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strain isolated from fish. *Infection and Immunity American Society for Microbiology*, 56(12), 3285-3293.
- Sarabhai, S., Sharma, P. & Capalash, N. (2013). Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *PLoS One*, 8, e53441.
- Saraçlı, M.A. (2006). Quorum sensing: mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. *Gülhane Tıp Dergisi*, 48(4), 244-250.
- Sarkodie, E.K., Zhou, S. & Chu, W. (2019). N-Acylhomoserine Lactones (AHLs), QseB/C Gene Detection, Virulence Factors and Antibiotics Resistance of *Aeromonas hydrophila*. *Advances in Microbiology*, 9(5), 495.
- Scheffer, J, König, W, Braun, V. & Goebel, W. (1988). Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 544–551.
- Sen, K. & Rodgers, M. (2004). Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1077-1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x>
- Sendamangalam, V., Choi, O.K., Kim, D. & Seo, Y. (2011). The antibiofouling effect of polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Biofouling*, 27(1), 13–19.
- Sentromer, (2020). Sentromer DNA Teknolojileri Oligonükleotit Sentezleme Genel Bilgi. <https://www.sentromer.com/> (Son erişim tarihi: 01 Ocak 2020)
- Sequences, (2008). Bakteri hücreleri arasında haberleşme (Cell-to-cell communication: quorumsensing). <http://www.genotyping.wordpress.com>. <http://genotyping.wordpress.com/200>

- Seshadri, R., Joseph, S.W., Chopra, A.K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M.J., Madupu, R., Tallon, L., Kim, M., Jin, S., Vuong, H., Stine, O.C., Ali, A., Horneman, A.J. & Heidelberg, J.F. (2006). Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T: jack of all trades. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8272-8282. <https://doi.org/10.1128/JB.00621-06>
- Shankar, N., Baghdayan, A.S., Willems, R., Hammerum, A.M. & Jensen, L.B. (2006). Presence of Pathogenicity Island Genes in *Enterococcus faecalis* Isolates from Pigs in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 4200-4203.
- Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J. & Trentin, D.S. (2016). Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical reviews*, 116(16), 9162-9236.
- Smith, D., Willshaw, G., Stanley, J. & Arnold, C. (2000). Genotyping of verocytotoxinproducing *Escherichia coli* O157: comparison of isolates of a prevalent phage type by fluorescent amplified-fragment length polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12), 4616-4620.
- Smith, E.F. (1905). Bacteria in relation to plant disease. *Science*, 22(569), 670.
- Snower, D.P., Ruef, C., Kuritza, A.P. & Edberg, S.C. (1989). Tıbbi sülükler kullanımı ile ilişkili *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonu. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 1421-2. PMC 267578 . PMID 2666448.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J.A. & Doudoroff, M. (1966). The Aerobic *Pseudomonas*-a Taxonomic Study. *Journal of General Microbiology*, 42, 159-271.
- Stewart, P.S. & Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358 (9276), 135-138. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)05321-1)
- Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J. & Fuqua, C. (1998). Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3486-3490.
- Swaminathan, B. & Matar, G.M. (1993). Molecular typing methods. In: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., White, T. J. (eds), *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, ASM Press, Washington, 26-50.
- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S. & Stewart, G.S.A.B. (1997). Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the

LuxRI Homologs *AhyRI* and *AsaRI* and Their Cognate *N*-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5271-5281.

Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B. & Williams, P. (1999). Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5192-5199.

Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P. & Stewart, G.S. (1994). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 214-219.

Szczesny, P., Iacovache, I., Muszewska, A., Ginalski, K., Van Der Goot, F. G. & Grynberg, M. (2011). Extending the aerolysin family: From bacteria to vertebrates. *PLoS ONE*, 6(6), e20349 10.1371/journal.pone.0020349.

Talon, D., Dupont, M.J., Lesne, J., Thouverez, M. & Michel-Briand, Y. (1996). Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Bacteriology*, 80(3), 277-282.

Tateda, K. (2001). Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents*, 45, 1930–1933.

Tendolkar, P.M., Baghdayan, A.S. & Shankar, N. (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2622–2636.

Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R., Kreiswirth, B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, L.K., Miller, J.M., Mulligan, M. & Pfaller, M.A. (1994). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 407-415.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2233-2239.

Theguardian, (2020). Antibiotics Powerful antibiotic discovered using machine learning for first time. <https://www.theguardian.com/society/2020/feb/20/antibiotic-that-kills-drug-resistant-bacteria-discovered-through-ai> (Son erişim tarihi: 01.08.2020)

Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J. & Karutha Pandian, S. (2009). Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 57(3), 284-294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00613.x>

- Thompson, J.R., Cronin, B., Bayley, H. & Wallace, M.I. (2011). Rapid assembly of a multimeric membrane protein pore. *Biophysical Journal*, 101(11), 2679–83. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.054>
- Timur, M. (1983). An outbreak of disease of farmed eel (*Anguilla anguilla*) due to *Aeromonas hydrophila* in Turkey, Histopathological and bacteriological studies. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30 (3), 361-367.
- Tompkins, L.C. (1998). Molecular epidemiology in infectious diseases In: Gorbach, S.L., Bartlett, J.G., Blacklow, N.R. (Eds), *Infectious Diseases*, 2nd ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 28-35.
- Truchado, P., Tomas-Barberá N.F.A., Larrosa, M. & Allende, A. (2012). Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control*, 24(1–2), 78–85.
- Turan, N.B. & Engin, G.Ö. (2018). Quorum quenching. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, 81, 117-149, Elsevier.
- Türe, M., Altınok, İ., Işıdan, H., Savaş, H. & Kutlu, İ. (2012). PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi Projesi. *T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Proje Sonuç Raporu*, TAGEM/HS/10/09/02/179, 61s.
- Türksoy, S. (2018). *Fonksiyonel Gıdalar, Fenolik Bileşikler*, 3(3), 28-37.
- Upadhyaya, P.M.G., Ravikumar, K.L. & Umapathy, B.L. (2009). Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27, 301- 305.
- Uroz, S., Dessaux, Y. & Oger, P. (2009). Quorum Sensing and Quorum Quenching: The Yin and Yang of Bacterial Communication. *Chem. Bio. Chem.*, 209, 205-216.
- Uttley, A.H., Collins, C.H., Naidoo, J. & George, R.C. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *The Lancet*, 1, 57-58.
- Uysal, A. (2012). *Çeşitli Escherichia coli Suşlarının Pulsed Field Jel Elektroforez Yöntemi ile Tiplendirilmesi, Plazmit Profilleri ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması*. (Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Van Der Kooj, D. (1988). Properties of Aeromonads and their occurrence and hygienic significance in drinking water. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 187, 1–17.
- Van Looveren, M., Ison, C.A., Ieven, M., Vandamme, P., Martin, I.M., Vermeulen, K., Renton, A. & Goossens, H. (1999). Evaluation of the discriminatory

- power of typing methods for *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2183- 2188.
- Von-Graevenitz, A. & Altwegg, M. (1991). *Aeromonas* ve *Plesiomonas*. A. Balows, W.J. Jr Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology* 5th edition, p 396-401 ASM, Washington DC.
- Wang, G., Clark, C.G., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C.K., Kruk, T.M.A.C. & Rodgers, F.G. (2003). Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1048–1054. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003>
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000). Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- Wells, J.C. (2008). *Longman Pronunciation Dictionary* (3rd ed.). Longman. ISBN 978-1-4058-8118-0.
- Werner, S.B. & Rutherford, G.W. (1990). *Aeromonas* wound infections associated with outdoor activities California. *California Department of Health Care Services*, 39(20), 334-335.
- Whitby, P.W., Landon, M. & Coleman, G. (1992). The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 99(1), 65-71.
- Williams, P. (2007). Quorum Sensing, Communication and Cross-Kingdom Signalling in the Bacterial World. *Microbiology*, 153, 3923-3938.
- Winson, M.K., Cámara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Lazdunski, A. Stewart, G.S.A.B. & Williams, P. (1995). Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy*, 92, 9427–9431.
- Witek, K., Ścisłowska, J., Turowski, D., Lerczak, K., Lewandowska-Pachecka, S. & Pokrywka, A. (2017). Total bilirubin in athletes, determination of reference range. *Biology of Sport*, 34(1), 45–48. <https://doi.org/10.5114/biolsport.2017.63732>
- Witte, W. (2000). Selective pressure by antibiotic use in livestock. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16, 19–24.
- Woods, D.E. (2004). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends in Microbiology*, 12(10), 437-439.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J. B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N. & Givskov, M. (2000). Detection of *N*-acyl

homoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology- (UK)*, 146, 2481-2493.

- Wu, L. (2013). Microbes, minerals, and isotopes, Wat on Earth. Department of Earth and Environmental Sciences, University of Waterloo. <https://uwaterloo.ca/wat-on-earth/news/microbes-minerals-and-isotopes> (Son erişim tarihi: 02 Ekim 2019)
- Xavier, K.B. & Bassler, B.L. (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion Microbiology*, 6, 191-197.
- Xia, C., Ma, Z., Rahman, H. & Wu, Z. (2004). PCR Cloning and identification of the bhemo lysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. *Aquaculture*, 229, 45–53.
- Xu, X.J., Ferguson, M.R., Popov, V.L., Houston, C.W., Peterson, J.W. & Chopra, A. K. (1998). Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. *Infection and immunity*, 66(8), 3501-3509.
- Yambot, A.V. (1998). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from *Oreochromis niloticus* during fish disease outbreaks in the Philippines. *Asian Fisheries Science*, 10, 347–54.
- Yetkin, G., Otlu, B., Çiçek, A., Kuzucu, C. & Durmaz, R. (2006). Clinical, Microbiologic and Epidemiologic Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *American Journal of Infections Control*, 34, 188-92.
- Yu, H.B., Rao, P.S., Lee, H.C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J.M. & Leung, K.Y. (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and Immunity*, 72(3), 1248-1256.
- Zhang, B., Zhuang, X., Guo, L., McLean, R.J.C. & Chu, W. (2019). Recombinant N-acyl homoserine lactone-Lactonase AiiAQSI-1 Attenuates *Aeromonas hydrophila* Virulence Factors, Biofilm Formation and Reduces Mortality in *Crucian Carp*. *Marine Drugs*, 17(9). pii: E499. 1-12. <https://doi.org/10.3390/md17090499>.
- Zhang, D., Pridgeon, J.W. & Klesius, P.H. (2013). Expression and activity of recombinant proaerolysin derived from *Aeromonas hydrophila* cultured from diseased channel catfish. *Veterinary Microbiology*, 165(3-4), 478-482.
- Zhu, J. & Winans, S.C. (2001). The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(4), 1507–1512. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1507>
- Zhu, W., Zhou, S. & Chu, W. (2020). Comparative proteomic analysis of sensitive and multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased

fish. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103930.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103930>

Zucca, P., Rosa, A., Tuberoso, C., Piras, A., Rinaldi, A., Sanjust, E., Dessi, M.A. & Rescigno, A. (2013). Evaluation of antioxidant potential of “Maltese Mushroom”(Cynomorium coccineum) by means of multiple chemical and biological assays. *Nutrients*, 5(1), 149-161.
<https://doi.org/10.3390/nu5010149>



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurdan FİLİK
Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1986
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : nurdansal@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Isparta ŞAİK Lisesi, 2003
Lisans : ISUBÜ, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, 2008
Yüksek Lisans : SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010

Mesleki Deneyim

Yalova Üniversitesi Armutlu MYO Öğretim Görevlisi 2012-2015
Süleyman Demirel Üniversitesi 2015-..... (halen)

Yayınlar

- Bülbül, Z. & Filik, N. (2019). Gemi Yapımında Kullanılan Ahşap Malzemelerde Oluşan Biyofilm ve Fouling. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 7(1), 1-6. e-ISSN: 1308-6693, Derleme Makalesi, <https://doi.org/10.21923/jesd.399223>
- Filik, F., Kubilay, A. & Filik, N. (2017). Biofilm Formation In Bacterial Fish Pathogens. *Limnofish (Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research)*, 1st International Limnology and Freshwater Fishery Symposium. 04-06 October 2017. Eğirdir/Isparta/Türkiye.
- Filik, N., Önem, E. & Kubilay, A. (2021). *Aeromonas hydrophila* Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri. *Acta Aquatica Turcica* (Kabul Edilmiş Makale)
- Filik, N. & Kubilay, A. (2018). Quorum Sensing System and Virulence Factors in Fish Pathogen: *Yersinia ruckeri*, ICENS 2018, 4th International Conference on Engineering and Natural Science, May 2-6, 2018, Kiev/Ukraine.

- Filik, N. & Kubilay, A. (2019). *Yersinia ruckeri* Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Yönetimindeki Virülens Faktörlerinin Araştırılması. *Acta Aquatica Turcica*, 15(3), 391-403. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537802>.
- Filik, N. & Kubilay, A. (2020). *Aeromonas hydrophila* Balık Patojeninde Biyosensör Suşlar Aracılığıyla Çevreyi Algılama Sisteminin Tespiti ve Virülens Faktörleri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(1), 29-36. <https://doi.org/10.12714/egejfas.37.1.04>
- Hakemlik/Editörlük (2020). SCI, SSCI veya AHCI dışındaki dergilerde Makale değerlendirme/hakemlik. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi (Hakemlik)
- Kubilay, A., Önem, E. & Filik, N. (2020). Alanında bilimsel araştırma ve çalışmalar için ulusal burs almak. Kültür Balıklarından İzole Edilen *Aeromonas hydrophila* Suşlarında Fenolik Bileşenlerin Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine İnhibisyon Etkisi ve Suşlar Arasındaki Moleküler Epidemiyolojik İlişkinin Belirlenmesi - TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Proje No: 119O761 Proje Başlangıç Tarihi: 01.10.2019- Proje Bitiş Tarihi: 01.10.2020
- Kubilay, A., Önem, E. & Filik, N. (2020). Projede Görev Almak. Kültür Balıklarından İzole Edilen *Aeromonas hydrophila* Suşlarında Fenolik Bileşenlerin Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine İnhibisyon Etkisi ve Suşlar Arasındaki Moleküler Epidemiyolojik İlişkinin Belirlenmesi - TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Proje No: 119O761 Proje Başlangıç Tarihi: 01.10.2019- Proje Bitiş Tarihi: 01.10.2020
- Nurcan, N. & Kubilay, A. (2010). Projede Görev Almak. Bazı Gram Negatif Bakteriyel Balık Patojenlerinde Çevreyi Algılama Sisteminin İncelenmesi SDÜ BAP Yüksek Lisans Proje No: 1973-YL-09 Proje Başlangıç Tarihi: 16.12.2009 - Proje Bitiş Tarihi: 16.12.2010
- Nurcan, N. & Kubilay, A. (2016). *Pseudomonas fluorescens* Balık Patojeninde Çevreyi Algılama Sistemi ve Virülens Faktörleri. *Turkish Journal of Aquatic Sciences*, 31(2) <https://doi.org/10.18864/TJAS201608>
- Nurcan, N. & Kubilay, A. (2016). Quorum Sensing System and Virulence Factors in Fish Pathogen: *Aeromonas hydrophila*. FABA 2016: International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences Abstract Book 3-5 November 2016, Antalya/Turkey.
- Nurcan, N. (2012). II. Balık Besleme ve Yem Teknolojisi Çalıştayı Yalova Üniversitesi Yerel Düzenleme Kurulu Üyesi (Öğr. Gör. Nurdan NURCAN)
- Nurcan, N., Kubilay, A. & Boşgelmez Tınaz, G. (2016). *Vibrio anguillarum* Suşlarında Çevreyi Algılama Sistemi ve Virülens Faktörlerinin İncelenmesi, *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 12(1), 49-57.
- Nurcan, N., Kubilay, A. & Tınaz, G. (2010). *Vibrio anguillarum* Suşlarında Çevreyi Algılama Sisteminin İncelenmesi, *Akuakültürde Su Kalitesi ve Balık Sağlığı Çalıştayı*, 28-29 Haziran, Eğirdir/Isparta/Turkey.