



**T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**BAZI BAKTERİYEL BALIK PATOJENLERİNE KARŞI ÇAY  
BİTKİSİ (*Camellia sinensis*) TOHUMUNUN ANTİMİKROBİYAL  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Mahmud ALŞEYH MUHAMMED**

**Danışman  
Prof. Dr. Şevki KAYIŞ**

**RİZE  
2023**

## KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında, Prof. Dr. Şevki KAYIŞ danışmanlığında, Mahmud ALŞEYH MUHAMMED tarafından hazırlanan *Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerine Karşı Çay Bitkisi (Camellia sinensis) Tohumunun Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması* adlı bu tez çalışması, 21/11/2023 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/~~oy çokluğuyla~~ başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### Unvanı, Adı SOYADI

### İmza

Başkan

:

Prof. Dr. Şevki KAYIŞ

Üye

:

Prof. Dr. Erol ÇAPKIN

Üye

:

Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU

## ETİK BEYAN

Su Ürünleri Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerine Karşı Çay Bitkisi (*Camellia sinensis*) Tohumunun Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

21/11/2023

**Mahmud ALŞEYHMUHAMMED**

## ÖN SÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada; bazı bakteriyel balık patojenlerine karşı çay bitkisi tohumunun antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Tezin başlaması, gerçekleştirilmesi ve tamamlanması aşamalarında önerileri ve yardımını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Şevki KAYIŞ'a, laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı Arş. Gör. Dr. Akif ER ve Arş. Gör. Dr. Zeynep Zehra İPEK'e teşekkür ederim. Verdiğim kararlarda, maddi ve manevi her konuda yanımda olan değerli aileme yürekten teşekkür ederim.

Mahmud ALŞEYH MUHAMMED

2023 / RİZE

## İÇİNDEKİLER

|                                                           |      |
|-----------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                       | I    |
| ETİK BEYAN.....                                           | II   |
| ÖN SÖZ .....                                              | III  |
| İÇİNDEKİLER .....                                         | IV   |
| ÖZET .....                                                | VI   |
| ABSTRACT.....                                             | VII  |
| KISALTMALAR.....                                          | VIII |
| TABLolar LİSTESİ.....                                     | IX   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                    | X    |
| GİRİŞ .....                                               | 1    |
| 1. GENEL BİLGİLER .....                                   | 3    |
| 1.1. Bakterilere Karşı Bitkisel Ürünlerin Kullanımı ..... | 3    |
| 1.2. Çay Bitkisi Tohumunun Kullanım Alanları .....        | 5    |
| 1.3. Bazı bakteriyel balık patojenleri.....               | 7    |
| 1.3.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> .....                  | 7    |
| 1.3.2. <i>Lactococcus garviaea</i> .....                  | 7    |
| 1.3.3. <i>Vibrio vulnificus</i> .....                     | 8    |
| 1.3.4. <i>Pseudomonas flourescens</i> .....               | 8    |
| 1.3.5. Pasteurollosis .....                               | 9    |
| 1.3.6. <i>Yersinia ruckeri</i> .....                      | 9    |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....                                | 10   |
| 2.1. Materyal.....                                        | 10   |
| 2.1.1. Kullanılan Bakteriler .....                        | 10   |
| 2.1.2. Kullanılan Çay Tohumları .....                     | 10   |
| 2.1.3. Besiyerleri.....                                   | 11   |
| 2.2. Yöntem .....                                         | 11   |
| 2.2.1. Bakterilerin Hazırlanması.....                     | 11   |
| 2.2.2. Çay Tohumlarının İşlenmesi .....                   | 12   |
| 2.2.3. Tohum Kısımlarından Ekte Elde Edilmesi.....        | 13   |
| 2.2.4. Antibiyogram Disklerinin Hazırlanması .....        | 14   |

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.5. Antibiyogram Testlerinin Yapılması .....                   | 15 |
| 2.2.6. Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu (MIC) Belirleme Testi .. | 16 |
| 3. BULGULAR.....                                                  | 17 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                        | 19 |
| 5. GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER .....                          | 22 |
| KAYNAKÇA.....                                                     | 23 |



**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Anabilim Dalı** : Su Ürünleri Anabilim Dalı

**Tez Türü** : Yüksek Lisans

**Danışman** : Prof. Dr. Şevki KAYIŞ

**Hazırlayan** : Mahmud ALŞEYH MUHAMMED

**Yıl** : 2023

**Sayfa** : 26

## **ÖZET**

### **BAZI BAKTERİYEL BALIK PATOJENLERİNE KARŞI ÇAY BİTKİSİ (*Camellia sinensis*) TOHUMUNUN ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, ülkemizin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılan çay bitkisi (*Camellia sinensis*) tohumunun bazı balık patojeni bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri in vitro olarak çalışılmıştır. Taze olarak toplanan çay tohumları dış kabuk, iç kabuk ve tohum içi olarak 3 farklı kısma ayrılmış, kurutulmuş ve %5'lik oranda 60°C sıcaklıkta 48 saat demlemeye tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstratlar, 0,22µm göz açıklığına sahip filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Elde edilen numunelerin antimikrobiyal etkileri katı besiyeri ve tüp dilisyon yöntemleri ile *Photobacterium damsela*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterileri üzerinde araştırılmıştır. Aynı zamanda balık hastalıklarının tedavisinde yaygın kullanılan florfenikol antibiyotığı ile bu ekstratların kıyaslanması yapılmıştır. Elde edilen bulgular, çay tohumunun iç kabuk kısmının *V. vulnificus*, *A. hydrophila* ve *L. garvieae* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinliğinin olduğunu, *Y. ruckeri*, *P. damsela* ve *P. fluorescens* bakterilere karşı ise tohumun hiçbir kısmının etkin olmadığını göstermiştir. İç kabuk kısmının etkinliğinin florfenikol ile paralel olduğu belirlenmiştir. Sunulan bu tez çalışmasının sonucunda, çay bitkisi tohumunun iç kabuk kısmının özellikle *Vibrio* türleri üzerinde antibakteriyel etkisinin olabileceğini ve dolayısıyla balık hastalıklarının tedavi edilmesi potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Antimikrobiyal etki, Bakteri, Balık, Çay Bitkisi, Testa

**Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies**

**Department** : Aquaculture

**Thesis Type** : Master's Thesis

**Supervisor** : Prof. Dr. Şevki KAYIŞ

**Author** : Mahmud ALŞEYH MUHAMMED

**Year** : 2023

**Pages** : 26

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF TEA PLANT (*Camellia sinensis*) SEED AGAINST SOME BACTERIAL FISH PATHOGENS**

In this thesis study, the antimicrobial effects of tea plant (*Camellia sinensis*) seeds, which are grown intensively in the Eastern Black Sea Region of our country, against some fish pathogenic bacteria were studied in in vitro conditions. Freshly collected tea seeds were divided into 3 different parts as outer shell, inner shell and seed, then these parts were dried and brewed at 60°C for 48 hours at a rate of 5%. The obtained extracts were sterilized with 0.22µm filters. The antimicrobial effects of the samples obtained were investigated on *Photobacterium damsela*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus* and *Pseudomonas fluorescens* bacteria using solid medium and tube dilution methods. At the same time, these extracts were compared with florfenicol, which is widely used in the treatment of fish diseases. The findings showed that the inner shell part of the tea seed had antibacterial activity against *V. vulnificus*, *A. hydrophila* and *L. garvieae* bacteria, while no part of the seed was effective against *Y. ruckeri*, *P. damsela* and *P. fluorescens* bacteria. It was determined that the effectiveness of the inner shell part was parallel to that of florfenicol. As a result of this thesis study, it has been determined that the inner shell of the tea plant seed may have an antibacterial effect, especially on *Vibrio* species, and therefore has the potential to treat fish diseases.

**Keywords:** Antimicrobial effect, Bacteria, fish, Tea plant, Testa



## KISALTMALAR

|      |   |                              |
|------|---|------------------------------|
| °C   | : | Derece Santigrat             |
| g    | : | Gram                         |
| mg   | : | Miligram                     |
| L    | : | Litre                        |
| TSA  | : | Tryptic Soy Agar             |
| TSB  | : | Tryptic Soy Broth            |
| FTS  | : | Fizyolojik Tuzlu Su          |
| CFU  | : | Colony Forming Unit          |
| VHS  | : | Viral Hemorajik Septisemi    |
| IPN  | : | İnfeksiyoz pankreatik nekroz |
| TÜİK | : | Türkiye İstatistik Kurumu    |
| MHA  | : | Mueller Hinton Broth         |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Çalışmada kullanılan bakteriler ve izole edildikleri türler .....                                       | 10 |
| <b>Tablo 2.</b> Çay tohumlarının yaş ve kurutulmuş haldeki ağırlıkları ve kurutulduktan sonraki ağırlık kayıpları. .... | 12 |
| <b>Tablo 3.</b> Antibiyogram sonuçlarına göre tohum kısımlarının oluşturduğu zon değerleri.....                         | 17 |
| <b>Tablo 4.</b> Çay tohumu testa ekstraktının farklı bakteriler üzerindeki MIC değerleri .                              | 18 |



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Çay bitkisi tohumun kısımları. URL-1 (2023)'den modifiye edilmiştir. ....                                                                               | 6  |
| <b>Şekil 2.</b> Çay tohumlarının toplandığı arazi. ....                                                                                                                 | 11 |
| <b>Şekil 3.</b> Tohumun ilk hali (a), en dış kabuk (b), iç kabuk (c) ve tohum içi (d). ....                                                                             | 12 |
| <b>Şekil 4.</b> Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş çay tohum kısımları. İç tohum (a), testa (İç kabuk) (b) ve dış kabuk (c). ....                                      | 13 |
| <b>Şekil 5.</b> Farklı tohum ekstrelerinin filtreden süzölmüş halleri. ....                                                                                             | 14 |
| <b>Şekil 6.</b> Ekstraktların filtreden geçirilerek steril edilmesi. ....                                                                                               | 15 |
| <b>Şekil 7.</b> Tohum kısımlarının besiyerlerinde farklı bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri. Tohum içi (T), iç kabuk (İ), Dış kabuk (D) ve Florfenikol (F). .... | 17 |
| <b>Şekil 8.</b> Çay tohum ekstraktlarının bakteriler üzerindeki etkileri. ....                                                                                          | 18 |

## GİRİŞ

Tarımsal üretim denildiğinde akla gelen ilk alan karasal (toprak) üretim olsa da tarım bilimlerinin önemli bir bileşenini de “su ürünleri” alanı oluşturmaktadır. Su ürünleri istihali ise avcılık ve yetiştiricilik temel alanlarından oluşmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği son yıllarda ülkemizde oldukça yaygınlaşmış ve yıllık su ürünleri yetiştiricilik verilerimiz 471.686 tona kadar ulaşmış durumdadır (TÜİK, 2022). Ekonomik ve besinsel değerlerinden dolayı su ürünlerinin yetiştiriciliği her geçen gün artma eğilimindedir. Bu durum yetiştirilen türlerin içerisinde bulundukları sistemde yoğun olarak stoklanmasına, canlı olarak transfer edilmesine ve ciddi oranda besin ihtiyaçlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yoğun su ürünleri yetiştiricilik sistemlerinin çeşitli darboğazları içerisinde hastalıklar oldukça önem arz etmektedir (Kayış, 2019). Bu hastalıkların neler olduğu, nasıl tedavi edildiği ve hastalıklardan nasıl korunması gerektiği ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (Öztürk ve Altınok, 2014; Kayış, 2019). Ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe tanımlanmış birçok parazit türü bulunmaktadır. Bu parazitler içerisinde *Costia necatrix*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* türleri ve *Hexamita* türleri, *Gyrodactylus*, *Dactylogyrus*, bazı izopodlar ve sestot türleri gibi farklı parazitler ülkemizden rapor edilmiştir (Kayış vd., 2013). Bunun yanı sıra Infeksiyöz Pankreatik Nekroz (IPN) ve Viral Hemorajik Septisemi (VHS) gibi bazı viral patojenlerin neden olduğu hastalıklar da tanımlanmıştır. Ancak yetiştiricilik sistemlerinde yaygın ve ciddi kayıplara neden olan bakteriyel hastalık etmenleri oldukça yaygın olarak rapor edilmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014). Bakteriler balıklarda proteolitik enzimler ve bazı toksinler salgılayarak hastalıklara neden olmakta ve bu hastalıklar çeşitli antibiyotikler ile tedavi edilme yoluna gidilmektedir. Yersiniozis (*Yersinia ruckeri*), Bakteriyel böbrek hastalığı (*Renibacterium salmoninarum*), Vibriosis (*Vibrio* sp.), Bakteriyel soğuk su hastalığı (*Flavobacterium psychrophilum*), *Aeromonas* ve *Pseudomonas* bakterilerinin neden olduğu sorunlar bu grup içerisindeki başlıca hastalıklar olarak karşımıza çıkmaktadır (Öztürk ve Altınok, 2014).

Bahsi geçen bakteriyel hastalıkların özellikle su ürünleri yetiştiriciliği yapılan sistemlerde oldukça yoğun ölümlere ve ekonomik kayıplara neden olduğu bilinen bir gerçektir. Bu nedenle hastalıklardan korunma ve tedavi konusu oldukça önem

taşımaktadır. Bakteriyel patojenler ile mücadelede, kontaminasyonun önlenmesine yönelik hijyen tedbirleri, optimum besleme rejimi, sağlıklı ve dirençli ırklar ve aşılama gibi tedbirler her geçen gün güncelliğini korumaktadır (Kayış, 2019). Tüm bu tedbirlere rağmen bakteriyel enfeksiyonların tedavisi amacıyla günümüzde antibiyotikler ile müdahale kaçınılmaz olmaktadır (Lasee, 1995).



## 1. GENEL BİLGİLER

Balıklarda tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin özellikle pazar boya ulaşmış balıklarda kalıntı sorunu oluşturmaları, direnç oluşumu ve çevresel anlamda olumsuz etkileri, yeni ve daha az olumsuz etkileri olabilecek ürünlere yönelmeyi zorunlu kılmaktadır. Bu anlamda bitkisel tedavi edici ajanlar günümüzde yaygın olarak araştırılmaktadır. Deniz yosunu cinsi olarak tanımlanan *Sargassum polycystum*'dan elde edilen özütün, gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*), *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı hayatta kalmaya olumlu etkisinin ortaya konulduğu bir araştırma bu konuya örnek gösterilebilir (Sönmez vd., 2021). Yine ardıç bitkisinin yapraklarından elde edilen özütün, gökkuşağı alabalıklarında kızıl ağız hastalığının etmeni olan *Yersinia ruckeri* bakterisi 'ne karşı kullanımını araştıran çalışma önemli olumlu sonuçlara ulaştığını bildirmiştir (Bilen vd., 2020). Balık patojenlerine karşı bitkisel özütlerin kullanımını araştıran oldukça geniş çaplı bir çalışmada, 22 farklı bitki türünün kullanıldığı ve bu bitkilere ait ürünlerin, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* ve *Enterococcus faecalis* bakterilerine karşı etkileri araştırılmıştır (Türker vd., 2009). Bahsi geçen çalışmada keçi sakalı olarak bilinen *Filipendula ulmaria* özütünün *A. hydrophila*'ya karşı yüksek antimikrobiyal etkisinin olduğu ortaya konulmuştur.

### 1.1. Bakterilere Karşı Bitkisel Ürünlerin Kullanımı

Bitkisel ürünlerin balık patojeni bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi ile ilgili çalışmalara şüphesiz daha fazla örnek verilebilir. Güncel çalışmaların konuları, denenmiş ve etkin olan ürünlerin yaygınlaştırılması ve yeni ürünlerin ortaya konulması şeklinde olmalıdır. Bu bağlamda daha önce kısmen çalışılmış, daha detaylı çalışılması gereken ürünlerden biri de çay bitkisidir. Canlılar için vazgeçilmez gıda olan ve sudan sonra dünya genelinde en fazla tüketilen içeceklerden biri olan çayın işlenmesi amacıyla farklı bitkiler olsa da yoğun olarak kullanılan bitki grubu *Camellia* sınıfıdır. *Camellia sinensis* (Graham, 1992) türü ise bu grup içerisinde en iyi bilinen türdür. İlk kez Çin'de kullanılıp yaygınlaşan çay günümüzde 30'dan fazla ülkede yetiştirilmektedir (Sarica vd., 2008).

Genel olarak fazla yağış alan ve sıcak iklimlerin bitkisi olarak değerlendirilse de, kuzey yarım kürede 42. enlemden başlayarak, güney yarım kürede 27. enlem derecesine kadar yaygın olarak yetiştirilmektedir. Çin, Vietnam, Kenya, Sri Lanka, Hindistan, Türkiye, Japonya ve İran önemli çay üretim merkezleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Sarica vd., 2008). Ülkemiz yıl boyu çay üretimi yapmamasına rağmen, 2022 yılı verilerine göre Rize, Artvin, Trabzon ve Giresun illerini kapsayacak şekilde yıllık 582 bin 497 ton yaş çay işleyerek 114 bin 500 ton kuru çay üretimi gerçekleştirmiştir (TÜİK, 2023).

Çay bitkisi içeriğinde bulundurduğu fenolik ve diğer bileşenler nedeniyle, sadece içim amacıyla değil farklı alanlarda da kullanımının araştırmasıyla da gündeme gelmektedir. Çayın gerek işlenmiş ürünlerinin ve gerekse yaş yapraklarının hipertansiyon, kemik yoğunluğunu düzenleyici etkileri, kalp hastalıkları, farklı kanser türleri ve antioksidan olma özellikleri araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Henning vd., 2003).

Özellikle yeşil çayda bulunan kateşinler güçlü antioksidan özelliği sahip olduğu belirlenmiştir. Yine farklı işleme yöntemi ile siyah çaydan ayrılan yeşil çayın, obeziteyi önleyici, kolesterol düzenleyici, damar sertliğine karşı kullanılabileceği ve antibakteriyel olduğunu belirlenmiştir (Koo ve Cho, 2004; Tas vd., 2005).

Çayın antimikrobiyal kullanım olanakları ile ilgili çalışmalarda, *Pseudomonas aeruginosa* *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* ve *Bacillus cereus* bakterilerine karşı etkinliği belirlenmiştir (Almajano vd., 2008). Araştırmacılar, çayın mantarlara karşı antifungal açıdan etkilerini araştırdıklarında ise farklı çay çeşitlerinin *Candida albicans* üzerinde etkilerini rapor etmişlerdir (Camargo vd. 2016).

Çay bitkisinin yaprak kısımlarının bu denli yaygın kullanıma sahip olmasının, antimikrobiyal ve antioksidan olarak araştırılması yanında farklı sektörlerde de kullanım olanakları araştırılmıştır. Bu sektörlerden biri de su ürünleri yetiştiriciliği sektörüdür. Özellikle balık yemlerinde katkı maddesi olarak kullanım olanaklarının araştırılması ile ilgili raporlara rastlanmaktadır. Asya levrek balıkları (*Lates calcarifer*) ile gerçekleştirilen bir çalışmada, 10 g/kg dozunda çay ilaveli yemler ile beslenen balıklarda kontrol grubuna göre büyüme oranının daha iyi olduğu ifade edilmiştir (Al-Ngada vd., 2017). Benzer bir çalışmada ise mersin balıklarında (*Huso*

*huso* ♂ × *Acipenser ruthenus* ♀) büyüme performansı, kan değerleri ve bağışıklık sistemi üzerinde çay bitkisinin etkisi yem ilavesi ile denenmiş ve sonuçta protein değerlendirme açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Hasanpour vd., 2017). Ülkemizde de gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yem ilavesi olarak kullanılan çay bitkisinin, büyüme performansı ve yem değerlendirme açısından etkileri araştırılmış, olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Bilgin, 2016).

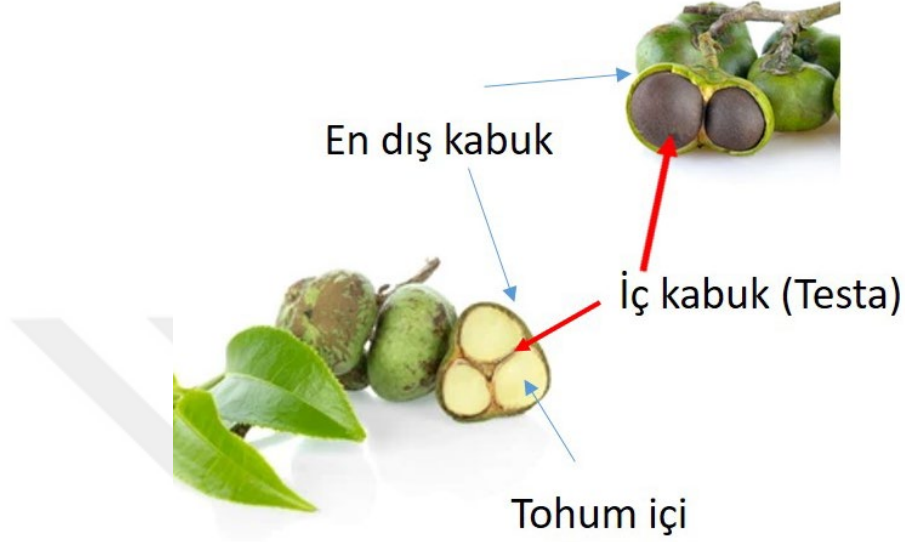
## 1.2. Çay Bitkisi Tohumunun Kullanım Alanları

Bahsi geçen tüm bu çalışmalar çay bitkisinin yaprak kısımlarından elde edilen ürünlerin değerlendirilmesi ile ilgilidir. Bunun yanı sıra çay bitkisinin tohum kısmı ile yapılan çalışmalar da bilim dünyasında yer almaktadır. Özellikle çay bitkisi tohumu yağı çok farklı alanlar açısından çalışılmıştır. Çay tohumu içerdiği %12 saponin, %2 yağ, %12 su, %12-16 ham protein, %30-50 nişasta ve sakkarit ile önemli bir üründür (Çiftçi, 2015). Çay tohum yağı, insanlar için yemeklik olarak kullanımı dâhil olmak üzere, özellikle antioksidan oluşu ve içerdiği linoleik asit ile çok değerli bir ürün olması ile kaynaklarda yer almıştır (Amooi ve Sahari, 2016). Bununla birlikte tohumun içerdiği yüksek miktarda saponin maddesi (%12-18) de oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir. Temizlik ürünlerinin içeriğinde kullanılması dışında bazı bakterilere (*Escherichia coli* ve *Streptococcus aureus*) karşı antimikrobiyal özelliğinin olduğu bildirilmiştir (Khan vd., 2018). Su ürünleri yetiştiriciliğinde ise balıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) yeme katkı şeklinde saponin kullanımının *Vibrio anguillarum* kaynaklı enfeksiyonlarda ölümleri geciktirici özelliği rapor edilmiştir (Boran vd., 2015). Saponin maddesinin bazı kabuklu su ürünlerinin predatörü olan balıklarının baskılanması amacıyla kullanıldığı bildirilmiştir. Bu amaçla balıklarda 1,1 ppm dozunda saponinin toksik etkilerinin olduğu, ifade edilmiştir (Terazaki vd, 1980).

Bir ürünün patojenlere karşı etkin olması kullanımının yaygınlaşması için tek başına yeterli değildir. Kolay elde edilebilir ve maliyetinin uygun olması gerekir. Ülkemiz genelinde çay tarımı yapılan araziler göz önüne alındığında 1 dekar alanda 100 kg çay tohumu elde edilebilir. Bu bilgiye göre Doğu Karadeniz Bölgesi yıllık 76.000 ton çay tohumu elde edilebilecek bir potansiyele sahiptir (Çiftçi, 2015).



Çay tohumu sadece tohum içerisinde bulunan kısımdan ibaret değildir. Tohumun dışını saran dış kabuk ve dış kabuk ile tohum arasından kalan ve embriyoyu koruma görevi bulunan testa denilen kısımdan oluşmaktadır (Şekil 1).



**Şekil 1.** Çay bitkisi tohumun kısımları. URL-1 (2023)'den modifiye edilmiştir.

Çok farklı bitkilerin farklı kısımlarında (tohumlarda testa kısmının yapısında) tanen denilen bileşiğin bulunduğu bildirilmiştir (El-Hefny vd., 2017). Tanenler, suda çözünebilir ve antimikrobiyal özelliklere sahip maddelerdir (Pérez-Fonseca vd., 2016). Tannik asitin balık patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yaygın bilinen balık patojenleri olan, *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri*'ye karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Balta ve Tekin, 2021). Bu açıdan değerlendirildiğinde çay bitkisi tohumunun bu farklı kısımlarının balık patojeni bazı bakterilerde etkin olabilme potansiyeli bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, bazı balık patojeni bakterilere karşı tohumun farklı kısımlarından elde edilen özütler denenmiştir. Çalışmada kullanılan bakteriler ile ilgili genel bilgiler ilerleyen kısımlarda verilmiştir.

### 1.3. Bazı bakteriyel balık patojenleri

#### 1.3.1. *Aeromonas hydrophila*

Hareketli *Aeromonas* grubu bakterilerin balık hastalıkları anlamında en çok bilinen ve rapor edilen türüdür. Gram boyama özelliğine göre negatif, sitokrom oksidaz testine göre ise pozitif özelliği olan bir bakteridir. Sucul organizmalar dışında, toprak gibi ortamlardan, süt ve süt ürünlerinden de rapor edilmiştir (Enany vd., 2013). İlk kez Avrupa yılan balıklarından (*Anguilla anguilla*) (Austin ve Austin 2010) izole edilen bakteri, sazan türleri ve gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) gibi türlerden de yaygın olarak rapor edilmiştir (Kayış vd., 2009).

Balıklarda birçok semptom ile karakterize olan hastalık özellikle deri lezyonları ve gözlerde şişme gibi belirgin semptomlar ile rapor edilmektedir. İç organlardan dalak dokusunda büyüme, asites ve böbreklerde nekrozlar rapor edilmiştir (Lasee, 1995). Bakterinin alabalık alevinlerinde mavi kese hastalığı ile ilişkili olduğu literatürde yer almaktadır (Kayış vd., 2017). Bu bakteri ile ilgili yapılan çalışmaların bazıları ise antibiyotiklere karşı direnç profilleri ilgilidir. Alabalıklardan izole edilen *Aeromonas hydrophila* suşlarının enroflaksasin, oksitetrasiklin ve diğer bazı antibiyotiklere karşı direnç genlerini taşıdığı bildirilmiştir (Durmaz ve Türk, 2009; Terzi, 2018).

#### 1.3.2. *Lactococcus garvieae*

*Lactococcus garvieae*, gram pozitif bir bakteri türüdür. Bakteri, fakültatif anaerobik, özeliğe, nonmotil, spor oluşturmeyen ve 4-45°C sıcaklıklar arasında üreyebilme özelliklerine sahiptir. Balıklardan (sarıkuyruk, *Seriola dumerili*) ilk kez 1974 yılında Japonya'dan izole edilmiştir (Kusuda vd., 1991). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda birçok denizel ve tatlısu balık türünden izole edilmiştir Öztürk ve Altınok, 2014). Ülkemizden ise ilk kayıt verilen tür gökkuşığı alabalığıdır (*Oncorhynchus mykiss*) (Didinen vd., 2014). Hastalık iç organlarda kanama, deride renk değişimi, asites ve iştahsızlık gibi belirtiler ve özellikle balıkların gözlerinde meydana gelen eksoftalmus ile karakterizedir. Bakteri, Ülkemizde son yıllarda yetiştiriciliği yapılan alabalıklardan en çok rapor edilen bakteriyel patojenler arasında yer almaktadır (Türe ve Çimagil, 2018).

### 1.3.3. *Vibrio vulnificus*

Bakteriyel balık patojenleri içerisinde özellikle denizel sistemlerde en yaygın olan grup *Vibrio* cinsine ait türler olarak bildirilmiştir. Bu bakteri grubu, Gram negatif, virgül şeklinde, hareketli ve genellikle mezofilik özelliğe sahip bakterilerdir (Kaysner vd., 2004). Günümüzde *Vibrio* cinsine ait 100 türün varlığı bildirilmiştir (Romalde vd., 2014). *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* ve *V. alginolyticus* sucül organizmalardan en yaygın olarak rapor edilen türler olarak ifade edilmektedir (Korun and Timur, 2008). Özellikle *V. anguillarum* en yaygın olan tür olarak rapor edilmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014). Bu tür sucül organizmalarda “warm-water vibriosis” olarak da tanımlanmaktadır. Bu bakteriye karşı en hassas türlerin *Anguilla anguilla* ve *A. japonica* olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 2012). Pedersen vd., (2008) patojeni gökkuşağı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) tanımlamışlardır. *V. vulnificus* ülkemizde ilk kez Ege denizinde çipura (*Sparus aurata*) balığından izole edilmiştir (Türk, 2002). Abdomen bölgesinde peteşiyal kanamalar, anal yüzgeç kaidelerinde kanama ve operkulum üzerinde kızarıklık, solgun iç organ yapısı ve abdomen boşluğunun sıvı ile dolması hastalığın önemli semptomları olarak bildirilmiştir.

### 1.3.4. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas* türü bakterilerin birçok ortamda bulunan ve sucül organizmalarda fırsatçı patojen olarak yer alan Gram negatif, rod şeklinde bakteriler olduğu ifade edilmiştir (Öztürk ve Altınok, 2014). Balıklarda hastalığa neden olan birçok türü olmasına karşın *Pseudomonas fluorescens* en yaygın rapor edilen türler arasındadır. Özellikle balıklar üzerinde pul kayıpları ve deri renginin değişimi öne çıkan semptomlardır. Patojene bağlı olarak hastalığın genelde düşük sıcaklıklarda ve larva aşamasındaki balıklarda kayıplara sebep olduğu ifade edilmiştir (Austin ve Austin, 2012). Ülkemizde ilk kez Akdeniz’den örneklenen çipura (*Sparus aurata*) balıklarından izole edilmiştir (Türk, 2002). Ülkemiz için bakteriye konak olan diğer türler arasında levrek, gökkuşağı alabalığı ve bazı akvaryum balıkları bildirilmiştir (Öztürk ve Altınok, 2014).

### 1.3.5. Pasteurollosis

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ve *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* bakterilerinin denizel ortamda balıklarda ciddi mortaliteye neden oldukları yaygın olarak rapor edilmiştir. Bu türler Gram negatif, rod şeklinde bakterilerdir. *P. damsela* subsp. *damsela* ilk kez *Morone americana* türünden 1963 yılında rapor edilmiştir. Daha sonraları özellikle çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıkları başta olmak üzere kültürü yapılan alabalıklarda da (*Oncorhynchus mykiss*) rapor edilmiştir. Kronik vaklarda iç organlarda krem rengi tümör yapıları, deri renginde kararma şeklinde karakterizedir. Diğer bakteriyel balık patojenlerinin aksine antibiyotik ile tedavide başarı oranı düşük olarak bildirilmiştir (Toronzo vd., 1991). Ülkemizde ilk kayıt Muğla ilinde çipura (*Sparus aurata*) balıklarından rapor edilmiştir (Akaylı, 2001).

### 1.3.6. *Yersinia ruckeri*

Kızıl ağız hastalığının etmeni olarak da bilinen *Yersinia ruckeri* Gram negatif, rod şeklinde oksidaz negatif, hareketli bir bakteridir. İlk olarak 1950 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde gökkuşağı alabalıklarından izole rapor edilmiştir (Rucker, 1966). Aşırı yoğun stok şartlarında farklı su sıcaklıklarında balıklarda stres oluşumunu takiben bakteri kaynaklı ciddi mortalitelerin varlığı bildirilmiştir (Lasee, 1995). Renkte kararma, letarji, deri üzerinde kanama ve ülserli yapılar, ağız çevresi ve dil üzerinde, iç organlarda küçük peteşiyal kanamalar en önemli semptomlardır (McDaniel, 1979; Valtonen vd., 1992; Austin ve Austin, 2012). Ülkemizde ilk olarak gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Timur ve Timur, 1991). Hastalık ile mücadelede aşılama uygulamasının başarılı olduğu bildirilmiştir (Bullock ve Anderson, 1984; Ellis, 1988).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Bakteriler

Çay tohumunun çeşitli kısımlarının antibakteriyel etkilerini belirlemek için tez çalışmasında kullanılan bakteriler, geçmiş çalışmalardan elde edilmiş tanımlanmış ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Uygulama Araştırma Birimi'nde stoklanan bakterilerdir. Bakteriler ile ilgili ayrıntılı bilgi Tablo 1'de verilmiştir.

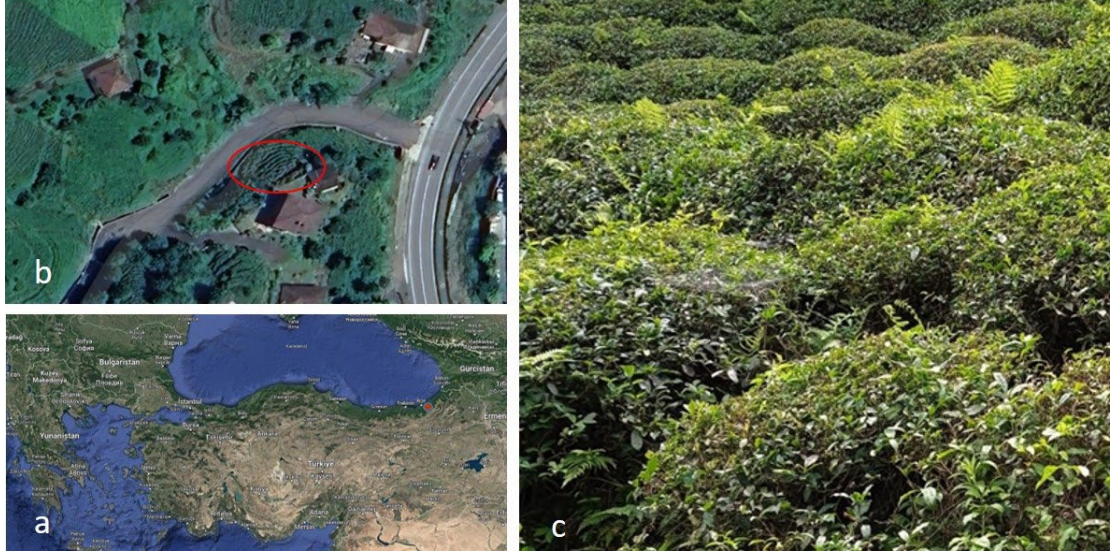
**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan bakteriler ve izole edildikleri türler

| Kod | Bakteri                        | Konak/Örnek                             |
|-----|--------------------------------|-----------------------------------------|
| 263 | <i>Photobacterium damsela</i>  | <i>Salmo salar</i> / Böbrek             |
| 211 | <i>Yersinia ruckeri</i>        | <i>Oncorhynchus mykiss</i> /Böbrek      |
| 273 | <i>Lactococcus garvieae</i>    | <i>O. mykiss</i> /Böbrek                |
| 274 | <i>Aeromonas hydrophila</i>    | <i>Acipenser guldenstaettii</i> /Böbrek |
| 283 | <i>Vibrio vulnificus</i>       | <i>O. mykiss</i> /Böbrek                |
| Y25 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | <i>O. mykiss</i> /Yumurta               |

Farklı yıllarda Hastalık teşhisi amacıyla laboratuvara getirilen balık örneklerinden izole edilen bakteriler, %15 oranında gliserol içeren besiyerleri içerisinde -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

#### 2.1.2. Kullanılan Çay Tohumları

Çalışmada kullanılan çay tohumları Rize İli, Gündoğdu mevkiinde Kemerköprü mahallesinde bulunan bir çay bahçesinden 15.12.2022 tarihinde toplanmıştır (Şekil 2). Çay bahçesinin koordinatları 41°02'41.0"N 40°37'01.4"E şeklindedir. Toplanan çay tohumları aynı gün laboratuvara getirilmiş ve +4°C da stoklanmıştır.



**Şekil 2.** Çay tohumlarının toplandığı arazi.

### 2.1.3. Besiyerleri

Çalışmada bakterilerin çoğaltılması ve antibiyogram testlerinin yapılabilmesi için genel kullanılan Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Broth (TSB, Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (Merck), besiyerleri tercih edilmiştir.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Bakterilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan bakteriler, -80°C’ den alınarak Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458) besiyerine ekimleri yapılmıştır. 22 ±2°C’ ta, 24 saat inkübe edilen bakterilerin, saf koloniler halinde elde edilmesi sağlanmıştır. Tüm bakteriler, antibiyogram testinin yapılması için Tryptic Soy Broth besiyerinde taze kültürler halinde çoğaltılmış, santrifüj sonrası saf bakteriler McFarland standartları içerisinde tercih edilen 0,5 değerinde olacak şekilde FTS (%9 luk steril tuzlu çözelti) ile sulandırılmıştır. Antibiyogram testlerinin yapılabilmesi için bu bakteriler Mueller Hinton Agar üzerine yayma şeklinde aktarılmış ve hazırlanmış farklı antimikrobiyal etki edebilecek disklerin denenmesine uygun hale getirilmiştir.

### 2.2.2. ay Tohumlarının İşlenmesi

ay bahçesinden toplanan tohumlar laboratuvarıda önce musluk suyu ile, ardından saf su ile yıkanmıştır. Ardından toplama ağırlıkları 136,80 gr olan çay tohumları dış kabuk, iç kabuk (testa) ve tohum içi olacak şekilde 3 farklı kısma ayrılmıştır. Her  kısımda etüvde 40°C sıcaklıkta 48 saat kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tohum kısımları yine tartılarak ağırlıkları alınmıştır. Yaş ve kurutulmuş haldeki tohum ağırlıkları Tablo 2’de verilmiştir. Kurutulan tohumlar öğütücü ile toz haline getirilmiştir. Tohum kısımlarının görünüşü şekil 3 ve 4’te verilmiştir.

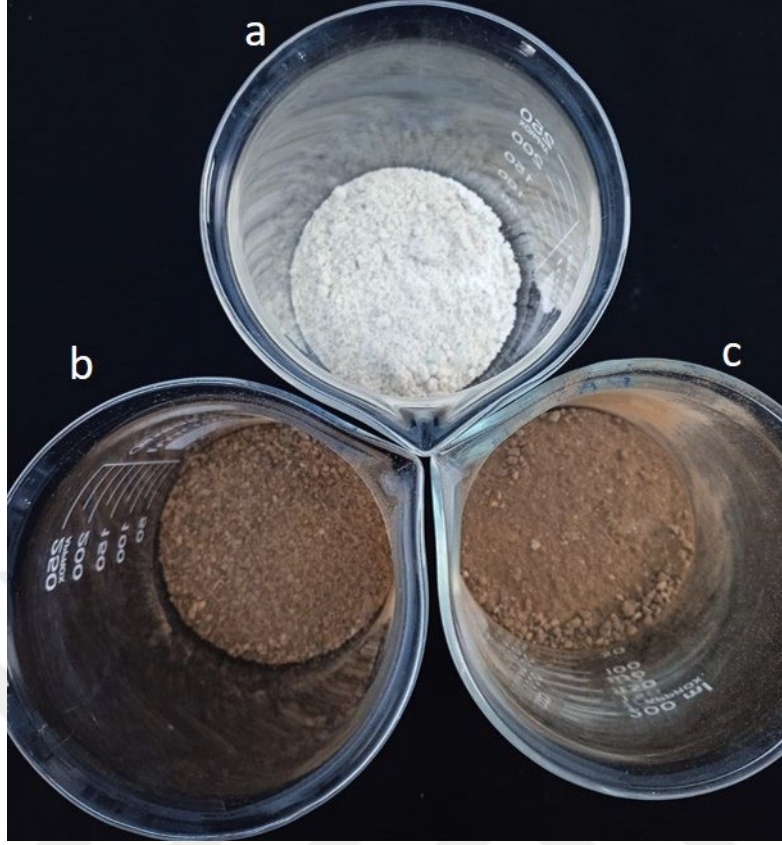
**Tablo 2.** ay tohumlarının yaş ve kurutulmuş haldeki ağırlıkları ve kurutulduktan sonraki ağırlık kayıpları.

| Tohum kısmı | Yaş Ağırlık (gr) | Kuru Ağırlık | Ağırlık Kaybı (gr) | Ağırlık Kaybı (%) |
|-------------|------------------|--------------|--------------------|-------------------|
| Dış Kabuk   | 68,07            | 13,96        | 54,11              | 75                |
| İç Kabuk    | 25,31            | 12,75        | 12,56              | 49                |
| Tohum içi   | 43,42            | 16,29        | 27,13              | 62                |
| Toplam      | 136,80           | 43           | 93,8               | 68                |



**şekil 3.** Tohumun ilk hali (a), en dış kabuk (b), iç kabuk (c) ve tohum içi (d).





**Şekil 4.** Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş çay tohum kısımları. İç tohum (a), testa (İç kabuk) (b) ve dış kabuk (c).

### **2.2.3. Tohum Kısımlarından Ektre Elde Edilmesi**

Bu çalışmada ekstraksiyon sulu yöntem modifiye edilerek yapılmıştır (Gülşen, 2017). Toz haline getirilen farklı tohum kısımları ayrı ayrı kaplar içerisinde saf su ile sulandırılmışlardır. Her bir tohum kısmı %5 lik konsantrasyonda olacak şekilde saf su ile karıştırılmış ve etüvde 60°C sıcaklıkta 48 saat demlenmeye tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda filtre kâğıdı yardımıyla 3 farklı tohum kısmı süzülüş ve katı kısımlar uzaklaştırılmıştır (Şekil 5).

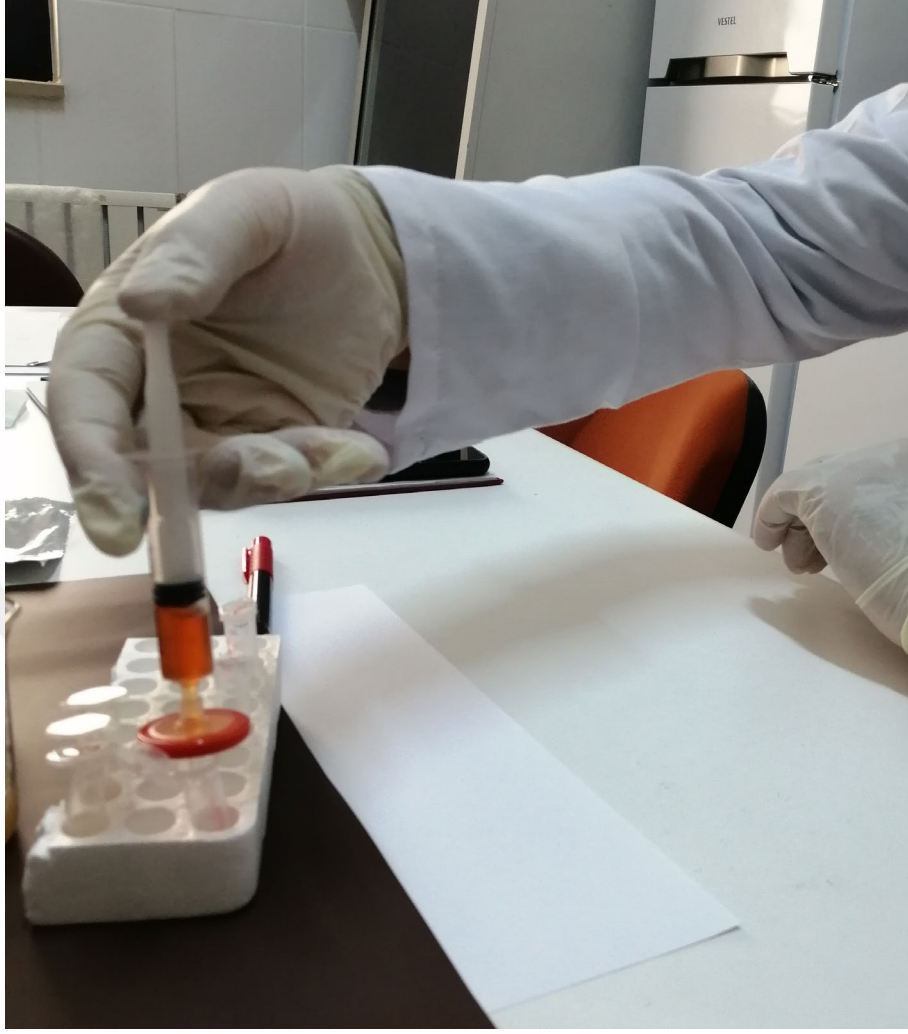




**Şekil 5.** Farklı tohum ekstraktlarının filtreden süzölmüş halleri.

#### **2.2.4. Antibiyogram Disklerinin Hazırlanması**

Elde edilen sıvı kısımların steril olmasını sağlama adına bütün ekstraktlar 0,22µm göz açıklığına sahip filtrelerden geçirilmiştir (Şekil 6). Elde edilen steril ekstraktlar 4 °C'ta stoklanmıştır. Filtre kağıtlarından hazırlanan ve çapları 6 mm olan diskler steril edilmiştir. Hazırlanan bu steril diskler içerisinde farklı ekstraktlar bulunan steril eppendorf tüplerin içerisine aktarılmıştır. Bu sayede disklerin ekstrakt maddeyi bünyesine alması sağlanmıştır. Her bir tüpün içerisine %5 lik konsantrasyon halindeki ekstraktan 1ml ilave edilmiştir. Bu tüpler içerisine ise çapları 6 mm olan 12 adet disk yerleştirilmiş ve 24 saat 40 °C'de kurumaya bırakılmıştır.



**Şekil 6.** Ekstraktların filtreden geçirilerek steril edilmesi.

#### **2.2.5. Antibiyogram Testlerinin Yapılması**

Daha önce hazırlanan ve çalışmada kullanılan bakterileri içeren petrilere tohumun farklı kısımlarının ilave edildiği diskler belli aralıklar ile yerleştirilmiştir. Ayrıca balık patojenleri için son yıllarda yaygın olarak kullanılan Florfenikol antibiyotiği de denemelerde kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır. Her bir diskin besiyerinde oluşturduğu zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Deneme iki tekerrür şeklinde yapılmıştır. Florfenikol (FFC30 $\mu$ g) için etkinlik zon çaplarının değeri, dirençli ( $\leq 14$ mm), orta hassas (15-18mm) ve hassas ( $\geq 19$ mm) olarak kabul edilmiştir (CLSI, 2018).

### **2.2.6. Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu (MIC) Belirleme Testi**

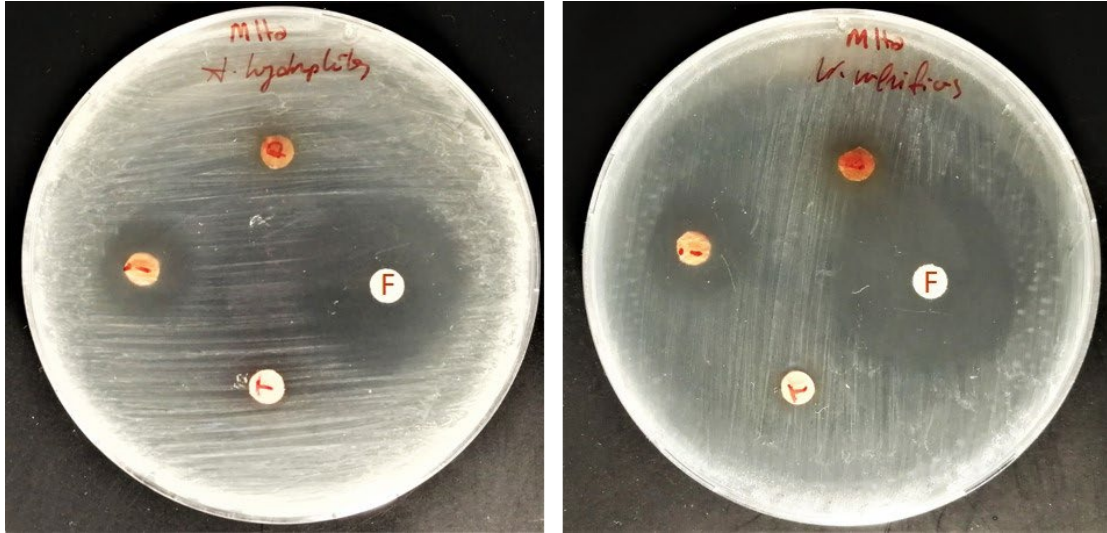
Çay tohumunun farklı kısımlarının bakteriler üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde minimum etkili konsantrasyonunun belirlenmesi için tüp dilüsyon yöntemi modifiye edilmiştir (EUCAST, 2003). Öncelikle steril 1,5ml lik epondorf tüpler (her bir patojen için 7 tüp) içerisine 200µl Mueller Hinton Broth besiyeri ilave edilmiştir. Ardından 0,5 McFarland yoğunluğunda ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) hazırlanan bakteriler her tüpe eşit miktarda olacak şekilde (10µl) aktarılmıştır. Bu sayede her bir tüpte  $5 \times 10^4$  CFU/ml bakteri olması sağlanmıştır. Ardından bu tüplere sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µl olacak şekilde farklı tohum ekstraktları (%5 lik) ilave edilmiştir. Besiyerleri 48 saat boyunca 22°C da inkübe edilmiş, bakterilerin üremesinin engellendiği en düşük konsantrasyon tespit edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Tohumun farklı kısımlarının kurutulması sonrasında en az ağırlık kaybının testa kısmında olduğu belirlenmiştir. Disklerin yerleştirildiği besiyerlerinde disklerden kaynaklı hiçbir kontaminasyonun oluşmadığı gözlemlenmiştir. besiyerlerinde çay tohumunun farklı kısımlarından elde edilen ekstraktların oluşturduğu zon çapları Tablo 3 ve Şekil 6’da sunulmuştur.

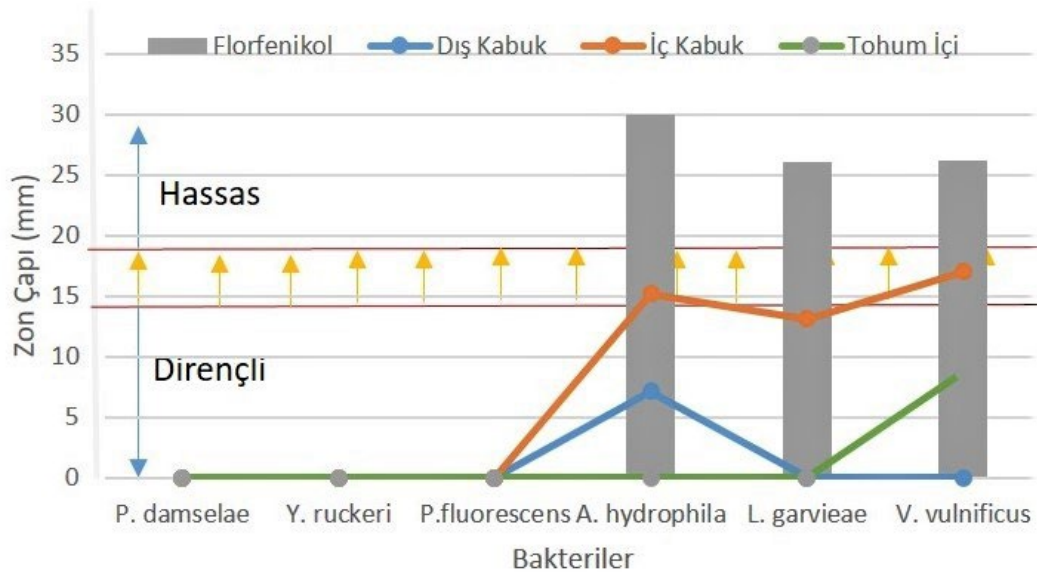
**Tablo 3.** Antibiyogram sonuçlarına göre tohum kısımlarının oluşturduğu zon değerleri.

| Bakteriler                     | Antibakteriyel ajanlar/Zon Çapları (mm) |                  |           |             |
|--------------------------------|-----------------------------------------|------------------|-----------|-------------|
|                                | Dış Kabuk                               | İç Kabuk (Testa) | Tohum içi | Florfenikol |
| <i>Photobacterium damsela</i>  | 0                                       | 0                | 0         | 0           |
| <i>Yersinia ruckeri</i>        | 0                                       | 0                | 0         | 0           |
| <i>Lactococcus garvieae</i>    | 0                                       | 13,1             | 0         | 26,1        |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>    | 7,1                                     | 15,2             | 0         | 30,0        |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 0                                       | 0                | 0         | 0           |
| <i>Vibrio vulnificus</i>       | 0                                       | 17,0             | 8,7       | 26,2        |



**Şekil 7.** Tohum kısımlarının besiyerlerinde farklı bakterilere karşı antimikrobiyal etkileri. Tohum içi (T), iç kabuk (İ), Dış kabuk (D) ve Florfenikol (F).

Bu sonuçlara göre, özellikle iç kabuk denilen testa kısmının 3 farklı bakteri için antibakteriyel özellik taşıdığı belirlenmiştir. Dış kabuğun ise belirtilen konsantrasyonda sadece *Aeromonas hydrophila* bakterisine karşı düşük seviyede etkin olduğu gözlemlenmiştir. Diğer 3 bakteriye karşı (*Photobacterium damsela*, *Yersinia ruckeri* ve *Pseudomonas fluorescens*) ise tohum kısımlarının etki etmediği tespit edilmiştir (Şekil 7).



**Şekil 8.** Çay tohum ekstraktlarının bakteriler üzerindeki etlikileri

Minimum inhibasyon konsantrasyonu (MIC) için denemede katı besiyerinde etkinliği belirlenen iç kısmın, *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio vulnificus* üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Buna göre %5 lik iç tohum konsantrasyonunun bahsi geçen bakteriler için MIC değeri Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.** Çay tohumu testa ekstraktının farklı bakteriler üzerindeki MIC değerleri

| Bakteriler                  | Konsantrasyon | Bakteri Sayısı (CFU/ml) | MIC (µl) |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|----------|
| <i>Lactococcus garvieae</i> | %5            | 5x10 <sup>4</sup>       | 30       |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | %5            | 5x10 <sup>4</sup>       | 60       |
| <i>Vibrio vulnificus</i>    | %5            | 5x10 <sup>4</sup>       | 30       |

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel patojenlerden kaynaklanan kayıpları önlemek için farklı uygulamalar yapılmaktadır. Bu uygulamalar korunma ve tedavi olmak üzere iki ana başlıkta toplanmaktadır. Tedavi amacıyla yapılan en yaygın uygulama uygun antibiyotikler ile hastalığın elimine edilmesidir. Ancak antibiyotiklerin gerek balıklara ve gerekse çevreye olan olumsuz etkileri her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır. Bu bağlamda antibiyotiklere alternatif olabilecek yeni ve çevre dostu ürünlerin keşfedilmesi araştırmalara konu olmaktadır. Özellikle aromatik tıbbi bitkiler başta olmak üzere bitkisel ürünler bu konuda karşımıza çıkmaktadır. Balıklarda yaygın olarak rapor edilen kızıl ağız hastalığına karşı (*Yersinia ruckeri*) birçok bitki ekstraktı tedavi edici özellikleri açısından araştırılmıştır. Örneğin yaban turpu (*Moringa oleifera*) ve üvez (*Sorbus domestica*) bitki ekstraktlarının *Y. ruckeri* bakterisinin sıvı besiyerinde üremesini sırasıyla %40-45 oranında baskıladığı rapor edilmiştir (Önalan ve Çevik, 2020). Benzer bir çalışmada yine 7 farklı bakteriyel patojene karşı (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus garvieae* ve *Streptococcus agalactiae*) 24 farklı bitki ekstraktının (esansiyel yağlar) antibakteriyel etkileri araştırılmış, bu ürünlerin bakterilere karşı oldukça etkin oldukları rapor edilmiştir (Birinci Yıldırım ve Türker, 2018). Terzi vd., (2023) son yıllarda yaygın olarak tüketilen likarpa (*Vaccinium arctostaphylos*) meyvesinden elde edilen ekstraktı, *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas putida*, *P. luteola*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* bakterilerine karşı antibakteriyel ürün olarak kullanmışlar ve MIC değerini 8.75 mg mL<sup>-1</sup>, olarak bildirmişlerdir (Terzi vd., 2023). Sunulan bu çalışma önceki çalışmalardan özellikle bitkisel ekstrakt açısından farklılık arz etmektedir. İlk olarak herhangi bir kimyasal sürece maruz bırakılmadan sadece su ile demleme yöntemi kullanılması metot olarak ta bu çalışmayı özgün kılmaktadır. Çay bitkisinin tohum kısmı bir bütün olarak balık patojenlerine karşı çalışılmış olsa da tohumun farklı kısımları detaylı olarak çalışılmaması sunulan çalışmayı daha da özgün kılmaktadır.

Farklı bitkisel ürünlerin aynı bakteri türüne karşı hassasiyet dereceleri farklı olabildiği gibi, aynı ürünün farklı bakterilere antibakteriyel etkileri de farklı

olabilmektedir. Bu durum bakterilerin türüne, ekstrakt elde yöntemine, fizikokimyasal şartlara ve ürünün kimyasal yapısına bağlıdır. Sunulan bu çalışmada çay bitkisi tohumunun dış kabuk ve iç tohum kısmının, bu çalışma kapsamındaki konsantrasyon ve bakteri türleri ile sınırlı olmak koşuluyla, antibakteriyel etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın iç kabuk denilen testa kısmının ise 3 farklı bakteri üzerinde orta hassasiyette etkin olduğu belirlenmiştir. Bu durumun bitkilerin testa kısmında bulunan tanenlerden kaynaklanabilme olasılığı yüksektir. Zira çay tohum içeri ile ilgili çalışmalar tohumlara 1,9 mg/g oranında tanen olduğunu ifade etmektedir (Yahaya vd., 2019). Bazı tanenlerin suda çözünbilme özellikleri ile de kullanım kolaylığına sahiptirler (Aydın ve Üstün, 2006). Tannik asitin, koliform olan *Escherichia coli*'nin gelişimini şelasyon (demir ile) oluşturarak, bakterinin demir kullanımını engellemesi ile inhibe edici özelliği ile rapor edilmiştir (Akiyama vd., 2001). Yine tannik asitin *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri* balık patojeni bakterilerine karşı antibakteriyel etkileri rapor edilmiştir (Balta ve Tekin, 2021). Bu literatür bilgileri sunulan bu tez çalışmasında tanence zengin olan testa kısmının antibakteriyel başarısını desteklemektedir.

Florfenikol bakteriler üzerinde protein sentezini engelleyerek antibakteriyel etki gösteren geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Shen vd., 2002). Son yıllarda balık yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotiğin balıklardan izole edilen *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio anguillarum* türlerindeki MIC değerleri sırasıyla 25µg, 6,25µg (*A. hydrophila* ve *V. anguillarum*) olarak bildirilmiştir. Bu değerler, *Y. ruckeri*'nin florfenikole karşı direncinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ancak aynı çalışmada tannik asitin bu bakteriler üzerindeki MIC değerleri, *Y. ruckeri* için 93,75µg iken, diğer iki bakteri için bu değer 187,5µg olarak bildirilmiştir (Balta ve Tekin, 2021). Bu sonuçlar, florfenikol ve tannik asitin etki mekanizmasının farklı olabileceğine işaret edebilir. Ancak sunulan bu çalışmada ise tanen içeriği yüksek olan iç kabuk ile florfenikolün bakteriler üzerindeki etkileri paralellik göstermektedir. Bu sonuçlar çalışılan bakterilerin daha önceden kazanmış oldukları direncin bir sonucu olarak açıklanabilir.

*Vibrio* türleri tuzlu su sistemlerinde yaygın olarak bulunan bakterilerdir. Bu nedenle bu guruptaki bakteriler denizlerde kafes sisteminde yetiştirilen balık türlerinden sıklıkla rapor edilmektedir (Öztürk ve Altınok, 2014). Ülkemizde

özellikle levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*) ve gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), en yaygın rapor edilen türlerdir. Daha önce yapılan bir çalışmada çay tohumundan elde edilen saponin ve tohumun bütün olarak kullanılmasının *Vibrio anguillarum* bakterisinde etkin olduğu ve in vivo denemelerde balıkların ölümlerini kontrol grubuna göre geciktirdiği ifade edilmiştir (Boran vd., 2015). Bahsi geçen çalışmaya paralel olarak bu tez çalışmasında da yeşil çay tohumunun özellikle iç kabuğundan elde edilen özütün, farklı bir *Vibrio* türü olan *V. vulnificus* bakterisine karşı etkin bir antibakteriyel etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *Aeromonas hydrophila* türüne karşı da orta hassasiyette olduğu, yeni doz/konsantrasyon çalışmaları ile etkinliğinin arttırılabilme potansiyeli tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, yeşil çay bitkisinin tohum kısmının ülkemizde sadece yeni jenerasyon üretiminde kullanımının dışında, antibakteriyel etkilerinin araştırıldığı bu tez çalışmasında, tohum kısımlarından iç kabuğun (testa) balık patojeni olan bakterilerden *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila* ve *Lactococcus garviae* bakterilerine karşı etkin olduğu belirlenmiştir.



## 5. GENEL DEĞERLENDİRME VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasının sonuçları ile aşağıdaki öneriler yapıla bilinir.

1. Yeşil çay tohumunun 3 farklı kısmının elde edilen özütlerinin kimyasal analizler yapılarak hangi maddeleri içerdiği belirlenmelidir. Özellikle iç kabuk kısmının tam olarak içeriğinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

2. Sunulan bu tez çalışmamasında bakteri tür çeşitliliği 6 ile sınırlıdır. Bu türlerin dışında da farklı balık patojenleri ile tohumun etkinlik denemeleri yapılabilir.

3. Elde edilen bulgular tohum iç kabuğunun *Vibrio vulnificus* bakterisine karşı antibakteriyel etkide olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle diğer *Vibrio* türleri de denemelere konu edilebilir ve etkin doz çalışmaları bu cins üzerine yoğunlaştırılabilir.

4. Bu tez çalışması in vitro olarak tasarlanmıştır. Elde edilen özütlerin balık yemlerine ilave edilerek balıklarda enfeksiyon önleyici ya da tedavi edici özelliklerinin olup olmadığı, özütlerin balıklarda toksik dozlarının neler olduğu gibi çalışmalar yapılmalıdır. İn vivo denemeler sonucunda elde edilecek olunan bilgiler ışığında yeşil çay tohumunun iç kabuk kısmı bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir.

## KAYNAKÇA

- Akayli, T. (2001). Diagnosis of vibriosis by elisa and methods in cultured Sea bream (*Sparus auratus*, 1 1758). Phd. thesis. Istanbul University.
- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T. & Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48, 487-49.
- Al-Ngada, R.S., Abdelwahab, A.M. & El-Bahr, S.M. (2017). Effect of dietary supplementation of green tea (*Camellia Sinensis*) on growth, body composition and serum biochemistry of the Asian seabass, *lates calcarifer* fingerlings. *Journal of Aquatic Resource Development*, 8(11). <http://doi.org/10.4172/2155-9546.1000518>
- Austin, B. & Austin, D.A. (2012). Bacterial fish pathogens: Disease of the farmed and wild fish, 5th ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Aydın, S.A. & Üstün, F. (2007). Tanenler 1 kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 21-31.
- Balta, F. & Tekin, N. (2021). Balıklardan izole edilen bazı bakteriyel patojenlere karşı tannik asitin antibakteriyel etkisinin belirlenmesi. *Anadolu Çevre ve Hayancılık Dergisi*, 6(4), 532-539.
- Bilen, S., Ispir, S., Kenanoğlu, O.N., Taştan, Y., Güney, K. & Terzi, E. (2020). Effects of Greek juniper (*Juniperus excelsa*) extract on immune responses and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Disease*, 44, 729–738. <http://doi.org/10.1111/jfd.13293>
- Bilgin Ö., Bircan, R. & Arıman Karabulut, H. (2016). Effect of dietary inclusion of green tea (*Camellia sinensis*) on growth, feed utilization and body composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FELS-2016 International Conference on Food, Ecological and Life Sciences, Kuala Lumpur, Malezya, 9 - 10 Mayıs 2015, ss.1-5
- Birinci Yıldırım, A. & Türker, H. (2018). Antibacterial Activity of Some Aromatic Plant Essential Oils Against Fish Pathogenic Bacteria. *LimnoFish*, 4(2), 67-74. <http://doi.org/10.17216/LimnoFish.379784>
- CLSI. (2018). Clinical and Laboratory Standart Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Wayne, PA, USA, 112s.
- Çiftçi, C. (2014). Çay bitkisi (*Camellia sinensis*) tohumunun balık sağlığı alanında kullanımının araştırılması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri ABD, Rize/Türkiye.

- Didinen, B.I., Yardımcı, B., Onuk, E.E. & Metin, S., (2014). Naturally *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792): New histopathological observations, phenotypic and molecular identification. *The Revue de Médecine Vétérinaire*, 165(1), 12-19.
- El-Hefny, M., Ashmawy, N.A., Salem, M.Z.M. & Salem, A.Z.M. (2017). Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of some phytopathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 113, 348-356. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.004>.
- EUCAST, (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. EUCAST discussion document E.dis. 5.1. <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showPdf?pii=S1198-743X%2814%2964063-5>.
- Gülşen, Ş. (2017). Süperkritik CO<sub>2</sub> ile Yalancı İğde Yaprak Ekstraksiyonu ve Major Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL, 2017.
- Hasanpour, S., Salati, A.Pa., Falahatkar, B. & Azarm, H.M. (2017). Effect of green tea (*Camellia sinensis* L.) on growth, blood and immune parameters in sturgeon hybrid (*Huso huso* ♂ × *Acipenser ruthenus* ♀) fed oxidized fish oil. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 745-753, [http://doi.org/10.4194/1303-2712-v17\\_4\\_10](http://doi.org/10.4194/1303-2712-v17_4_10)
- Kayış, Ş. (2019). Analysis of fish health status in terms of sustainability of aquaculture in Turkey-A swot analysis. *Aquaculture Studies*, 19(1), 69-7. [http://doi.org/10.4194/2618-6381-v19\\_1\\_07](http://doi.org/10.4194/2618-6381-v19_1_07)
- Kaysner, C.A., DePaola, A. & Jr Jones, J. (2004). Food and Drugs Administration: Bacteriological Analytical Manual, Methods for Specific Pathogens. *Vibrio* spp. U.S. Department of Health and Human Services. Available online at: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-9-vibrio>
- Khan, M.I., Ahhmed, A., Shin, J.H., Baek, J.S., Kim, M.Y. & Kim, J.D. (2018). Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of Gram positive and Gram negative bacteria, a comprehensive study in vitro and in vivo, evidence-based. *Complementary and Alternative Medicine*. 3486106, 12p. <http://doi.org/10.1155/2018/3486106>
- Korun, J., & Timur, G. (2008). Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Journal of Fisheries Sciences*. 2, 66–76. <http://doi.org/10.3153/jfscom.2008007>
- Kusuda. R., Kawai, K., Salat,i F., Banner, C.R. & Fryer, J.L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, 41(3), 406-409. <http://doi.org/10.1099/00207713-41-3-406>

- 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.
- McDaniel, D. (1979). Fish Health Section Bluebook: Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish Health section, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 118.
- Önalın, Ş. & Çevik, M. (2020). Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance, *Brazilian Journal of Biology*, 80 (4). <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234969>
- Pedersen, K., Skall, H.F., Lassen-Nielsen, A.M., Nielsen, T.F., Henriksen, N.H. & Olesen, N.J. (2008). Surveillance of health status on eight marine rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms in Denmark in 2006. *Journal of Fish Disease*, 31, 659–667.
- Pérez-Fonseca, A., Alcalá-Canto, Y., Salem, A.Z.M. & Alberti-Navarro, A.B. (2016). Anticoccidial efficacy of naringenin and a grapefruit peel extract in growing lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. *Veterinary Parasitology*, 232, 58-65. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.009>
- Romalde, J.L., Diéguez, A.L., Lasa, A., & Balboa, S. (2014). New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers Microbiology*, 4, 1–11. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00413>
- Rucker, R.R., 1966. Redmouth Disease of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), Bull. off. Int. Epizoot., 65, 825-830.
- Sahari, M.A. & Amooi, M. (2016). Tea seed oil: Extraction, compositions, applications, functional and antioxidant properties. *Academia Journal of Medicinal Plants*, 1(4), 068-079.
- Shen, J., Wu, X., Hu, D. & Jiang, H. (2002). Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli* infected broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 73, 137-140.
- Sönmez, A.Y., Bilen, S., Taştan, Y., Serag, K.J.B., Toring, C.C., Romero, J.B., Kenanoğlu, O.N. & Terzi, E. (2021). Oral administration of *Sargassum polycystum* extracts stimulates immune response and increases survival against *Aeromonas hydrophila* infection in *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 117291-298. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.020>
- Terzi, E., Tahiluddin, A.B. & Kadak, A.E. (2023). Evaluation of the antibacterial activity of cultivated Caucasian whortleberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) against fish pathogens. *Fisheries & Aquatic Life*, 31, 79-86.
- Timur, G. & Timur, M. (1991). An outbreak of enteric red mouth disease in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11(5), 182.

- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magarinos, B. & Barja, J.L. (1991). Pasteurellosis in cultured Gilthead bream (*Sparus aurata*): First report in Spain. *Aquaculture*, 99, 1-15.
- Ture, M. & Cimakil, R. (2018). Bilateral exophthalmos: The most important sign of Lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Anatolian Environmental & Animal Sciences*, 3(2), 91-93.
- Turker, H., Birinci Yıldırım, A. & Pehlivan Karakaş F. (2009). Sensitivity of bacteria isolated from fish to some medicinal plants. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 181-186. <http://doi.org/10.4194/trjfas.2009.0209>
- TÜİK. (2022). Türkiye İstatistik Kurumu Su Ürünleri İstatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=97&locale=tr> (Erişim tarihi: 01.07.2022).
- 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. (2023). <https://tr.depositphotos.com/stock-photos/tea-seed-oil.html>.
- Valtonen, E.T., Rintamaki, P. & Koskivaara, M. (1992). Occurrence and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at fish farms in northern and central Finland. *Journal of Fish Diseases*, 15, 163-171.
- Yahaya, L.E., Jayeola, C.O., Ogunwolu, S.O., Olalekan-Adeniran, A. & Okunade A.F. (2019). Composition of seed flour of selected nigerian tea (*Camellia sinensis*) clones – A comparative study. *Journal of Food Biosciences and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch*, 9(2), 1-10.