

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria* BAKTERİLERİNİN**
TANIMLANMASINDA FARKLI FENOTİPİK TANIMLAMA
KİTLERİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Şerafettin BALCI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Şevki KAYIŞ

JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU

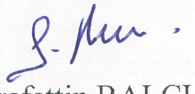
Doç. Dr. Ertuğrul TERZİ

RİZE-2020

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria* Bakterilerinin Tanımlanmasında Farklı Fenotipik Tanımlama Kitlerinin Kullanılabilirliğinin Karşılaştırılması” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 26/10/2020


Şerafettin BALCI

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada; farklı balık türleri ve su örneklerinden izole edilen *Aeromonas hydrophila* ve *A. sobria* bakterilerinin fenotipik tanımlanması çalışılmıştır. Tezin gerçekleştirilmesi aşamasının önerileri ve paylaşımlarıyla yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Şevki KAYIŞ'a, laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı Arş. Gör. Akif ER ve Arş. Gör. Zeynep Zehra İPEK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında verdiğim kararlarda, maddi ve manevi her konuda yanımda olan değerli aileme ve eşim Esmâ BALCI'ya yürekten teşekkür ederim.

Bu Yüksek Lisans Tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-1023 nolu proje ile desteklenmiştir.

Şerafettin BALCI

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria* Bakterilerinin Tanımlanmasında Farklı Fenotipik Tanımlama Kitlerinin Kullanılabilirliğinin Karşılaştırılması” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 26/10/2020

Şerafettin BALCI

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

***Aeromonas hydrophila* VE *Aeromonas sobria* BAKTERİLERİNİN TANIMLANMASINDA FARKLI FENOTİPİK TANIMLAMA KİTLERİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Şerafettin BALCI

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Şevki KAYIŞ**

Gerçekleştirilen bu tezde, moleküler yöntemler ile daha önce tanımlanan *Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria* bakterilerinin iki farklı fenotipik tanımlama kitleri ile tanımlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla API 20NE ve Microgen GN-ID A+B Panel kitleri kullanılmıştır. Bu sayede her iki yöntemin kıyaslaması yapılmıştır. Ticari olarak kullanılan iki farklı tanımlama kitinin bakterilerde kullanımı belirlenmiştir. Bu bağlamda çalışmada 9 adet *A. hydrophila* ve 9 adet *A. sobria* suşu ile her bakteriye ait ATCC suş bakteriler kullanılmıştır. Fenotipik tanımlama sonrasında *A. hydrophila* bakterileri için API 20NE test kiti ile yapılan tanımlamada %80 oranında doğruluk oranı elde edilirken, *A. sobria* bakterisinde bu oran %10 olarak gözlemlenmiştir. Bu oran Microgen GN-ID A+B test kitinde ise *A. hydrophila* ve *A. sobria* için sırasıyla %60 ve %80 olarak kaydedilmiştir. ATCC suşları için fenotipik tanımlamada API 20NE test kiti *A. sobria* tanımlamasında yanlış sonuçlanırken, Microgen GN-ID A+B test kiti ise her iki ATCC suş için de doğru sonuçlanmıştır.

2020, 31 sayfa

Anahtar Kelimeler: API 20NE, Bakteri, Biyokimyasal Test, Tanımlama, Microgen ID

ABSTRACT

COMPARING THE USABILITY OF DIFFERENT PHENOTYPIC IDENTIFICATION KITS IN IDENTIFICATION OF *Aeromonas hydrophila* AND *Aeromonas sobria*

Şerafettin BALCI

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Şevki KAYIŞ

In this thesis, it was aimed to identify the *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteria with two different phenotypic identification kits, which were previously defined by molecular methods. For this purpose, API 20NE and Microgen GN-ID A + B Panel kits were used. In this way, both methods were compared. The use of these identification kits used commercially in bacteria has been determined. In this context, 9 *A. hydrophila* and 9 *A. sobria* strains and ATCC strain bacteria belonging to each bacterium were used in this study. After phenotypic identification, an accuracy rate of 80% was achieved in the identification made with the API 20NE test kit for *A. hydrophila* bacteria, while this rate was observed as 10% in *A. sobria* bacteria. This rate was 60% and 80% for *A. hydrophila* and *A. sobria*, respectively, in the Microgen GN-ID A + B test kit. In phenotypic identification for ATCC strains, the API 20NE test kit resulted incorrectly in identification of *A. sobria*, while the Microgen GN-ID A + B test kit was correct for both ATCC strains.

2020, 31 pages

Keywords: API 20NE, Bacteria, Biochemical Test, Identification, Microgen ID

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Motil <i>Aeromonas</i> Bakteriler	2
1.2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	3
1.2.2. <i>Aeromonas sobria</i>	4
1.2. Bakterilerin Tanımlanması	5
1.3.1. Biyokimyasal Yöntemler (Fenotipik Tanımlama).....	5
1.3.2. Moleküler Yöntemler.....	7
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	9
2.1. Materyal.....	9
2.1.1. Kullanılan Bakteriler	9
2.1.2. Kullanılan Fenotipik Tanımlama Testleri	10
2.1.2.1. API 20E Test Kiti.....	10
2.1.2.2. Microgen GN-ID A+B Panel Test Kiti.....	11
2.2. Yöntem.....	14
2.2.1. Bakterilerin Hazırlanması	14
2.2.2. Testlerin Uygulanması ve Tanımlama	14
3. BULGULAR.....	16
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR	23
5. ÖNERİLER.....	26
KAYNAKLAR	27
ÖZGEÇMİŞ	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	API 20 NE test kiti sonuç formu	11
Şekil 2.	API 20 NE test kiti	11
Şekil 3.	Microgen GN-ID A+B panel test kiti	12
Şekil 4.	Microgen GN-ID A+B panel test kiti sonuç rapor formu.....	12
Şekil 5.	Microgen kiti için pozitif ve negatif renkleri gösteren skala	15
Şekil 6.	API 20NE kiti için pozitif ve negatif renkleri gösteren skala	15



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan <i>Aeromonas hydrophila</i> bakterileri ve izole kaynakları .9
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan <i>Aeromonas sobria</i> bakterileri ve izole kaynakları10
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan kitlerin içerdiği testler13
Tablo 4.	<i>Aeromonas sobria</i> olan suşların API 20NE test sonuçları.....16
Tablo 5.	<i>Aeromonas hydrophila</i> suşların API 20NE test sonuçları.....17
Tablo 6.	<i>Aeromonas sobria</i> suşların Microgen ID test sonuçları18
Tablo 7.	<i>Aeromonas hydrophila</i> suşların Microgen ID test sonuçları19
Tablo 8.	Her iki test kitinin sonuçlarının değerlendirilmesi.....20
Tablo 9.	Suşlar ile ATCC referans suşların benzerlik oranları21

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece Santigrat
g	Gram
mg	Miligram
L	Litre
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
PCA	Plate Count Agar
MAS	Motil Aeromonas Septisemi
API	Analytab Production Incorporation
LDC	Lizin Dekarboksilaz
VP	Voges Proskauer

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Sucul sistemler mikroorganizmalar, omurgasızlar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memeliler gibi birçok canlı grubunun bir arada temsil edildiği alanlardır. Tüm bu canlı gruplarının, birlikte yaşam biçimi tercihleri nedeniyle birbirleri ile değişik ilişkileri bulunmaktadır. Konak-konuk ilişkisi, saprofitik döngü, birincil üretim süreci ve beslenme gibi temel ihtiyaçlar karasal sistemlere göre sucul sistemlerde çok daha farklılık arz etmektedir (İrfan ve Alatawi, 2019).

Biyoçeşitliliğin yoğun olduğu sucul alanların önemli bir üyesi de balıklardır. Balıklar sucul sistemlerde gerek avcı gerekse diğer canlılar için av olarak önemli bir yere sahiptir. Bunun yanı sıra balıklar birçok patojen organizma için ise konak olma özelliği taşımaktadır. Özellikle geniş parazitik grupların denizel ve tatlısu ortamında balıklardan rapor edildiği bilinmektedir (Kayış vd., 2009). Bununla birlikte balıklardan izole edilen bakterilerin de çok geniş bir tür çeşitliliği bulunmaktadır. Doğal olarak sucul sistemlerde bulunan balıklardan izole edilen bakteriler olduğu gibi, özellikle kültür şartlarında yetiştirilen balıklardan rapor edilen bakteriler bu çalışmalar içerisinde geniş yer tutmaktadır (Öztürk ve Altınok, 2014).

Su ürünleri yetiştiriciliğinin yaygınlaşması sonucu yoğun yetiştiricilik şartlarında balık hastalıklarına bağlı kayıplar irdelendiğinde bakterilerden kaynaklı hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Bu hastalıklara sebep olan başlıca bakteri gruplarına bakılacak olunursa, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio* sp., *Lactococcus garveae*, *Pseudomonas* sp., *Edwardsiella* sp., *Renibacterium salmoninarum*, *Flavobacterium* sp. ve *Aeromonas* sp. gibi türlerin rapor edildiği görülmektedir. Bu kaynak bakterilerin meydana getirdiği hastalıklar nedeniyle balıklarda renkte kararma, deri ve iç organlarda kanama, gözlerde tek taraflı ya da çift taraflı şişme, iç organlarda sıvı birikimi, yüzme bozuklukları ve iştahsızlık gibi semptomlar ile birlikte yüksek oranda mortaliteler gözlemlenmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014).

Bu bakteriyel balık patojenleri içerisinde çok sayıda tür ile temsil edilen önemli bir grup *Aeromonas* cinsidir. *Aeromonas* cinsine ait balık patojeni bakteriler hareket kabiliyetlerine göre hareketli (motil) ve hareketsiz (non-motil) olmak üzere iki ana grup

ile ifade edilmektedirler. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* balıklarda frunkulosis hastalığının etmeni olarak tanımlanan hareketsiz *Aeromonas* bakterisidir. Hareketli *Aeromonas* bakterileri ise Motil Aeromonas Kompleks olarak ifade edilmekte ve bu grupta balıklarda hastalık meydana getiren birçok bakteri değişik çalışmalarda rapor edilmiştir.

1.2. Motil *Aeromonas* Bakteriler

Fakültatif anaerobik gram negatif rod olarak tanımlanan grupta *Entetobacteriaceae* familyasına dahil olan *Aeromonas* cinsine ait olan bakteriler, Gram negatif ve genellikle tek polar flagella ile hareket kabiliyeti olan ve optimum üreme sıcaklığı olarak 22-28°C aralığını tercih eden bakterilerdir. Oksidaz ve katalaz pozitif özellik gösteren bu bakteri grubu, tüm sucul sistemlerde bulunabilmektedir. Önemli türler olarak *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. media* gibi türler zikredilebilir (Holt vd., 1994). Bu bakteri grubunun sucul sistemler, toprak, değişik canlı grupları, gıdalar ve hatta insanlardan izole edildiği rapor edilmiştir. Bundan 100 yıl öncesinden günümüze kadar *Aeromonas* cinsine ait bakteriler balık ve sürüngenlerin patojeni olarak biliniyorken, 1960'larda *Aeromonas*'ın insanlarda da ishale neden olduğu bildirilmiştir. Günümüzde *Aeromonas*, insan sağlığı ve balıkçılık endüstrisinde önemli bir konu olarak kabul edilmektedir. Bu gruba ait olan bakterilerin balıklarda meydana getirdiği hastalığa Motil Aeromonas Septisemi (MAS) denilmektedir.

MAS epizootiyolojisi karmaşık bir yapıya sahiptir. Hareketli *Aeromonas* bakterilerinin çevresel dağılımları çok geniştir. Balıklarda meydana gelen akut *Aeromonas* vakalarında hemorajik septisemi, kronik vakalarda apse ve büyük ülserlere rastlamak mümkündür. Şiddetli MAS salgınlarında ise genellikle hastalığın ilerlemesinde farklılaşmayı gösteren bir dizi lezyon gözlemlenmektedir. Tipik septisemili balıklarda görülen dış belirtiler arasında yüzgeçlerde kızarıklık, iltihap, anüs ve ciltte yaygın kanamalar, gözler ve karın şişmesi (ascites)'dir. Balıklarda iç belirtiler ise bağırsaklarda, yağ dokusunda kanamalar ve dalak ve böbrek gibi dokularda şişmelerdir (Austin ve Austin, 2010).

1.2.1. *Aeromonas hydrophila*

Motil *Aeromonas* grubu bakteriler içerisinde özellikle balıklardan sıklıkla rapor edilen tür *A. hydrophila*'dır. *A. hydrophila* düşük tuzluluk değerinde olan sularda, flagella vesilesiyle aktif harekete sahip, Gram negatif, rod şeklinde, sitokrom oksidaz pozitif özelliği olan bir bakteridir. Sadece balıklardan değil, süt ve süt ürünleri gibi maddeler, su ve toprak gibi ortamlardan da izole edilmiştir (Enany vd., 2013). Su ürünleri yetiştiriciliği yapılan işletmelerde farklı balık türlerinde hastalık oluşturduğu ve mortaliteye neden olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir. *A. hydrophila* ilk olarak yılan balıklarından (*Anguilla anguilla*), daha sonraları sazan balıklarından (*Cyprinus carpio*) izole edilmiştir (Austin ve Austin 2010). Daha sonraları yetiştiricilik faaliyetlerinin yaygınlaşması sonucunda özellikle gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Kayış vd., 2009) ülkemizde bu bakterinin en çok rapor edildiği tür olmuştur. Bununla birlikte levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) istavrit gibi balıklarda rapor edilen türler içerisinde yer alırlar. (Türk, 2002) Ülkemizde yetiştiriciliği yaygın olmayan mersin balıkları türlerinde de (*Acipenser baeri*), (*Acipenser gueldenstaedtii*) bu bakterinin varlığı ve patojenik etkileri ortaya konulmuştur. (Boran vd., 2013) (Kayış vd., 2017) (Timur vd., 2010)

Doğal yaşam alanlarından örneklenen sazan türlerinde yapılan bakteriyolojik çalışmalarda *A. hydrophila* birçok sazan türünden rapor edilmiştir. Artvin ili Deriner Baraj Gölünde yaşayan *Squalius orientalis*, *Capoeta banarescui* ve *Capoeta ekmekeciae* türleri bu kayıtlara örnek olarak verilebilir (Kayış vd., 2018).

Balıklarda yüzgeç gibi dokularda nekrozlar, mantar enfestasyonlarına eşlik eden ülserler, gözde şişme hastalığının dış semptomları arasında yer almaktadır. Dalakta büyüme ve renk kaybı, karında sıvı birikimi ve böbrekte nekrozlar ve büyüme iç semptomlar olarak rapor edilmiştir (Lasee, 1995). Bu bakteri ayrıca alabalık kuluçka sistemlerinde mavi kese sendromu olarak ifade edilen alevin bireylerde gözlemlenen hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan saha örneklemeleri ve deneysel çalışmalar *A. hydrophila*'nın mavi kese hastalığına sebep olduğunu ortaya koymuştur (Kayış vd., 2017).

A. hydrophila ile ilgili yapılan çalışmaların önemli bir kısmını da bakterinin antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesine yöneliktir. Zira sucul

sistemlerden yaygın olarak izole edilen ve balıklarda hastalık oluşturabilen bu bakterinin antibiyotiklere karşı dirençlilik profili ve direnç genlerinin varlığı önem arz etmektedir (Çapkin vd., 2015). Bu bağlamda ülkemizde bu konu ile ilgili, alabalık kökenli *Aeromonas hydrophila* suşlarının antibiyotik direnç profilleri ile ilgili çalışmada enroflaksasin antibiyotiği kullanılan tüm izolatlarda duyarlı olarak belirlenmiştir. Oksitetrasiklin ise %90,5 lik oranla en fazla direnç gösterilen antibiyotik olarak rapor edilmiştir (Durmaz ve Türk, 2009). Yine direnç genleri dikkate alınarak yapılan çalışmada mersin balığı türlerinden izole edilen *Aeromonas hydrophila* suşlarının 4 farklı antibiyotiğe karşı direnç geni taşıdığı bildirilmiştir (Terzi, 2018).

1.2.2. *Aeromonas sobria*

Aeromonas türlerinin tanımlanmasında bazı zorluk ve karışıklıklar olduğu bilinen bir gerçekliktir. Buna karşın cins içerisinde balık patojeni olarak tanımlanan türler bazı baskın türler olarak ortaya konulmaktadır. Ancak çevresel izolatlar (su ve toprak gibi) ile patojenik izolatların benzerlikleri ve birbirinden ayırt edilmesi oldukça zor ve karmaşık olarak ifade edilmektedir (Kirov vd., 2002). *Aeromonas sobria* bu tanım içerisinde irdelenmesi gereken bir tür olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok çalışmada *Aeromonas sobria* olarak tanımlanan tür daha sonraları *Aeromonas veronii* bakterisinin biovarı olarak ifade edilmiştir (*Aeromonas veronii* biovar *sobria*). Ancak son yıllarda yapılan genom analiz çalışmaları sonrasında bakteri yine *A. sobria* olarak tanımlanmıştır (Yang vd., 2017).

Aeromonas sobria genel olarak insan patojeni olarak da rapor edilen ve bazı kaynaklarda *Aeromonas hydrophila*'ya göre çok daha patojenik olduğu bildirilen bir türdür (Janda vd., 1984). Bununla birlikte *A. sobria* Dünya genelinde Avrupa, Asya, Amerika gibi birçok farklı coğrafyada farklı balık türlerinden balık patojeni olarak rapor edilmiştir (Rahman vd., 2002; Wahli vd., 2005). Bakterinin ülkemiz sucul sistemlerinde yer alan balıklarda ise öncelikli izole edildiği tür gökkuşağı alabalığı olsa da, Atlantik somonu (*Salmo salar*) levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) gibi diğer türlerden de izole edildiği bildirilmiştir (Karataş, 1996; Avsever vd., 2002). Bu türler dışında yine yetiştiriciliği yapılan kaynak alabalığında (*Salvelinus*

fontinalis) deri lezyonları ile seyreden enfeksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir (Kayış ve Er, 2014).

1.2. Bakterilerin Tanımlanması

Bakterilerin tür bazında tanımlanması-sınıflandırılması amacıyla çeşitli yöntemler ve kriterler ortaya konulmuştur. Öncelikle bakterilerin hücre duvarı yapısı (Gram boyama) ve hücre şekilleri (kok, basil, spiral) sınıflandırma ilk önem arz eden kriterler olmuştur. Bunun yanı sıra bakterilerin sınıflandırılmasında flagella, kapsül, spor, pillus ve plazmid gibi ihtiva ettikleri bazı yapılar da kullanılmaktadır. Tüm bu tanımlama kriterlerini takip eden bakterilerin çevresel tercihleri de tanımlamada önemli adımları oluşturmaktadır. Örneğin bakterilerin sıcaklık, oksijen, tuzluluk ve pH gibi tercihleri bakterilerin tanımlanmasında çok önemli detaylara ulaşmada yardımcı olmaktadır. Bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan tüm bu kriterleri, günümüzde ileri tanımlama teknikleri ile kombine olarak etkin bir şekilde geçerliliğini korumaktadır. Bu ileri teknikler histolojik, serolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak ana başlıklar halinde zikredebiliriz.

Günümüzde farklı mikroorganizmaların (viral, bakteriyel, fungal, parazit) tanısı amacıyla serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile bakterilerin sınıflandırılmasında kalitatif ve kantitatif yöntemler olmak üzere başlıca iki şekilde yapılmaktadır. Kalitatif yöntemler; presipitasyon, flokülasyon, aglütinasyon ve komplemanfiksasyon testleridir. Kantitatif yöntemler ise; türbidimetriknefelometrik ölçümler ve işaretlenmiş immünokimyasal ölçümlerdir (Önalın vd., 2016).

1.3.1. Biyokimyasal Yöntemler (Fenotipik Tanımlama)

Biyokimyasal testler hızlı uygulanabilir olması, maliyeti düşük ve kısa zamanda sonuçlanması gibi avantajlara sahip tanımlama testleridir. Bazı özel patojenlerde tür tespiti sadece biyokimyasal testlere göre dahi yapılabilmektedir. Bakteriler biyokimyasal aktivite yönünden birbirlerinden oldukça farklılıklar gösterirler. Aynı cinse ait türler ya da aynı türün farklı bireyleri arasında dahi farklılıklar bulunabilmektedir. Bazı durumlarda ise, aynı tür bile her zaman benzer karakter de olmayabilir.

Biyokimyasal test yöntemleri bakterilerin saf ve taze kültürleri üzerinde uygulandığında doğru sonuçlar veren ve bazı standartlar çerçevesinde uygulandığında tanımlamada referans olarak kullanılabilen testlerdir. Bu testler içerisinde indol, jelatin, eskulin, üre, şeker testleri, metil kırmızısı ve voges-proskauer gibi testler sıklıkla kullanılan bazı testlerdir.

Bakterilerin farklı karbon kaynaklarını (şekerler, aminoasitler, alkoller vb.) enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Tanımlama esası bu noktadan hareketle kurgulanmıştır. Bu amaçla birçok biyokimyasal testi bir arada bulunduran test kitleri pratik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Analytical Profile Index/Analytab Production Incorporation (API), Microgen ID test kitleri gibi ürünler bu sistemlere örnek olarak gösterilebilir (Amandi vd., 1982).

Genellikle insan patojenlerine yönelik olarak tasarlanırsa da bu test kitleri ile balık patojeni olan birçok mikroorganizma tanımlanabilmektedir. Özellikle API test kitleri kullanılarak tanımlanan balık patojenleri ile ilgili yayınlar çok yaygındır. Bu bağlamda bakıldığında API panel testlerinin balık patojeni bakterilerin tanımlanmasında başarı oranı ile ilgili bir çalışmalar da mevcuttur. Bahsi geçen bu çalışmada bazı bakterilerin özellikle ürün sisteminde yer almaması nedeniyle yanlış tanımlanabildiği bildirilmiştir. Ayrıca, balık patojeni bakterilerin inkübasyon sıcaklık değerleri ile panel sistemlerinin optimum sıcaklık değerinin farklı olması, tuzlu su kökenli patojenlerin tanımlamasına yönelik eksiklikler gibi sorunlar bu kitlerin kullanımının klasik testler ile doğrulanması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Popovic vd., 2004). Hareketli *Aeromonas* kompleksi, *A. salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Pasteurella piscicida* ve *Yersinia ruckeri* türlerini içeren 223 farklı izolat API-20E sistemi ile tanımlanmış ve sonuçlar klasik biyokimyasal testleri ile kıyaslanan bir çalışmada, tür bazında farklı şekerlerin, lizin dekarboksilaz (LDC), Voges Proskauer (VP), sitrat ve jelatinaz reaksiyonlarının fermentasyonu için yanlış negatif ve pozitif reaksiyonların API 20E test kitlerinde varlığı belirlenmiştir (Santos vd., 1999).

Yukarıda bahsedilen bazı eksik kalan yönlerine rağmen balık patojenlerinin hızlı test kitleri ile tanımlanması oldukça yaygındır. Örneğin Doğu Karadeniz Bölgesinde kültürü yapılan gökkuşağı alabalığında *Yersinia ruckeri* etmeninin API 20E test kiti kullanılarak tanımlaması yapılmıştır (Balta vd., 2005). Yine *Vibrio anguillarum* ve *V. ordalii* (Grisez vd., 1999) API 20E kiti ile tanımlaması yapılmıştır. Buna benzer

alışmalar yanında farklı ticari tanımlama kitlerinin kıyaslanması şeklinde olan çalışmalar da mevcuttur. API 20E ve BBL Crystal E/NF farklı test kitlerinin levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarının i organlarından izole edilen bakterilerin tanımlanmasında kullanıldığı ve farklı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. API 20E test kiti bir suşu %37 doğruluk derecesi ile *Pseudomonas* spp. olarak tanımlarken, aynı bakteriyi BBL Crystal E/NF kiti %99 doğruluk derecesi ile *Flovabacterium odoratum* olarak tanımladığı bildirilmektedir (Popovic vd., 2004).

Yukarıda test kitlerinin tanımlama için olduğa iyi sonuçlar verdiğini, ancak bazı yanlış tanımlamaların olabileceği ile örnekler ise, bu alanda daha fazla çalışma yapılmasının ve kitlerin kullanılabilirliğine katkı sağlanması gerektiğini göstermektedir.

1.3.2. Moleküler Yöntemler

Canlıların moleküler tanımlaması son yıllarda tüm dünyada olduğa yaygınlaşmış hatta geçerli olan önemli bir yöntem olarak kabul görmeye başlanmıştır. Özellikle moleküler tanı teknikleri, geleneksel tanı tekniklerinden, patojenlerden daha hızlı ve daha hassastır. Hastalık belirtisi göstermeyen balıklardan da tespit edilebilir olması nedeniyle hastalıkları önlemeye yardımcı olma özelliği gösterdiği ifade edilmektedir. Böylece antibiyotik ile tedavi engellenebileceği ve direnç oluşumuna sebebiyet verilmeyeceği bildirilmiştir (Altınok ve Kurt, 2003).

Bu yöntemde öncelikle bakterilerin DNA'sı uygun yöntemler ile elde edilmektedir. Bunun için bakterinin canlı olması ya da izole edilmiş olması gerekmemektedir. Balıkların farklı dokularından da izole edilmeden bakterilerin DNA'sı elde edilebilmektedir (Altınok vd., 2008). Bu özellik moleküler yöntemlerin önemli avantajlarından birisidir.

Moleküler tanı yöntemleri içerisinde en yaygın olanı şüphesiz polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). Bu yöntemde bakteriye özgü ya da üniversal diye tanımlanan kısa DNA parçacıkları (primer) kullanılmaktadır. Özel bir jel içerisinde elektrik yükü ile yürütölen DNA paralıklarının uzunluklarına göre ya da baz dizilim analizlerine göre bakteriler tanımlanmaktadır. Bu metot ile birden fazla bakterinin aynı anda tanımlanmasına yönelik oklu PCR (Multiplex PCR) yöntemi de geliştirilmiştir. Bu

temel tanımlama yöntemi dışında Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) gibi değişik yöntemler de kullanılmaktadır (Altınok vd., 2008).

Moleküler yöntem ile geleneksel fenotipik tanımlama yöntemlerinin kıyaslandığı balık patojeni bakteriler üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinden izole edilen bakteriler hem biyokimyasal hem de moleküler yöntemler ile tanımlanmıştır (Kayış, 2009). Bu çalışmada *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnare* ve *Renibacterium salmoninarum* bakterileri her iki yöntem ile tanımlamaya çalışılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada moleküler yöntemler ile *Aeromonas salmonicida* 28 farklı örnekten izole edilirken biyokimyasal yöntem ile 4 örnekten izole edilebilmiştir. Bu bağlamda değerlendirildiğinde *Aeromonas hydrophila* 43 ve 11, *Yersinia ruckeri* 55 ve 20 sırasıyla moleküler ve fenotipik yöntem ile ifade edilmiştir. Bahsi geçen çalışmada *Flavobacterium columnare* 8 örnekte moleküler olarak tanımlanırken fenotipik yöntemde hiç izole edilememiştir (Kayış, 2009).

Son yıllarda balık patojeni bakterilerin tanımlanmasında mümkün olan tüm tanımlama yöntemlerinin bir arada sunulması ve doğrulama yapılması istenmektedir. Bu nedenle araştırmacılar çalışmalarında moleküler ve fenotipik tanımlama yöntemlerini bir arada sunmaktadır. Bu bağlamda sunulan bu tez çalışmasında, moleküler yöntemler ile daha önce tanımlanan *Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria* bakterilerinin farklı tanımlama kitleri olan API 20NE ve Microgen GN-ID A+B Panel kiti ile tanımlamasının yapılması amaçlanmıştır. Bu sayede her iki yöntemin kıyaslaması yapılmış ve ticari olarak kullanımda olan iki farklı tanımlama kitinin bahsi geçen balık patojeni bakterilerde kullanımı belirlenmiştir. Kitlerin kendi aralarında kıyaslaması da yapılmış ve tanımlamada doğruluk dereceleri belirlenmiştir.

YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Bakteriler

Çalışmada örnek olarak kullanılan bakteriler Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı'nda stoklananmış daha önce farklı balıklardan, su ürünleri işletmelerinin su giriş sistemlerinden izole edilen ve moleküler yöntemler ile tanımlanan *Aeromonas hydrophila* ve *Aeromonas sobria* bakterileridir. Bu bakterilere ait bilgiler Tablo 1 ve Tablo 2'de verilmiştir. Bu bakteriler dışında testlerde kullanılmak üzere aynı bakterilere ait American Type Culture Collection (ATCC) suşu bakteriler de çalışmada doğrulama amaçlı olarak kullanılmıştır. Kullanılan ATCC suşları ATCC7966 (*Aeromonas hydrophila*), ve ATCC43979 (*Aeromonas sobria*) dır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan *Aeromonas hydrophila* bakterileri ve izole edildikleri balık/su örnekleri

Kod	Konak/Örnek	Doku	Bölge	Kabul No
K31	<i>Alburnus derjugini</i>	Böbrek	Gümüşhane	MK548537
D7	<i>Capoeta banarescui</i>	Dalak	Artvin	MT730008
D13	<i>Capoeta ekmeckiae</i>	Dalak	Artvin	MT730009
D17	<i>Squalius orientalis</i>	Dalak	Artvin	MT730010
D22	<i>Squalius orientalis</i>	Dalak	Artvin	MT730011
Y1	<i>Salmo</i> sp.	Yumurta	Rize	MT730013
Y21	Kuluçkahane	Su	Rize	MT730014
Y28	Kuluçkahane	Su	Rize	MT730015
Y33	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Böbrek	Rize	MT730016

Aeromonas hydrophila bakterilerinin izole edildiği örnekler içerisinde 6 farklı balık türü ve su numunesi bulunmaktadır. Bunun dışında Gümüşhane, Artvin ve Rize olmak üzere 3 farklı ilden örneklemeler yapılmıştır.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan *Aeromonas sobria* bakterileri ve izole edildikleri balık/su örnekleri

Kod	Konak/Örnek	Doku	Bölge	Kabul No
KY1	<i>Salmo</i> sp.	Dalak	Gümüşhane	MK548497
K18	<i>Alburnus derjugini</i>	Karaciğer	Gümüşhane	MK548526
Y3	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Yumurta	Rize	MT730021
Y4	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Yumurta	Rize	MT730019
Y8	<i>Salmo</i> sp.	Yumurta	Rize	MT730020
Y18	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Böbrek	Rize	MT730017
Y19	<i>Salmo</i> sp.	Böbrek	Rize	MT730018
Y25	Kuluçkahane	Su	Rize	MT730022
109	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	Böbrek	Gürcistan	MT730012

Aeromonas sobria bakterilerinin izole edildiği örnekler içerisinde ise 4 farklı balık türü ve su numunesi bulunmaktadır. Bunun dışında Gümüşhane ve Rize olmak üzere 2 farklı ilden ve Gürcistan olmak üzere farklı bir ülkeden de örnek kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Fenotipik Tanımlama Testleri

2.1.2.1. API 20E Test Kiti

Bu kitlerden ilki, Biomerieux firmasına ait olan API 20NE test kitidir. Biomerieux firmasının ilk kurucusu olan Marcel Mérieux, Louis Pasteur den biyoloji eğitimi almış bir bilim insanıdır. Lyon'da (Fransa) 1897'de Institut Mérieux isminde bir analiz laboratuvarı kurmuştur ve ilk antitetanus serumunu geliştirmiştir. Şirket bünyesinde ilk in vitro diagnostik test için reaktiflerin üretimine yol açan bir teknik geliştirmiş. Daha sonraları 1963'te Institut Mérieux ve Becton-Dickinson arasındaki 50/50 ortaklığı olan B-D Mérieux'un yönetimini devralmış ve analiz laboratuvarları için geniş bir ürün yelpazesi sunmuştur. Son olarak 1974'te şirket ismi bioMérieux olmuştur. Son 45 yıl içinde, bioMérieux in vitro teşhis alanında ciddi gelişmelere sahip olmuştur. Özellikle bakteri, virüs ve maya gibi organizmaların tanımlanmasına yönelik geniş ürün yelpazesine sahiptir.

Bu çalışmada kullanılan API 20NE test kiti (Analytical Profile Index) Gram negatif, non-Enterobacteriaceae grubuna ait bakterilerin tanımlanmasında kullanılan test kitidir. Kit içerisinde 20 ayrı test bulunmaktadır (Şekil 1).

API® 20 NE

CE 07224 B

REF: _____

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

24 h 48 h

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

NO₃ TRP GLU ADH URE ESC GEL PNG IGLU IARA IMNE IMAN INAG IMAL IGNT ICAP IADI IMLT ICIT IPAC OX

24 h 48 h

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / dra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση

Şekil 1. API 20 NE test kiti sonuç formu



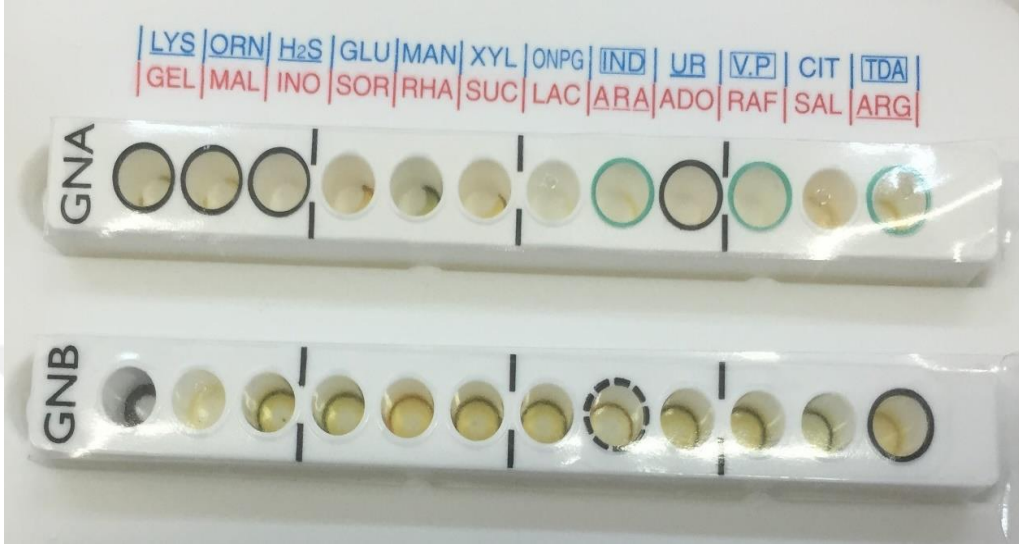
Şekil 2. API 20 NE test kiti

Bu test kitinde stokrom oksidaz pozitif bakterilerin tanımlaması yapılmaktadır. Kit içerisinde sitrat, eskulin, üre, jelatin, gibi testlerin yanı sıra, glikoz, arabinoz, mannitol, maltoz gibi şeker testleri de bulunmaktadır. Bu test kiti çalışma için Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'nin desteklediği FYL-2019-1023 kodlu proje imkânları ile temin edilmiş ve her bir test kiti için 29.11.2019 tarihi itibarıyla 80 TL maliyet belirlenmiştir.

2.1.2.2. Microgen GN-ID A+B Panel Test Kiti

Microgen Bioproducts, Biomerieux firmasına göre çok yeni olan, 1994 yılında kurulmuş bir firmadır. Ürün yelpazesi, mikrobiyoloji, seroloji, hematoloji, bakteriyoloji ve viroloji alanlarında kapsamaktadır. İngiltere merkezli olan firma,

100'den fazla özel distribütör ağıyla 80'den fazla ülkeye ihracat yapan önemli bir uluslararası işletmedir. Microgen GN-ID A+B Panel Test Kiti, 12 subsrattan oluşan Microgen GN-A ve 12 subsrattan oluşmuş 24 testlik bir test kitidir (Şekil 2).



Şekil 3. Microgen GN-ID A+B panel test kiti

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM **MICROGEN BIOPRODUCTS**

Lab. No. _____ Specimen Type: _____ Date: _____

				GN A wells												GN B wells											
Well Number				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	VP	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result																											
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions																											

Octal Code: _____ Final Identification: _____

WF6125/2017, Rev. 02

Şekil 4. Microgen GN-ID A+B panel test kiti sonuç rapor formu

Bu kitte de API 20 NE den farklı olarak H₂S üretimini gösteren test iki kit arasındaki önemli bir farktır. Her iki test kitinin içerdiği testler ve farklılıklar Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kitlerin içerdiği testler.

Test API 20 NE		Microgen GN-ID A+B	
NO ₃	Nitrat	Lisin	
TRP	L-triptofan	Ornitin	
GLU	D-Glikoz (fermentasyon)	H ₂ S	
ADH	L-Arjinin	Glikoz	
URE	Üre	Mannitol	
ESC	Eskülin	Ksiloz	
GEL	Jelatin	ONPG (o-nitrophenyl - beta-D-galactoside)	GN-A
PNG	4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside	İndol	
GLU	D-Glikoz	Üre	
ARA	L-Arabinoz	V.P	
MNE	D-Mannoz	Sitrat	
MAN	D-Mannitol	TDA (triptofan)	
NAC	N-Asetil glikosamin	Jelatin	
MAL	D-Maltoz	Malonat	
GNT	Potasyum glukonat	İnositol	
CAP	Kaprik asit	Sorbitol	
AD	Adpik asit	Ramnoz	
MLT	Malik asit	Sukroz	
CIT	Trisodyum sitrat	Laktoz	GN-B
PAC	Fenil asesik asit	Arabinoz	
		Adanitol	
		Rafinoz	
		Salisin	
		Arjinin	

Microgen kitinde nitrat testi diğer testlerin sonucuna göre ayrıca belirlenebilmektedir. Bu test kiti çalışma için Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'nin desteklediği FYL-2019-1023 kodlu proje imkânları

ile temin edilmiş ve her bir test kiti için (Microgen ID A+B) 17.12.2019 tarihi itibarıyla 60 TL maliyet belirlenmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Bakterilerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan tüm bakteriler, -80°C ‘ den çıkarılmış ve Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458) besiyerine aseptik olarak inoküle edilmişlerdir. Etüvde 22 ±2°C’ ta, 24 saat inkübe edilmişler ve saf olarak elde edilmişlerdir.

2.2.2. Testlerin Uygulanması ve Tanımlama

Saf olarak besiyerinde elde edilen bakteriler test kitlerinin yönergesinde belirtilen şekilde kitlere inoküle edilmiştir. API 20NE kitleri 29±2°C’ de 24-48 saat, Microgen kitleri ise 35-37°C’ de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bahsi geçen sürelerin sonunda her iki kit için belirlenmiş değişik reaktif maddeler testlere ilave edilmiş ve yönergede bahsedilen renk değişimlerine göre bakterilere ait kodlar oluşmuştur. Testlere eklenen madde ve reaktifler, Microgen için; mineral yağ, Kovac’s reaktifi, VPI-VPII, Nitrat A ve Nitrat B, TDA reaktifi, API 20 NE için Mineral yağ, Nit1 ve Nit2, Zn ve James solüsyonudur.

Uygulanan reaktifler sonucunda renk değişimlerine göre elde edilen kodlar (Şekil 5), (Şekil 6) lisanslı olan ApiWeb ve Microgen ID software sistemlerine yüklenerek bakterilerin tanımlaması yapılmıştır.

Microgen™ GN A ID													
WELL/NAFFCHEN /CODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
1. Negative													
2. Positive													

Microgen™ GN B ID													
WELL/NAFFCHEN /CODET	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
1. Negative													
2. Positive													

Şekil 5. Microgen kiti için negatif ve pozitif renkleri gösteren skala (URL-1).



Şekil 6. API 20NE kiti için pozitif ve negatif renkleri gösteren skala. Üst kısım negatif, alt kısım pozitif sonuçlardır (URL-2).

3. BULGULAR

Çalışmada *Aeromonas sobria* olarak daha önce moleküler tanımlama yapılmış suşlar üzerinde yapılan API 20NE test sonuçları irdelendiğinde bütün bakteriler üzerinde denenen 20 testin 14'ü ATCC suş ile aynı sonucu vermiştir. Buna karşın 6 test (GLU, ADH, ESC, ARA, CAP, CIT) ise tüm bakteriler için ATCC suştan farklı olarak belirlenmiştir (Tablo 4). Ancak sonuçta elde edilen kodların Apiweb doğrulamasında ATCC suş dahil 10 bakteriden sadece Y8 kodlu bakteri *A. sobria* olarak belirlenebilmiş, ATCC suş bakteri dahil 8 bakteri *Aeromonas hydrophila* olarak belirlenmiştir (Tablo 8). Bu kapsamda Y3 suşu *Burkholderia capeciae*, K18 suşu ise *Vibrio alginolyticus* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 4. Moleküler olarak *Aeromonas sobria* olarak tanımlanmış olan suşların API 20NE test sonuçları

	KY1	Y18	Y19	Y4	Y8	Y3	Y25	K18	109	ATCC
NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GLU	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
ADH	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
GNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ADI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
PAC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Çalışmada *Aeromonas hydrophila* olarak daha önce moleküler tanımlama yapılmış suşlar üzerinde yapılan API 20NE test sonuçları irdelendiğinde ise 20 testin 17'si tüm bakterilerde ATCC suş ile aynı karakterde, 3 test ise (GLU, MAN, CIT) farklı özellik göstermiştir (Tablo 5). Ancak kodların Apiweb doğrulamasında ATCC suş dâhil 10 bakteriden 8'i *A. hydrophila* olarak doğrulanmış, sadece 2 suş tanımlanamamıştır (Tablo 8). API 20NE testlerinde bakterilerin tanımlanmasında yer alan testler içerisinde sitrat (CIT) testi her iki bakteri grubunda da farklılığın olduğu ortak test olmuştur.

Tablo 5. Moleküler olarak *Aeromonas hydrophila* olarak tanımlanan suşların API 20NE test sonuçları.

Test	K31	D7	D13	D17	D22	Y1	Y28	Y33	Y21	ATCC
NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRP	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PNG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GNT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
PAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Microgen ID test kitinde ise toplam 24 test içerisinde tüm bakterilerde 18 test ATCC *Aeromonas sobria* ile farklılık arz etmiştir (Tablo 6). Referans suş olan ATCC(43979) ile aynı özellik gösteren suş sayısı 2 (KY1, Y18) olmuştur.

Tablo 6. Moleküler olarak *Aeromonas sobria* olarak tanımlanmış suşların Microgen ID test sonuçları.

Test	KY1	Y18	Y19	Y4	Y8	Y3	Y25	K18	109	ATCC
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MOT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LYS	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
ORN	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
XYL	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
IND	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
URE	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
VP	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
MAL	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
RHAM	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SUC	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAL	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
ARG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Buna karşın doğruluk yüzdeleri farklılık arz etse de ATCC suş dâhil olmak üzere, 10 suşun 8'i *A. sobria* olarak tanımlanmıştır. *Aeromonas hydrophila* suşlarının Microgen ID test kitinde verdiği sonuçlara bakıldığında ise 12 test bütün suşlarda referans ATCC suşu ile aynı özelliği gösterirken (Tablo 7), hiçbir suş aynı doğrulama koduna sahip olmamıştır. Ancak, 9 farklı bakteriden 5'i *Aeromonas hydrophila* olarak tanımlanabilmiştir (Tablo 8).



Tablo 7. Moleküler olarak *Aeromonas hydrophila* olarak tanımlanmış suşların Microgen ID test sonuçları.

Test	K31	D7	D13	D17	D22	Y1	Y28	Y33	Y21	ATCC
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MOT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIT	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LYS	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
ORN	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
XYL	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TDA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
GEL	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
MAL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
RHAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUC	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAL	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
ARG	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 8. Her iki test kitinin sonuçlarının değerlendirilmesi.

Moleküler tanımlamada <i>Aeromonas hydrophila</i> olarak isimlendirilmiş bakteriler						
Suş	API 20NE Kod	(%)	Bakteri	Microgen ID Kod	(%)	Bakteri
K31	7576455	91,2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	746622001	99,5	<i>Aeromonas sobria</i>
D7	7577755	99,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	644424000	95,9	<i>Burkholderia cepacia</i>
D13	5573754	99,8	<i>Aeromonas hydrophila</i>	706424123	99,7	<i>Vibrio fluvialis</i>
D17	7577754	99,9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	777664123	98,2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
D22	3577755	98,2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	744660523	96,8	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Y1	7544454	-	Tanımlanamadı	706424001	82,6	<i>Aeromonas sobria</i>
Y28	7577754	99,9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	717624003	99,9	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Y21	7577755	99,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	707624023	98,2	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Y33	7544455	-	Tanımlanamadı	716624023	99,7	<i>Aeromonas hydrophila</i>
ATCC	7577755	99,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	754660101	98,7	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Moleküler tanımlamada <i>Aeromonas sobria</i> olarak isimlendirilmiş bakteriler						
Suş	API 20NE Kod	(%)	Bakteri	Microgen ID Kod	(%)	Bakteri
KY1	7577755	99,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	746660101	98,68	<i>Aeromonas sobria</i>
Y18	7576751	91,2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	746620101	97,73	<i>Aeromonas sobria</i>
Y19	7577755	99,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	746660101	98,68	<i>Aeromonas sobria</i>
Y4	7577755	99,3	<i>Aeromonas hydrophila</i>	764660103	87,86	<i>Aeromonas sobria</i>
Y8	7176755	99,2	<i>Aeromonas sobria</i>	746660101	98,68	<i>Aeromonas sobria</i>
Y3	3076557	90,0	<i>Burkholderia capeciae</i>	704124021	62,32	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Y25	7576755	83,9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	767662723	98,56	<i>Aeromonas hydrophila</i>
K18	1072744	62,4	<i>Vibrio alginolyticus</i>	766461001	56,36	<i>Aeromonas sobria</i>
109	3577755	98,2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	746624001	97,07	<i>Aeromonas sobria</i>
ATCC	7576755	83,9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	746660101	98,68	<i>Aeromonas sobria</i>

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre *Aeromonas hydrophila* (ATCC7966) referans suşu ile D17, D22, Y21 ve Y28 suşları her üç tanımlama yönteminde (moleküler, API 20NE ve Microgen ID A+B) *Aeromonas hydrophila* olarak tanımlanmıştır. Yine sadece Y8 suşu her 3 yöntemde de *Aeromonas sobria*

olarak tespit edilebilmiştir. Dikkat çeken bir diğer konu ise ATCC43979 (*Aeromonas sobria*) referans suşunun API 20NE testinde *Aeromonas hydrophila* olarak hatalı tanımlanmış olmasıdır. Her iki fenotipik test kitinde *Aeromonas* cinsi olarak tanımlanamayan tek suş ise Y3 suşu olmuştur.

Tablo 9. Suşlar ile ATCC referans suşların benzerlik oranları

MICROGEN ID A+B					API 20NE				
<i>Aeromonas sobria</i>		<i>Aeromonas hydrophila</i>			<i>Aeromonas sobria</i>		<i>Aeromonas hydrophila</i>		
Test	ATCC	Suşlar (9)	ATCC	Suşlar (9)	Test	ATCC	Suşlar (9)	ATCC	Suşlar (9)
OX	+	9	+	9	NO3	+	9	+	9
MOT	+	9	+	9	TRP	+	8	+	8
NIT	+	9	+	8	GLU	+	6	+	8
LYS	+	8	+	4	ADH	+	7	+	9
ORN	-	6	-	8	URE	-	9	-	9
H ₂ S	-	9	+	3	ESC	+	7	+	9
GLU	+	9	+	9	GEL	+	9	+	9
MAN	+	7	-	7	PNG	+	9	+	9
XYL	-	7	-	6	GLU	+	9	+	9
ONPG	+	8	+	8	ARA	-	4	+	9
IND	+	6	+	5	MNE	+	9	+	8
URE	-	8	-	9	MAN	+	9	+	9
VP	+	5	+	2	NAG	+	9	+	8
CIT	+	8	+	9	MAL	+	8	+	9
TDA	-	9	-	8	GNT	+	9	+	9
GEL	-	6	-	2	CAP	+	8	+	9
MAL	-	8	-	7	ADI	-	9	-	9
INO	-	7	-	9	MLT	+	9	+	9
SOR	-	8	-	7	CIT	+	7	+	5
RHAM	-	8	-	9	PAC	-	8	-	9
SUC	+	5	+	3	OX	+	9	+	9
LAC	-	9	-	9					
ARA	-	6	-	4					
ADO	-	9	-	9					
RAF	-	8	-	9					
SAL	-	5	-	3					
ARG	+	8	+	7					

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Günümüzde biyokimyasal tanı yöntemleri bakterilerin tanımlanmasında oldukça yaygın kullanımı olan ticari ürünlerdir. Bu kitlerin balık patojeni olan bakterileri tanımlamada kullanılabilirliği ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda bazı bakterilerin inkübasyon sıcaklık değerleri, sucul sistem farklılıkları gibi sebepler ile hatalı tanımlanabildiği bildirilmektedir (Popovic vd., 2004). Örneğin, yaygın ve bilinen balık patojeni olan *Yersinia ruckeri* bakterileri ile yapılan bir çalışmada API 20E test kitinin tanımlamada kullanılabilirliği araştırılmış, referans suş ile kullanılan 9 farklı izolat arasında sadece arjinin dehidrolaz testinin farklı sonuç verdiği belirlenmiştir. Bunun dışında diğer tüm testlerin referans suş ile aynı özellikte olduğu rapor edilmiştir (Balta vd., 2005). Farklı balık patojeni bakterilerin API kitleri ile tanımlaması yaygın olmakla birlikte, API 20NE test kiti ile balık patojeni *Aeromonas* türlerinin tanımlamasına odaklı yapılan bir çalışmada bu testin doğru tanımlamada tek başına yeterli olmadığı ifade edilmiştir. Ancak farklı test kitleri (Aerokey II) ile desteklenmesi sonucunda daha doğru tanımlama yapılabileceği belirtilmiştir. Yanlış tanımlamanın nedenleri arasında bu test kitlerinin tanımlama yazılımlarında *Aeromonas* türlerine ait bazı türlerin yer almaması gösterilmiştir (Awan vd., 2005). API 20NE özelinde irdelendiğinde aynı çalışmada *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. scuberti*, *A. caviae*, bakterilerini içeren 55 bakterinin tanımlaması yapılmıştır. Bütün suşlarda nitrat, jelatin, mannitol, p-Nitropyhenyl-βD galactopyranoside (PNG), glukoz, N-Asetil glikosamin (NAG), maltoz, kaprik asit (CAP) gibi testlerin pozitif, üre, adpik asit (ADI) ve fenil asetik asit (PAC) testlerinin ise negatif sonuç verdiği rapor edilmiştir. Bahsi geçen çalışmada referans suş kullanılmamış ve bir doğrulama yapılmamıştır (Hassan vd., 2017). Sunulan bu tez çalışmasında referans suş olarak ATCC suşları kullanılmış ve diğer izolatlar ile kıyas yapma imkânı olmuştur. Buna göre yukarıda bahsi geçen çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da nitrat, jelatin, PNG, glikoz, mannitol, maltoz testleri tüm izolatlarda ve referans suşta pozitif, üre ve ADI testleri ise negatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca GNT testi de bu çalışmada her iki bakteri için bütün suşlarda pozitif sonuç vermiştir. Yanıltıcı sonuçlar ile ilgili bir değerlendirme yapılacak olunursa, özellikle sitrat (CIT) testi referans suştan her iki bakteri için de farklı sonuçlar vermiştir. Bunun dışında

Aeromonas sobria için arabinoz (ARA) testi oldukça yanıltıcı sonuç vermiştir. *Aeromonas hydrophila* için ise sitrat dışında diğer tüm testler referans suş ve izolatlar arasında çok az bir değişiklik göstermiştir. Bu anlamda bakıldığında API 20NE test kitinin *Aeromonas hydrophila* tanımlamasında oldukça başarılı olduğu söylenebilir. Ancak çalışmada API 20 NE test kitinin *Aeromonas sobria* tanımlamasında referans suş dâhil tanımlamada yanıltıcı sonuç verdiği açıkça ortaya konulmuştur.

Microgen ID test kitlerinin patojen bakterileri tanımlama konusunda API testleri kadar yaygın bir kullanımı yoktur. Ancak yine de bazı çalışmalarda kullanıldığı rapor edilmiştir. Özellikle deniz kaplumbağası yumurtalarından izole edilen bakteriler ile yapılan bir çalışmada API ve Microgen ID testleri ile moleküler tanımlama yöntemlerinin kıyaslandığı bir çalışma oldukça detaylı bir bilgi içermektedir. Bu çalışmada Gram negatif rod şeklinde olan bakterilerin tanımlanmasında en iyi sonucu Microgen ID testlerinin verdiği ifade edilmektedir (Awong-Taylor vd., 2007). Yine inci kefali (*Chalcalburnus tarichi*) örneklerinden elde edilen bakterilerin tanımlanmasında Microgen ID kitleri kullanılmış ve bahsi geçen çalışmada *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* tanımlaması yapılmıştır. Ancak çalışmada *Aeromonas sobria* izole edilemediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada spesifik primerler yardımıyla tanımlamaya gidildiğinde yine *Aeromonas sobria* izolasyonunun yapılamadığı *Aeromonas hydrophila* ve *A. caviae* izolasyonunun yapıldığı bildirilmiştir (Gülaydın vd., 2018). Bu sonuçlar moleküler çalışmalar ile Microgen ID sisteminin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Sunulan bu çalışmada da özellikle *Aeromonas sobria* izolatlarının tanımlanmasında Microgen ID testinin oldukça başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle her iki bakteri için referans suşların bu tanımlama sisteminde doğru tanımlanması oldukça önem arz eden bir konudur. Moleküler tanımlamada verilen bilgilerin, Microgen ID sisteminde de doğrulanması bir avantaj olarak kabul edilebilir.

Microgen ID testlerinde bu çalışma kapsamında özellikle *Aeromonas hydrophila* izolatları için V.P., mannitol (MAN), jelatin (GEL) ve lisin (LYS) testleri referans suşlardan oldukça farklılık arz etmiştir. Buna karşın glikoz (GLU), üre (URE) ve sitrat (CIT) gibi testler referans suşlar ile uyumlu sonuçlar arz etmiştir. Bu bağlamda irdelendiğinde API 20NE ile kıyaslandığında CIT testinin Microgen ID testinde daha başarılı sonuç verdiği söylenebilir.

Bilimsel çalışmalarda çalışmanın doğru sonuç vermesinin önemi kadar çalışmanın maliyeti de önem arz etmektedir. Bu çalışmada bakterilerin moleküler tanımlanmasına ve referans suşlar ile benzerlik göstermesine yönelik incelemede *Aeromonas hydrophila* için API 20NE daha doğru sonuç verse de Microgen ID A+B test kitinde kullanılabileceği gözlemlenmiştir. Ancak *Aeromonas sobria* için bu çalışmaya göre API 20NE testinin güvenli kullanılamayacağı buna karşın Microgen ID A+B test kitinin oldukça başarılı olduğu söylenebilir. Bu bağlamda maliyet açısından bakıldığında da Microgen ID A+B test kitinin çalışmanın yapıldığı yıl için API 20NE test kitinden %25 daha ucuz olduğu belirlenmiştir.

Sunulan bu çalışmada kullanılan Y3 suşu diğer izolatlardan farklı olarak hiçbir test sisteminde doğru tanımlanamamıştır. API 20NE sisteminde %90,0 oranında *Burkholderia capeciae*, Microgen ID sisteminde ise %62,32 oranında *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanmıştır. Diğer izolatlar ile kıyaslandığında API testinde PAC ve MAL, Microgen ID testinde ise URE testleri farklı sonuç vermiştir. *Burkholderia* cinsi 50'nin üzerinde tanımlanmış bakteri türlerini ihtiva etmektedir. Özellikle *B.cepacia*, *Pseudomonas* cinsi ile de yakın ilişkili bir türdür. Hatta *B. cepacia* biyokimyasal özellikleri, antibiyotik hassasiyeti, hücresel farklılıkları ve yapılan moleküler çalışmalar öncesinde *Pseudomonas cepacia* olarak sınıflandırılmıştır (Baylan, 2012). Bu bilgiler değerlendirildiğinde API 20NE test sisteminde *Burkholderia capeciae* olarak tanımlanan bakterinin, Microgen ID testinde de *Pseudomonas aeruginosa* olarak tanımlanması bu benzerlik ile ifade edilebilir.

5. ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının sonuçları ışığında konu ile ilgili araştırmacılara sunulabilecek öneriler aşağıda sıralanmıştır.

1. Bahsi geçen tanımama kitleri genellikle insan patojeni olan bakterilere yönelik olarak tasarlanmış kitlerdir. Bu nedenle balık patojeni bakterilerin tanımlanmasında yanıltıcı sonuçlar verebilir. Ancak yapılacak çalışmalar ile mümkün olan en doğru sonuçlara ulaşılabilir. Bu çalışma ile sıklıkla kullanılan API 20 NE test kitinin özellikle *Aeromonas hydrophila* için oldukça doğru sonuçlar verdiği ancak *Aeromonas sobria* için kullanımının uygun olmadığı anlaşılmaktadır. Buna karşın yaygınlığı çok olmasa da *Aeromonas sobria* bakterisinin tanımlanmasında Microgen GN-ID A+B panel test kitinin kullanımı daha doğru sonuçlar verecektir.

2. Moleküler yöntemlere ile tanımlama da ATCC suşlar ile uygun olan test kiti Microgen GN-ID A+B olarak bulunmuştur. Bu önemli bir detaydır. Bu nedenle bahsi geçen bakterilerde bu test kitinin kullanımı tavsiye edilebilir.

3. Maliyet açısından bakıldığında yine Microgen GN-ID A+B test kitinin API 20NE kitine göre daha ucuz olduğu belirlenmiştir.

4. Bu konuda gelecekte yanlış sonuç veren test içeriklerinin hangi şartlarda doğru sonuç verdiği araştırmacılar tarafından araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Altınok, I., Çapkın, E. and Kayış, S. (2008). Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Veterinary Microbiology*, 131, 332-338.
- Altınok, İ. and Kurt, İ. (2003). Molecular diagnosis of fish diseases: a Review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3, 131-138.
- Austin, B. and Austin, D.A. (2010). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish, 4. Edition Springer Publishing, New York.
- Avsever, M.L., Onuk, E.E., Turk, N., Tunaligil, S., Eskiizmirli, S., Incoglu, S. and Yabanli, M. 2012. Pasteurellosis cases in sea bass and sea bream cultured in the Aegean region and other bacteria isolated from these cases. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34(48), 9-16.
- Awan, M.B., Ahmed, M.M., Bari, A. and Saad, A.M. (2005). Biochemical characterization of the *Aeromonas* species isolated from food and environment. *Pakistan Journal of Physiology*, 1, 1-2.
- Awong-Taylor, J., Craven, K.S., Griffiths, L., Bass, C. and Muscarella, M. (2007). Comparison of biochemical and molecular methods for the identification of bacterial isolates associated with failed loggerhead sea turtle eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1244–1251.
- Balta F., Çağırkan, H. and Kayış Ş. (2005). Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilen *Yersinia ruckeri*'nin idenfikasyonunda API 20E testinin kullanılabilirliği. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3, 434-437.
- Baylan, O. (2012). Bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıklıkla saptanan bir fırsatçı patojen: *Burkholderia cepacia* kompleksi. *Mikrobiyoloji Bulletin*, 46(2), 304-318.
- Çarkın, E., Terzi, E. and Altınok, I. (2015). Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 114(2), 127-137.
- Durmaz, Y. ve Türk N. (2009). Alabalık işletmelerinden motil aeromonasların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3), 357-361.
- Enany, M.E., Shalaby, A.M., Shabana, I.I., EL-Gammal, A.M, and Marwa E. Hassan (2013). Characterization of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from foods of animal origin. *SCVMJ*, XVIII (2), 165-175.

- Grisez L., Ceusters R. and Ollevier F. (1999). The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. Ordalii*. *Journal of Fish Diseases*, 14, 359-365.
- Gülaydin O., Ozturk C., Onalan S., Karapinar Z., Arabaci M., Ekin I.H., Ilhan, Z., Gurturk K. and Ilhan, F. (2018). The investigation of the presence of some bacterial and viral agents in pearl mullet (*Chalcalburnus tarichii*, Pallas 1811) by Real-Time PCR and the histopathological examination. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(12), 8286-8296.
- Hassan M.A, Nouredin E.A, Mahmoud, M.A. and Fita N.A. (2017). Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 43 2, 161-167.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.T. and Williams S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.), Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
- Irfan, S. and Alatawi, A.M.M. (2019). Aquatic Ecosystem and Biodiversity: A Review. *Open Journal of Ecology*, 9, 11-13.
- Janda, J.M., Reitano, M. And Bottone, E.J. (1984). Biotyping of *Aeromonas* isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum. *Journal of Clinical Microbiology*, 19, 44-47.
- Karataş, S. 1996. *Salmo salar* larda bağırsak florasından *Aeromonas* cinsi bakterilerin izolasyonu MSc Thesis İstanbul: İstanbul Üniversitesi.
- Kayış, Ş. (2009). Trabzon ve Rize illeri'nde bulunan bazı alabalık işletmelerinde görülen bakteriyel hastalıkların tespiti ve bazı etkenlerinin çoklu PCR ile teşhisi, Doktora Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009.
- Kayış Ş., Capkin E., Balta F. and Altinok I. (2009). Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey-A Survey. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61, 339-344.
- Kayis, S., Özcelep, T., Capkin, E. and Altinok, İ. (2009). Protozoan and metazoan parasites of cultured fish in Turkey and their applied treatments. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 61(2), 93-102.
- Kayış, Ş. and Er, A. (2014). Skin lesions on different fish species caused by bacteria, *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 31, 55-59.
- Kayış, Ş., Er A., Kangel P. and Kurtoğlu, İ.Z. (2017). Bacterial pathogens and health problems of *Acipenser gueldenstaedtii* and *Acipenser baerii* sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18, 18-24.

- Kayış, Ş., Yılmaz, C. and Er, A. (2017). Pathogenic effects of some common bacteria on trout in hatchery systems. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 37, 244-252.
- Kayış Ş., Duzgun A. and Er, A. (2018). Bacterial and parasitic pathogens isolated from some wild cyprinid fishes. *El Cezeri Fen ve Mühendislik dergisi*, 5, 763-772.
- Kirov, S.M., J.A. Hudson, L.J., Hayward, and Mott, S.J. (1994). Distribution of *Aeromonas hydrophila* hybridization groups and the virulence properties in Australasian clinical and environmental strains. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 71-73.
- 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, 92 s.
- Önalın Ş., Çağırın, M., Arabacı, M. and Çağırın, H. (2016). Serological methods used for classification of bacterial fish pathogens. *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*, 3, 77-82.
- Öztürk, R.Ç. and Altınok, I. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic sciences*, 14, 275-297.
- Popovic, N.T., Skukan, A.B., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Hacmanjek, M. and Hunjak, B. (2004). Comparison of the API 20E and BBL Crystal E/NF identification systems for differentiating bacterial isolates from apparently healthy reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Research Communications* 28(2), 93-101.
- Rahman, M., Colque-Navaro, P., Kuhn, I., Huys G., Swings, J. and Mollby, R. (2002). Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 650-655.
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandin, I., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J.L. and Toranzo, A.E. (1993). Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 116(2-3), 111-20.
- Terzi, E. (2018). Yetiştiriciliği yapılan mersin balıklarından izole edilen bakterilerin antimikrobiyal direnç profillerinin belirlenmesi. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 4(2), 7-13
- Timur, G., Akayli, T., Korun, J. and Yardimci, R.E. (2010). A study on bacterial haemorrhagic septicemia in farmed young Russian sturgeon in Turkey (*Acipenser gueldenstaedtii*). *Istanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 25 (1), 19-27.

Türk, N. 2002. Çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) yavrularından bakteri izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 27, 7-14.

URL-1, (2020). <https://microgenbioproducts.com/wp-content/uploads/sites/8/2019/03/CEMID-644-Aug-18.pdf> (15 Ağustos 2020).

URL-2, (2020). <https://www.tgw1916.net/Tests/api.html> (20 Ağustos 2020).

Wahli, T., Burr, S.E., Pugovkin, D., Mueller, O. and Frey, J. (2005). *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *Fish Diseases*, 28, 141-150.

Yang, Q-H, Zhou, C., Lin, Q., Lu, Z., He, L-B. and Guo, S-L. (2017). Draft genome sequence of *Aeromonas sobria* strain 08005, isolated from sick *Rana catesbeiana*. *Genome Announc* 5(2), e01352-16.

ÖZGEÇMİŞ

05.03.1984 yılında Rize’ de doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Liseyi Rize’ de tamamladı. 2009 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünden, 2012 yılında Anadolu Üniversitesi Tarım Önlisans bölümünden, 2017 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinden mezun oldu. 2018 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir. 2009 yılında memur olarak göreve başladığı Tarım ve Orman Bakanlığında, 2018 yılından itibaren Su Ürünleri Mühendisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.