

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MUNZUR
ÜNİVERSİTESİ
2008

**OZON UYGULAMASININ BAKTERİYEL BALIK PATOJENİ *YERSINIA*
RUCKERI ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Tuba OTAY

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL

TUNCELİ – 2017

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OZON UYGULAMASININ BAKTERİYEL BALIK PATOJENİ *YERSINIA*
RUCKERI ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Tuba OTAY
(Enstitü No: 11876632)

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL

TUNCELİ – 2017

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

**OZON UYGULAMASININ BAKTERİYEL BALIK PATOJENİ *YERSINIA
RUCKERI* ÜZERİNE ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Tuba OTAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 24 / 01/ 2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Azime
KÜÇÜKGÜL
(Munzur Üniversitesi)
DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Prof. Dr. İbrahim
CENGİZLER
(Çukurova Üniversitesi)
ÜYE

İmza:.....

İmza:.....

İmza:.....

Bu tez, Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Numan YILDIRIM
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLTUB015-04

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu”ndaki hükümlere tabidir

ÖZET

Bu çalışmada, *Yersinia ruckeri*'nin ozon gazına duyarlılığı araştırıldı. *Y. ruckeri* (ATCC 29473) triptik soy agar (TSA) besiyerinde inoküle edilerek 22 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda elde edilen saf kültürden 100µl'lik fizyolojik tuzlu su (FTS - % 0,9 NaCl - Sigma) içeren tüplerde 0.5 Mcfarland bulanıklığına karşılık gelen (UV spektrofotometre ile OD 600nm=0.132 absorbans) 1.5×10^8 cfu/ml konsantrasyonunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu konsantrasyondan 1:10 oranında seri dilüsyonlar yapıldı. 1.5×10^4 cfu/ml dilüsyonunda bakteri konsantrasyonu, farklı sürelerde (5 dk, 10 dk, 15 dk ve 30 dk) ozona gazına maruz bırakıldı. Bakterinin ozon gazına duyarlılığı 12 ve 40 γ/ml konsantrasyonlarına sahip jeneratör yardımıyla belirlendi. Elde edilen verilere göre, *Y. ruckeri*'nin 12 γ/ml ozon uygulananı ile 5 ve 10 dk içerisinde en etkin bakterisidal etkinin sağlandığı belirlendi. Ancak ilerleyen zamanlarda ozonun etkinliğini kaybettiği gözlemlendi. Bununla birlikte 40 γ/ml ozon uygulananında bakterisidal etkinin zamana bağlı olarak arttığı ve 15 ile 30 dakikalarda bakterilerin tümünün öldüğü tespit edildi. Bu deneme sonunda *Y. ruckeri*'nin ozon gazına duyarlı olduğu gösterdiği bakterisidal etki ile belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Bakterisidal etki, Balık patojeni, *Yersinia ruckeri*, Ozon

ABSTRACT

Examination of Effectiveness on *Yersinia ruckeri* that is Bacterial Fish Pathogen of Ozone Application

In this study, the susceptibility of *Yersinia ruckeri* to ozone gas was investigated. *Y. ruckeri* (ATCC 29473) inoculated on tryptic strain agar (TSA) medium and was incubated for 24-48 hours at 22 ° C. At the end of the incubation period, the concentration of 1.5×10^8 cfu / ml bacterial suspension according to 0.5 Mcfarland's (OD600nm = 0.132 absorbance by UV spectrophotometer) of the pure culture obtained were prepared in tubes containing 100 µl of physiological saline (FTS - 0,9% NaCl - Sigma). The following to serial dilutions (1:10 rate), the bacterial concentration (1.5×10^4 cfu/ml) was exposed to ozone gas at different times (5, 10, 15 and 30 min). The susceptibility of *Y. ruckeri* to ozone gas was determined by helping generator at 12 and 40 γ/ml concentrations. Obtained the data indicated that the most effective bactericidal effect was determined in 5 and 10 min by 12 γ / ml ozone application of *Y. ruckeri*. However, in the following time, it was observed that ozone lost its activity. At the same time, bactericidal activity increased depending on time in the ozone application of 40 γ/ml and all bacteria dead within 15 and 30 minutes. At the end of this trial, it was determined by the bactericidal effect that *Y. ruckeri* was sensitive to ozone gas.

Key Words: Bactericidal effect, Fish pathogen, *Yersinia ruckeri*, Ozone gas

TEŞEKKÜRLER

Bu tezin hazırlanmasında yardım, bilgi ve birikimlerinden faydalandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL'e, laboratuvar çalışmalarında tüm olanakları ile destek veren ve yardımlarını esirgemeyen Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa İŞGÖR, Munzur Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi ve Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimine (MUNİBAP), ve ayrıca çalışmam boyunca bana yardımcı olan arkadaşım Meryem Nur ATABAY, her daim yanımda olan anne ve babama teşekkürlerimi sunarım.

Tuba OTAY
TUNCELİ – 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜRLER.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLOLAR LİSTESİ.....	VII
RESİMLER LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve YÖNTEM	7
2.1. Materyal.....	7
2.1.1. Bakteri (<i>Yersinia ruckeri</i> ATCC cat no: 29473, Serotip 1)	7
2.1.2. Ozon Jeneratörü	8
2.2. Yöntem	8
2.2.1. Bakterilerin Üretilmesi, Pasajlanması ve Ozon Uygulanması	8
3. BULGULAR.....	11
3.1. Bakteri Konsantrasyonu	11
3.2. Ozonlama İşlemi	12
4. TARTIŞMA.....	15
5. SONUÇLAR.....	19
KAYNAKLAR.....	20
ÖZGEÇMİŞ	25

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1. <i>Yersinia ruckeri</i> konsantrasyonuna bağlı koloni sayısı.....	12
Tablo 3.2. Agar yüzeyine 10,5 mg/saat (12 ve 40 ę/ml) ozon maruziyeti ile <i>Y. ruckeri</i> koloni sayısındaki değişim (TBE: tam bakterisidal etki).....	12



RESİMLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 2.1. <i>Yersinia ruckeri</i> (ATCC 29473).....	7
Resim 2.2. Ozon jeneratörü.....	8
Resim 2.3. <i>Y. ruckeri</i> üzerine <i>in vitro</i> ozon gazı uygulama işlemi	9
Resim 2.4. Ozonlama sonrası agar plaklara ekim işlemi	9
Resim 2.5. Ekim sonrası inkübasyon işlemi.....	10
Resim 3.1. Seri dilüsyon sonrası (1:10) besi yeri koloni görünüşleri	11
Resim 3.2. Bakteri süspansiyonu 10^4 dilüsyonda 12 γ /ml ozon maruziyeti uygulanan gruplar (Kontrol, 5, 10, 15 ve 30 dk)	13
Resim 3.3. Bakteri süspansiyonu 10^4 dilüsyonda 40 γ /ml ozon maruziyeti uygulanan gruplar (Kontrol, 5, 10, 15 ve 30 dk)	14

1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde son yıllarda dünya çapında hızlı ilerlemeler kaydedilmiştir. İntensif olarak yetiştirilen türler arasında sazan ve alabalık ilk sıralarda yer almaktadır. Yetiştiricilik işletmelerinde türe özgü optimal isteklerin sağlanması, dezenfeksiyon, hijyen ve sanitasyon uygulamaları sağlıklı balık yetiştirmek için önemle üzerinde durulması gerekli uygulamalardır. Bu uygulamaların yetersizliği ya da eksikliği ile ortaya çıkabilecek hastalık olguları ekonomik kayıplara neden olma, ihracatı olumsuz etkileme, ilaç masraflarıyla maliyeti arttırma, çevre kirliliği oluşturma, iş ve zaman kaybına yol açma gibi durumlara sebebiyet vermesi nedeniyle bir işletme için önemlidir (Emre ve Kürüm, 1998). Avrupa ve dünya için hastalık kaynaklı sorunlar balık üretiminde kalite üzerine etkiler göstermektedir (Hill ve ark., 2005). Balık yetiştiricilik işletmelerinde türe uygun optimal su kalitesi ve yetiştiriciliğin her kademesinde dezenfeksiyon, hijyen ve sanitasyon uygulamaları, sağlıklı balık yetiştirmek için önemle üzerinde durulması gerekli konuların başında gelmektedir. Son yıllarda balık çiftliklerinde gözlenen hastalık yapıcı mikroorganizmalar ile oluşan sağlık problemleri, yeni patojenlerin belirlenmesini ortaya çıkarmıştır. Yetiştirme şartlarında yoğunluk ve stres artışının sebep olduğu bu hastalık problemleri balık üretim tesislerindeki en büyük sorunların başında gelmektedir.

Birçok yönüyle gelişme hızı kazanan su ürünleri yetiştiriciliği önemli bir endüstri alanı olmuştur. Türkiye birçok yönüyle (iklim, sıcaklık, hava vb.) alabalık yetiştiriciliği için uygun özellikler taşımaktadır. Özellikle son yıllarda gerek karada dereler üzerine kurulan çiftlikler gerekse deniz ve baraj göllerindeki ağ kafes işletmelerinin sayısında hızla artış olmaktadır. Kültür balıkçılığı sektöründe ki hızlı artış işletmelerin daha iyi organize olmalarını ve bilinçli hareket etmelerini sağlamıştır. Bölgemizde yetiştiriciliği yapılan türlere bakıldığında gökkuşağı alabalığı ilk sırayı (%70) almaktadır (Anonim, 2000; Anonim, 2008). Fakat teknolojik gelişme ile ortaya çıkan negatif yönler birçok mikroorganizma kaynaklı hastalıklara yol açmakta ve sonuçta ölümler görülmektedir. Bu nedenle birçok araştırmacı tarafından kültürü yaygın olarak yapılan gökkuşağı alabalığı üzerinde sık görülen patojenlerin etkisi incelenmiş ve *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Flexibacter* spp., *Vibrio* spp., *Yersinia* spp., *Renibacterium* spp., *Streptococcus* spp. gibi etiyolojik ajanlar bildirilmiştir. Bunun yanında, özellikle *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Lactococcus garvieae* ve *Yersinia ruckeri* enfeksiyonlarının ciddi kayıplara

yol açtığı vurgulanmıştır (Burka ve ark., 1997; Schmidt ve ark., 2000; Kum ve ark., 2004; Akinbowale ve ark., 2006).

Balıklarda ortaya çıkan hastalıkların çoğu bakteriyel kökenlidir. Bu bakteriyel hastalıklardan intensitesi ve invazyonu güçlü olan *Yersinia ruckeri*'nin etkeni olduğu enterik kızıl ağız hastalığıdır. Birçok balıktan ve diğer canlılardan (su samuru, misk sıçanı vs.) izole edilen bu etken entansif olarak yetiştirilen salmonidlerin en önemli hastalığı olarak kabul edilmektedir (Horne ve Barnes, 1999). 1950'li yıllarda ilk defa Hagerman Vadisi'nde raporlanan bu hastalık şimdilerde birçok kıtada ve coğrafik alanlarda dağılım göstermektedir (Bullock ve ark., 1978; Alvarez ve ark., 1992). Karında sıvı toplanması, renk koyulaşması, ağız, operkulum ve yüzgeç tabanlarında hemorajik odaklar ile karakterize bulaşıcı, öldürücü bir bakteriyel bir hastalık olan kızıl ağız hastalığı şiddetli seyrettiği durumlarda balık üretim tesislerinde ciddi kayıplara sebebiyet verebilmektedir (Arda ve ark., 2002). Hastalığın sağaltımında antibiyotik tedavisinden faydalanılmaktadır. Fakat son yıllarda antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması ve bilinçsiz tüketimi hastalığı tedavi etmekten çok, daha ciddi problemleri (kalıntı sorunu, çevre kirliliği oluşturma, antibiyotik direnci arttırma vb.) ortaya çıkarmıştır. Dengeli beslenme bakımından üretimin artışına paralel olarak sanitasyon önemli hale gelmiş ve bundan dolayı dezenfektan maddelere olan talep artmıştır. Son yıllarda bu dezenfektanların ilk sırasında yer alan ozon alternatif olarak önem kazanmaktadır.

Bu hastalığın etkeni olan *Yersinia ruckeri* 1991 yılında ilk kez Denizli'deki bir alabalık yetiştiricilik ünitesinden identifiye edilmiştir (Timur ve Timur, 1991). Daha sonra yayılımında hız göstererek başka alabalık ünitelerinde de ortaya çıkmış ve ülkemiz için ciddi bir sorun oluşturmuştur. *Y. ruckeri*, aerobik ve anaerobik koşullarda üreyebilen Gram-negatif (Gr -) bir basildir. TSA, BHIA ortamlarında 24-48 saat içerisinde ve 22-25°C'lerde beyazdan krem rengine kadar değişen renklerde 1-2 mm çapında şeffaf, düzgün, konveks koloniler oluşturmaktadır (Arda ve ark., 2002). Bakteri hareketli, sporsuz ve peritrik tip kamçıya sahiptir (Cengizler, 2000).

İnfeksiyonun başlıca klinik belirtileri arasında rengin koyulaşması, ağzın iç ve dış kısımlarında, operkulumlarda, vücudun dış yüzeyinde ve yüzgeçlerin tabanında kanamalar, karında şişkinlik (sıvı toplanması), ekzoftalmus gözlenebilir. Bu belirtilere bakarak infeksiyon için kesin teşhis konamaz. Otopside, iç organlarda ve peritonda kanamalar, mide ve karın boşluğunda sarımsı bir sıvı birikmesi, iç organlarda hemorajik septisemi

tablosu gözlenebilir. Böbreklerin ön ve arka porsiyonunda nekrozlara rastlanabilir (Timur ve Timur, 1991; Arda ve ark., 2002).

Yersiniozis'te olduğu gibi birçok bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde antibiyotik uygulamaları (tetrasikin, sulfanamid, oksolinik asit, flumekuin gibi) yakın zamana dek tercih edilmekteydi. Ancak, mevzu bahis antibakteriyellere daha önceleri hassas olan *Y. ruckeri*'nin bu antibiyotiklerin aşırı kullanımına bağlı olarak zamanla direnç kazanabileceği birçok araştırmacı tarafından vurgulandıktan sonra antibiyotik uygulanmasının sınırlandırılması gerektiği ifade edilmiştir (DeGrandis ve Stevenson, 1985; Kirkan ve ark., 2006).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde son yıllarda kullanılmaya başlayan ozon alternatif tedavi stratejilerinden biri olarak değerlendirilmiştir. Saf oksijen ile ozonun belirli oranlarda karıştırılıp dezenfeksiyon amaçlı kullanımın yanında yüksek oksidasyon kuvveti ile mikroorganizma tahribatında da tam etkin bir rol üstlenerek bakterisid, virusid ve fungusid olarak etki göstermektedir (Broadwater ve ark., 1973; Bocci, 2006).

Ozon (O_3) gazı ilk kez 1785 yılında Van Marum tarafından bildirilmiştir. C.F. Schonbein ise, 1840 yılında bu maddenin suyun elektrolizi sırasında oluştuğunu göstermiş ve ozon olarak tanımlamıştır (Andersen ve Sarma, 2002). Ozon ya da triatomik oksijen (O_3), oksijenin doğada yüksek enerjili elektrik akımına ve ultraviyole ışınlarına maruz kalması sonucunda oluşan, 3 oksijen atomu taşıyan bir molekül olup son derece kararsızdır. Ozon mavimsi, patlayıcı bir gaz ya da mavi bir sıvıdır. Ozon gazı kolay bir şekilde serbest oksijen atomları ya da radikaller oluşturarak daha kararlı formu olan diatomik oksijen (O_2) haline dönüşür. Serbest oksijen atomlar ya da radikaller son derece reaktiftir ve temasta olduğu hemen her şeyi (virüs, bakteri, organik ve inorganik bileşikler) oksitleyebilmekte, çok güçlü bir dezenfektan ve oksidan olarak etki göstermektedir. Son derece reaktif bir gaz olan ozon, 0.02- 0.05 ppm'e kadar düşük konsantrasyonlarında bile fark edilebilir karakteristik, keskin bir kokuya sahiptir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (> 0,1 ppm) göz ve solunum yolunu tahriş edebilmekte ve hatta yüksek konsantrasyonlar ölümcül olabilmektedir (Leh, 1973).

Güneşin ultraviyole ışını ve yıldırım anında ortaya çıkan ozon elektrik arkları ile oluşan canlıları koruyan aktif bir oksijendir. Ozonun oluşum mekanizmasında yüksek enerjili mor ötesi ışınlar bir oksijen molekülüne (O_2) çarpıp bu çarpma sonucunda oksijen molekülü iki serbest oksijen atomuna ayrılır. Serbest kalan oksijen atomları, oksijen molekülleriyle birleşir. Bu birleşimle ozon molekülü (O_3) oluşur (De Fabo, 2000;

Andersen ve Sarma, 2002). Yıldırım esnasında oluşan yüksek voltajlı elektrik boşalımı ozon üretimini sağlar. Her yıldırım ve sağanak sonrasında ozon olarak bilinen temiz bir koku fark edilir (Subaşı, 2008).

Laboratuvar ortamında oksijen içeren gazlara UV radyasyon ya da elektrik akımı uygulanarak ozon gaz üretilmektedir. Ozon üreten bir sistem genellikle dört bileşenden oluşur: bir güç kaynağı ya da ozon jeneratörü, bir gaz kaynağı, bir ozon dağıtım sistemi ve bir de istenmeyen gazlar yok eden bir sistem (United States Environmental Protection Agency, 1999). Ozon jeneratörlerinin yardımıyla üretilen O_3 içme suyunun daha iyi hale getirilmesi, atık su yönetimi, saf su eldesi, balıkçılık, tarım, kâğıt, gıda ve boya sanayi gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Ayrıca, O_3 kaynak sularında dezenfektan olarak, gıdalarda tazeliğin korunması ve depolama ömrünün uzatılması amacıyla da kullanılan bir maddedir.

Aldığımız havadan veya oksijenden üretilen ozonun hammaddesi oksijendir ve natürel tek dezenfektandır. Maliyet açısından diğerlerine göre daha iyidir. Havada ve suda koku bırakmaz aynı zamanda mikroptaki barındırmaz (Subaşı, 2008). Dezenfektan madde olarak etkinliğini yükseltgen özelliği ve yüksek reaktivitesi aracılığıyla gösterir. Sudaki organik madde içeriğini, ilaç kalıntılarını, suda kirliliğe sebep olan maddeleri etkili olarak yükseltgeyerek suyun daha kaliteli olmasını sağlamakta, zararlı maddeleri de minimize ederek bulanıklığını yok etmekte öncelikli olan ozon (O_3), oksidasyon gücü çok fazla, artık ve kalıntı bırakmayan etkili bir dezenfektan maddedir (Summerfelt ve ark., 1997; Baysan ve Lynch, 2004). Suffet ve ark. (1986), çeşitli kalitedeki su örneklerini 2,5-2,7 mg/L ozon gazına maruz bırakarak 10 dakikada tüm koku ve kötü tadın büyük oranda indirildiğini rapor etmişlerdir.

Su kalitesinde iyileşme, büyümede hız, ölüm oranında azalma, kötü organik madde içeriğinde iyileşme, etkili dezenfekte etme, oksijence bol su üretme gibi birçok yönüyle kullanılan ozon yetiştiricilik üniteleri için vazgeçilmez unsurların başında gelmektedir. Tüm bu uygulamaların alanlarında ozonun dozajı, balık miktarı, büyüklüğü, suyun debisi, tatlılık-tuzluluk oranı, pH ve sıcaklık birçok faktör ile paraleldir. Bu konu üzerinde önceden yapılmış araştırmalar, balık yetiştiricilik sistemlerinde su kalitesini arttırmak, suyun sirkülasyonunu sağlamak için ozonun dezenfeksiyon niyetiyle kullanıldığını göstermektedir (Brazil, 1996; Summerfelt ve ark., 2008). Sağlıklı balık yetiştirmek, suyu daha kaliteli hale getirmek için ozonasyon seviyesinin 15–25 g O_3 /kg yem arasında olması gerektiği vurgulanmıştır (Brazil, 1996; Bullock ve ark., 1997). Otte ve Rosenthal (1979),

balık yetiştiriciliğinde ozonun etkin bir biçimde uygulanabildiğini, ozona maruziyet ile balıklardaki ortalama büyüme oranının % 30 ve sudaki nitrit (NO_2^-) ile amonyum (NH_4^+) konsantrasyonlarının ise azaldığını rapor etmişlerdir.

Oksijenin üç atomlu bir allotropu olan O_3 bakteri, fungus, protozoa, virüs ile bakteriyel ve fungal sporlara karşı güçlü ve geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır (Scott ve Leshner, 1963; Mudd ve ark., 1969; Hinze ve ark., 1987; Pryor, 1992; Greene ve ark., 1993; Khadre ve ark., 2001). Birçok dezenfektandan farkı, toksik olmayan parçalanma ürünlerine dönüşen ve oksidasyon yolu ile antimikrobiyal aktivite gösteren bu kimyasal, antimikrobiyal etki mekanizmasını genetik materyal üzerinde etki göstererek mikroorganizmanın hücre membranında glikoproteinleri ve lipoproteinleri okside etmesi ile sağlamaktadır. Mikroorganizmaların hücre yapılarında parçalanma sağlayarak zarar gösteren ozon, aynı zamanda enzim sistemini üzerinde etki gösterip solunumu durdurarak mikroorganizmanın ölümüne neden olmaktadır (Kim ve ark., 1999). Ozonun antimikrobiyel etkileri ile ilgili çalışmalarda çeşitli balık patojenlerinin ozon ile sağaltımının ancak uygun dozlar dâhilinde patojenleri yok ettiği bildirilmiştir (Conrad ve ark., 1975; Wedemeyer ve Nelson, 1977; Colberg ve Lingg, 1978; Austin, 1983; Sako ve Sorimachi, 1985). Colberg ve Lingg (1978), tarafından yapılan bir çalışmada 0,12-0,50 mg/L ozon konsantrasyonun bir dakikalık uygulama ile dört bakteriyel balık patojeni (*Aeromonas liquifaciens*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas fluorescens*, ve *Yersinia ruckeri*) üzerinde %99,9 oranında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Balık virüsleri (İnfeksiyöz hematopoyetik nekrozis virüs-IHNV ve İnfeksiyöz pankreatik nekrozis virüs-IPNV) ile kontamine suyun 0.005– 0.010 mg/L ozon uygulaması ile dezenfeksiyonunu sağlandığı gösterilmiştir (Wedemeyer ve ark., 1978). Liltved ve ark. (1995) ise, dört balık bakterisinin 0,15-0,20 mg/L konsantrasyonda %99,9 inaktive olduğunu raporlamışlardır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki yaklaşık 2 mg/L ozon konsantrasyonunu yüzey sularında bulunan spesifik balık patojenlerini kontrol etmek için kullanılmaktadır (Owsley, 1991; Summerfelt ve ark., 1997).

Balık yetiştiricilik ünitelerinde öncelikli dezenfeksiyon amacıyla kullanılan ozonun, bu tez ile antimikrobiyal etkinliği ortaya konmuştur. Balık çiftliklerinde önemli bir hastalık olan Yersiniozis'in etkeni olan *Y. ruckeri* ozon ile belirli dozlarda muamele edilerek bakteri üzerinde ozonun en etkin olduğu konsantrasyon araştırılmıştır. Konu ile ilgili bilim insanları günümüzde balık hastalıklarının ozon ile sağaltımı için çalışmalarını

sürdürmektedir. Mevcut çalışma ileriki çalışmalar için bir literatür niteliği taşımasının yanı sıra ozonun farklı bir kullanım alanı olarak ta önem arz etmektedir.



2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri (*Yersinia ruckeri* ATCC cat no: 29473, Serotip 1)

Çalışmamızda, ATCC 29473 katalog no'lu gökkuşağı balığından izole edilen *Yersinia ruckeri* suşu kullanıldı. Bakteri suşu Pendik Veteriner Araştırma Entitüsü'nden temin edildi (İstanbul, Türkiye). *Y. ruckeri* triptik soy agar besiyerinde inoküle edildi ve 22 °C'de 24 saat inkübe edildi (Resim 2.1). Elde edilen saf kültürden 1 ml'lik fizyolojik tuzlu su (FTS - % 0,9 NaCl - Sigma) içeren tüplerde 0.5 Mcfarland bulanıklığına karşılık gelen (UV spektrofotometre ile OD600nm=0.132 absorbans) 1.5×10^8 cfu/ml konsantrasyonunda bakteri süspansiyonu hazırlandı (Mcfarland, 1907).



Resim 2.1. *Yersinia ruckeri* (ATCC 29473) (Orijinal)

2.1.2. Ozon Jeneratörü

Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında bulunan ozon/oksijen karışımını sağlayan ozon jeneratörü kullanıldı (Resim 2.2). Saatte 10,5 mg ozon oluşturan cihaz, oksijen tüpü ile desteklenmektedir.



Resim 2.2. Ozon jeneratörü (orijinal)

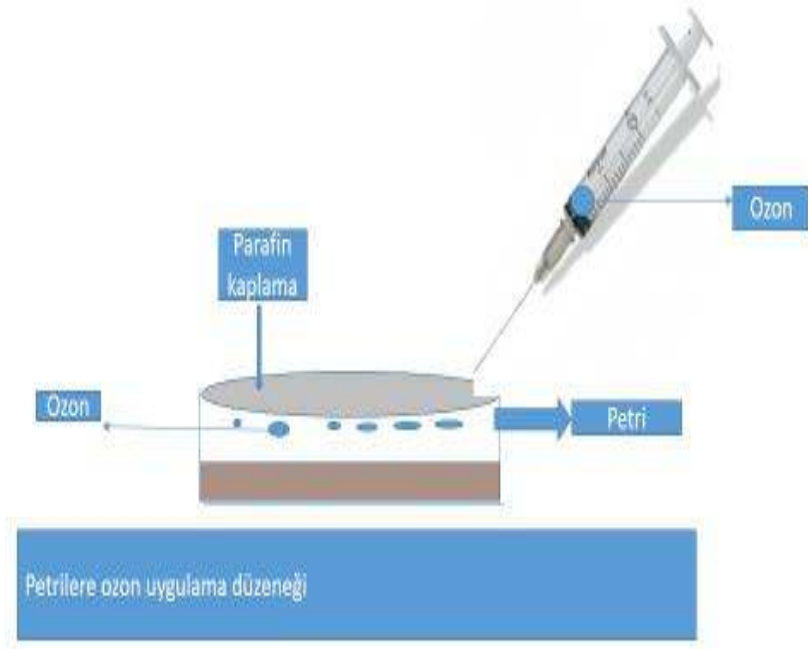
2.2. Yöntem

2.2.1. Bakterilerin Üretilmesi, Pasajlanması ve Ozon Uygulanması

Çalışmamızda *Y. ruckeri*'nin ozon gazına duyarlılığı araştırıldı. Bu amaçla 1.5×10^8 cfu/ml bakteri konsantrasyonundan seri dilüsyon yapıldı ve dilüe edilen bakteri konsantrasyonlarının her birinden 3 agar plağa yayma ekimleri gerçekleştirildi. İnkübasyonu takiben (22 °C 24-48 saat) koloni sayılarının ortalamaları alındı.

Ozonlama işlemi için, deneysel süre olarak belirlenen (5, 10, 15 ve 30 dk.) zamanlarda üç tekrarlı olarak 1.5×10^4 cfu/ml dilüsyondan 100 µl alınarak TSA plaklara yayma ekimleri gerçekleştirildi. Ekimleri takiben besi yerlerinin ağzı hava almayacak şekilde para filmle kapatıldı ve ozon jeneratöründen steril enjektör yardımıyla 12 ve 40

γ /ml ozona maruz bırakıldı (Ozone HELPS-EOG100) (Resim 2.3). Deneme süreleri sonunda plaklardaki parafin uzaklaştırılarak etüvde 22 °C'de 12-24 saatlik inkübasyonu sağlandı (Resim 2.4 ve 2.5). Bir sonraki gün kontrol plaklar ve ozon gazına maruz bırakılan plaklar için koloni sayımları gerçekleştirildi ve ortalamalarının alınmasıyla mevcut değerler kaydedildi.



Resim 2.3. *Y. ruckeri* üzerine *in vitro* ozon gazı uygulama işlemi (Orijinal)



Resim 2.4. Ozonlama sonrası agar plaklara ekim işlemi (Orijinal)

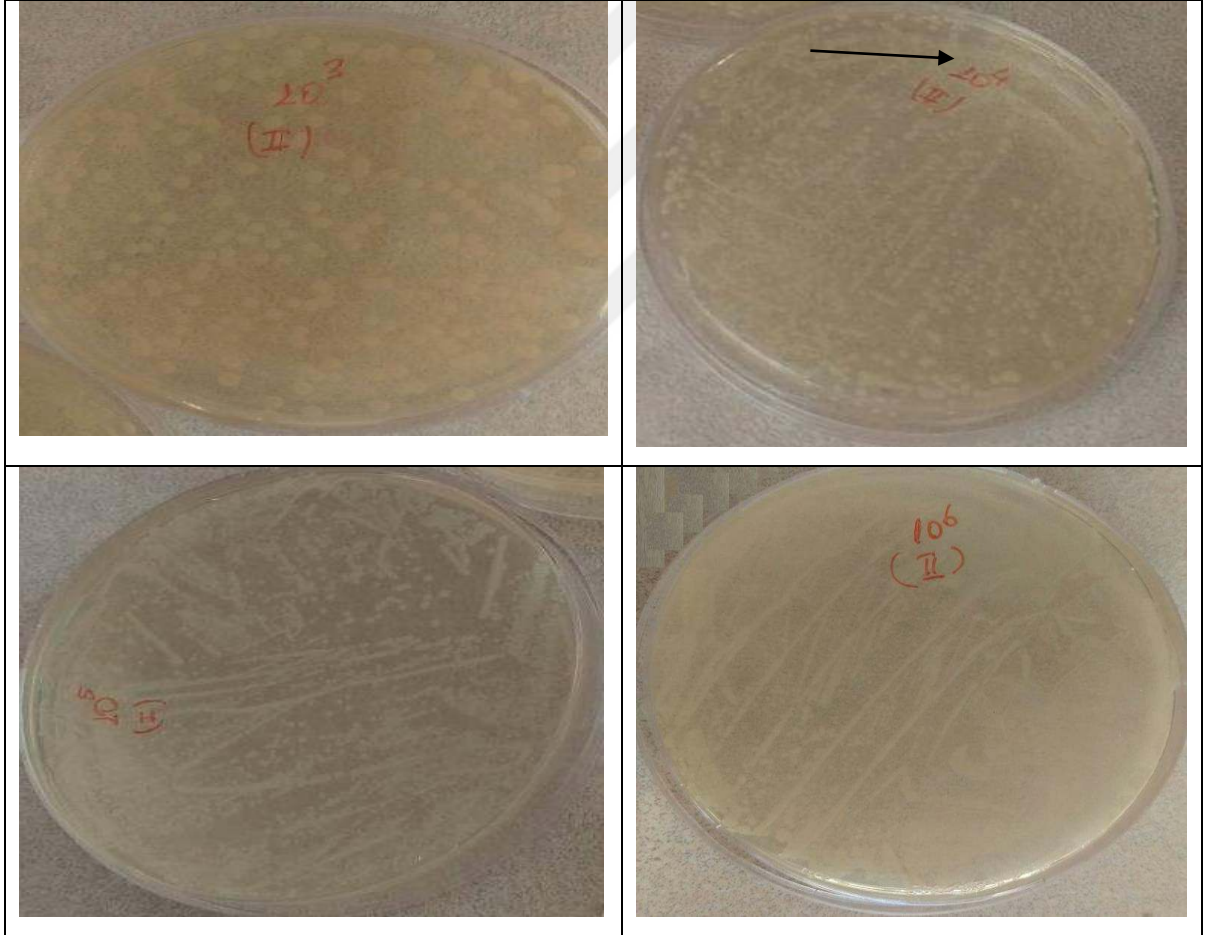


Resim 2.5. Ekim sonrası inkübasyon işlemi (Orijinal)

3. BULGULAR

3.1. Bakteri Konsantrasyonu

Çalışmamızda *Y. ruckeri*'nin ozon gazına duyarlılığı araştırıldı. Bu amaçla 0.5 McFarland bulanıklığına karşılık gelen 1.5×10^8 cfu/ml konsantrasyondan 1:10 oranında seri dilüsyonlar yapıldı ve koloni sayımları belirlendi (Resim 3.1). Elde edilen koloni sayılarına göre 10^4 dilüsyon konsantrasyonunda bakteri ozon işlemine maruz bırakma işlemi için seçildi.



Resim 3.1. Seri dilüsyon sonrası (1:10) besi yeri koloni görüntüleri (Orijinal)

Koloni sayım sonrası 10^4 dilüsyondaki bakteri konsantrasyonu 11000 cfu/ml olarak hesaplandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. *Yersinia ruckeri* konsantrasyonuna bağı koloni sayısı

<i>Yersinia ruckeri</i> konsantrasyonu (cfu/ml)	Koloni Sayısı
10^8	1.5×10^8
10^7	1.5×10^7
10^6	1.5×10^6
10^5	1.5×10^5
10^4	11000

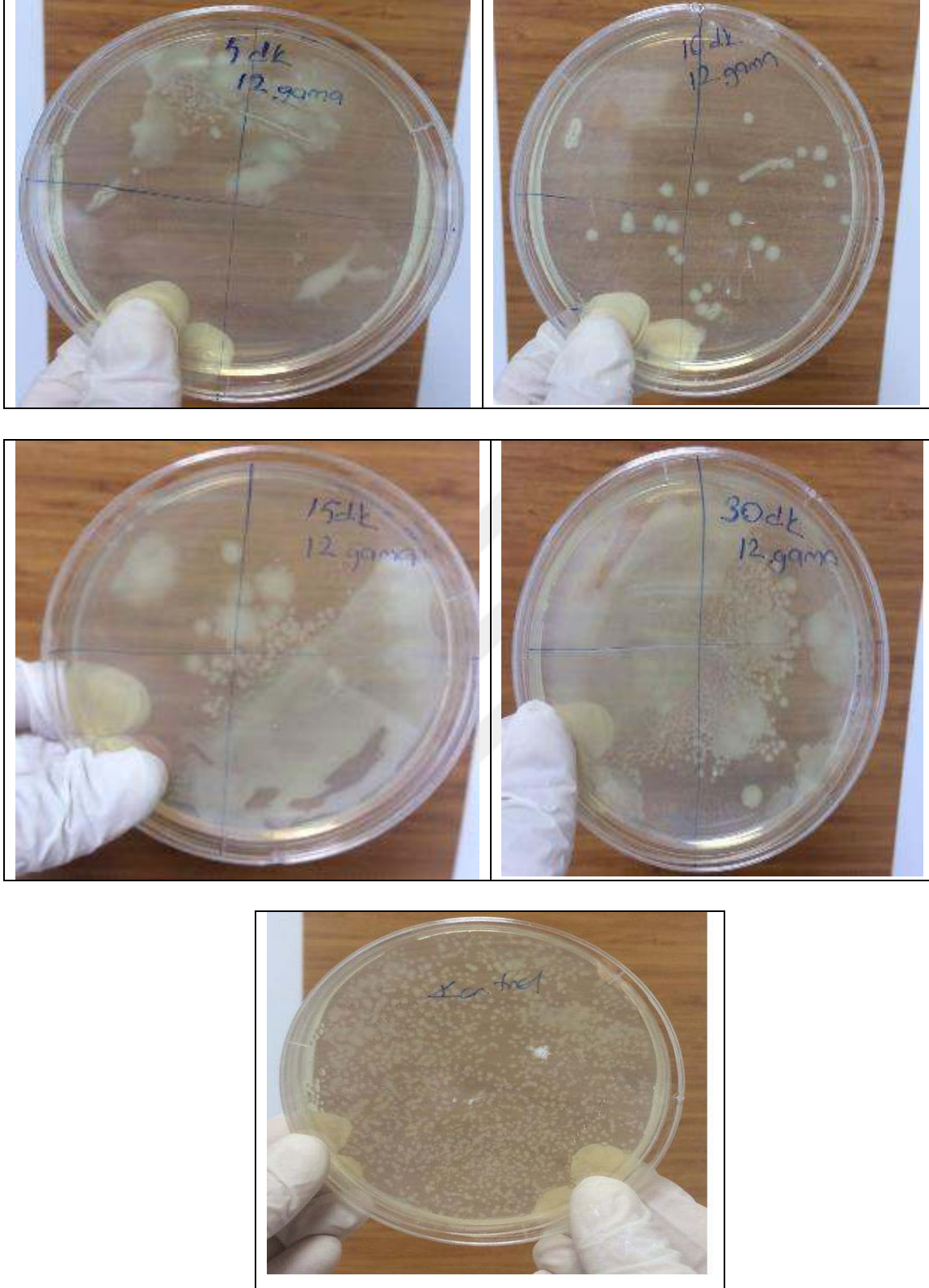
3.2. Ozonlama İşlemi

Agar plaklara ekimi gerçekleştirilen *Y. ruckeri*'nin ozon gazına duyarlı olduğu ve deneysel aşamanın ardından koloni sayılarına göre bakterisidal etkinliğini yüzdesi hesaplanarak kaydedilen azalmaların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Tablo 3.2).

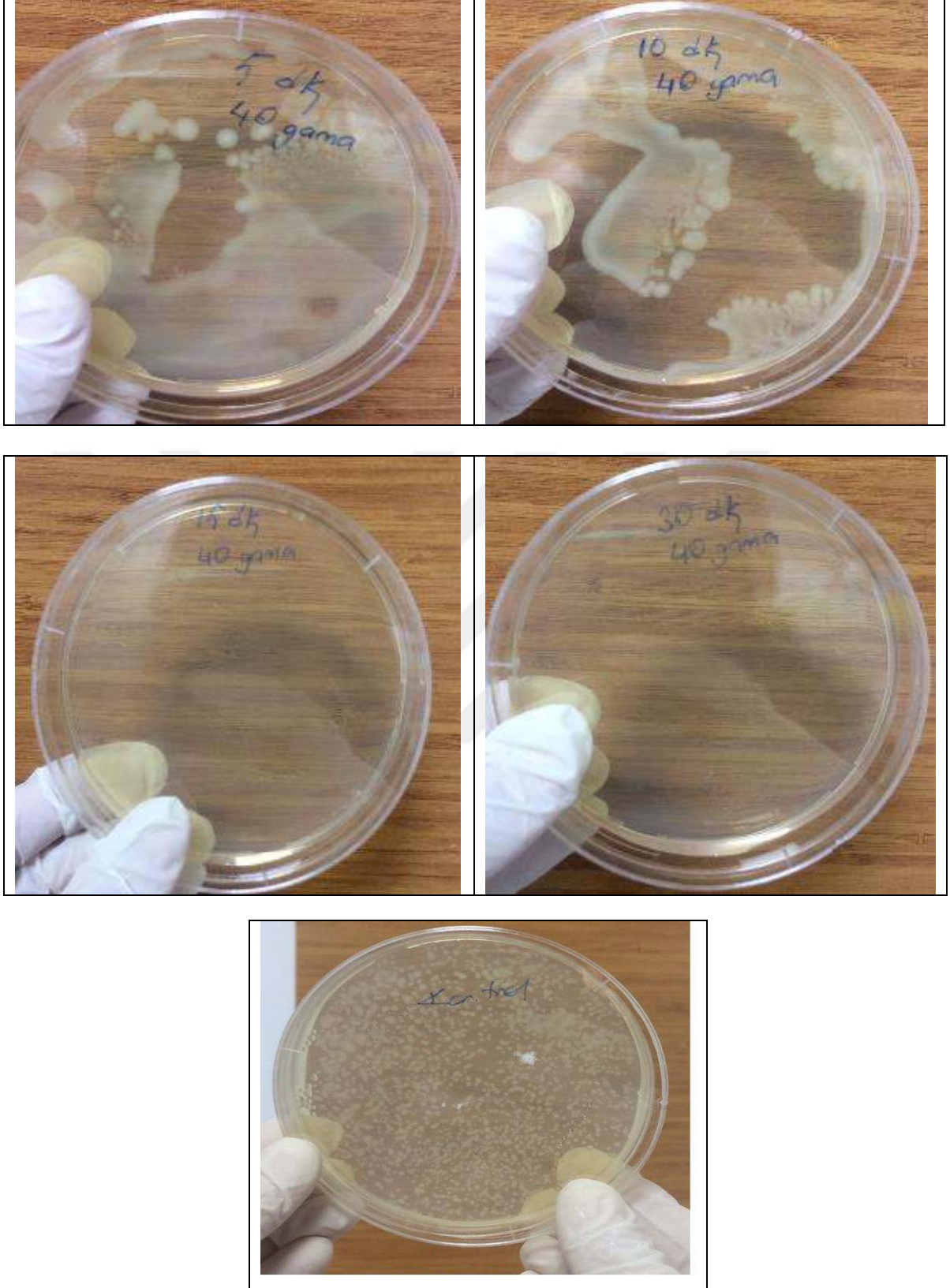
Tablo 3.2. Agar yüzeyine 10,5 mg/saat (12 ve 40 γ /ml) ozon maruziyeti ile *Y. ruckeri* koloni sayısındaki değişim (TBE: tam bakterisidal etki)

Süre (Dk)	<i>Y. ruckeri</i> (10^4 cfu/ml)	
	12 γ /ml (%)	40 γ /ml (%)
(Kontrol)	-	-
5	75	75
10	90	50
15	25	100 (TBE)
30	10	100 (TBE)

Y. ruckeri'nin 12 γ /ml ozon uygulanımı ile 5 ve 10 dk içerisinde en etkin bakterisidal etkinin sağlandığı belirlendi. Ancak ilerleyen zamanlarda ozonun etkinliğini kaybettiği gözlemlendi (Resim 3.2). Bununla birlikte 40 γ /ml ozon uygulanmasıyla bakterisidal etkinin zamana bağlı olarak arttığı ve 15 ile 30 dakikalarda bakterilerin tümünün (%100) öldüğü tespit edildi (Resim 3.3).



Resim 3.2. Bakteri süspansiyonu 10^4 dilüsyonda 12 γ /ml ozon maruziyeti uygulanan gruplar (Kontrol, 5, 10, 15 ve 30 dk) (Orijinal)



Resim 3.3. Bakteri süspansiyonu 10^4 dilüsyonda 40 γ /ml ozon maruziyeti uygulanan gruplar (Kontrol, 5, 10, 15 ve 30 dk) (Orijinal)

4. TARTIŞMA

Ozon (O_3) kararlı olmayan, depolanması zor olan, mavi renkli, kokusu keskin, havadan daha ağır üç oksijen atomuna sahip bir gazdır. Oksijenden daha ağır olan ozon suda çok daha fazla çözünme yeteneği göstermektedir. Yunancada koku yayan anlamına gelmekte ve “ozein” kelimesinden türemiştir. Güçlü bir oksitleyici etkiye sahip olan ozon florin ve persülfattan sonra üçüncü en kuvvetli oksidan ajandır. Atmosferdeki ozonun %90’ına yakını stratosfer tabakası içinde yer alır (Özler ve ark., 2009).

Birçok formda kullanım alanına sahip olan ozon en fazla tıbbi alanda kullanılmaktadır. Laboratuvar ortamında ozon özel jeneratörlerde saf oksijenin yüksek voltaj farkından geçmesi sonucu elde edilir. Jeneratör vasıtasıyla temin edilen bu gazın sadece %3 - %5’i ozondan oluşmaktadır, diğer kısım oksijenden oluşmaktadır (Bocci, 2007).

Uzun yılladır ozon ile tedavi sağlanmaktadır. Klinik uygulamalarda (viral, kronik, inflamatuvar, mantar, dejeneratif (bunama gibi), bağışıklık sistemi hastalıkları gibi) birçok hastalık için ozon terapiden faydalanılmaktadır (Bocci ve ark., 1998; Margalit ve ark., 2001; Jordan ve ark., 2002).

Etrafımızda hemen her yerde karşılaştığımız mikroorganizmaların yâda mikrobiyal büyümenin kontrolü için üç farklı metot kullanılır. Dekontaminasyon işleminde kontamine mikroorganizmalar ve potansiyel mikrobiyel nutrientler taşınır. Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların büyümesi önlenir. Dezenfeksiyon amacıyla kimyasal (ısı, filtrasyon, radyasyon) ve fiziksel (alkol, fenol, halojen, gaz, oksitleyici maddeler) işlemler ile neredeyse tüm patojenler elemine edilir (tüm mikroorganizmalar değil). Sterilizasyon ise tüm canlı mikroorganizmalar ve virüslerin eliminasyonu işlemidir. Sterilizasyon ile mikroorganizmalar lethal bir ajana maruz kaldığı anda ölür ve logaritmik olarak popülasyonları azalır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki ozon ile mikrobiyal büyümenin kontrolü sağlanabilir hatta % 99 oranında ölüm dahi gerçekleşebilir (Kowalski ve ark., 1998). Ozon virüs, mantar, mantar sporları, protozoa, bakteri ve bakteri sporlarına karşı etki gösteren güçlü, hızlı ve geniş spektrumlu bir antimikrobiyel ajandır. Ozonun sterilizasyon etme kabiliyeti diğer birçok sterilizasyon ajanlarından çok daha etkili ve hızlıdır. Herhangi bir kimyasal kalıntı, koku ve tat bırakmayan ozonun sudaki etkisi havadaki etkisinden çok daha fazla olduğu Kowalski ve ark. (1998) tarafından rapor

edilmiştir. Sudaki bakteriler üzerine ozon etkisinin çalışıldığı bir çalışmada ise 20 ppm ozon konsantrasyonun *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes*'in duyarlı olduğu raporlanmıştır (Restaino ve ark., 1995). Peeters ve ark. (1989), 2.27 ppm ozon konsantrasyonu ile 5×10^5 *Cryptosporidium parvum* ookistlerini 8 dk deneme süresine tabi tutmuşlar inaktive olduklarını bildirmişlerdir. Heindel ve ark. (1993) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, havada mevcut olan *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Arthrobacter citreus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Candida albicans* bakterileri üzerine 50 ve 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ konsantrasyon aralıklarında ozonlama işlemi uygulanmıştır. Bir saat sonunda 50-100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ konsantrasyon aralıklarında ozonlama işlemi sonrası mikroorganizma sayısında çok az bir azalma gözlenmişken; 500-600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ aralığında tüm bakteri koloni sayılarında %99 azalmalar gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacıların sonuçları göstermiştir ki gram pozitif bakterilerin gram negatiflere oranla ozon gazına daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. *Candida albicans* ise ozon gazına en duyarlı tür olduğu ozona bakterilerden daha dirençli olduğu kanıtlanıp raporlanmıştır. Arıtma amaçlı ozon kullanıma yönelik çalışmalarda ise ozonun atık su sistemlerinin dezenfeksiyonunda son derece etkili olduğu ve bakteri sayısında % 99 oranında azalmalar gözlemlendiği bildirilmiştir (Gürsoy, 2009).

Hücre zarı ve protein, DNA gibi hücresel makromoleküllerdeki yağ asitlerine zarar vererek düzensizliğe neden olan ozonun antimikrobiyal aktivitesi temelde güçlü oksitleyici etkisine dayanmaktadır (Fettner ve Ingols, 1959; Hoffman, 1971; Naitoh, 1994). Bu etki yüksek bağıl nemden dolayı özellikle havada etkilidir ki bakterinin şişmiş durumu kuru halinden çok daha hızlı bir şekilde ozon tarafından öldürülmektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki ozonun etkinliği gram pozitif bakteriler üzerinde gram negatiflerden daha fazladır (Giese ve Christenser, 1954; Scott ve Lesher, 1963; Murray ve ark., 1965). Restaino ve ark. (1995), farklı bakteri türlerine karşı ozonun antibakteriyel etkinliğin belirlemişlerdir. Araştırmacıların bulguları göstermiştir ki incelenen tüm gram negatif bakterilerin (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, ve *Yersinia enterocolitica*) inaktivasyonları arasında önemli bir fark olmadığı, fakat gram pozitif bakterilerden *Listeria monocytogenes* diğerlerinden (*Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*) daha hassas olduğunu rapor etmişlerdir.

Bakteri inaktivasyonunun sağlanmasında ozon gazı uygulaması üzerine çalışmalar incelendiğinde görülmüştür ki ilk 10 dakika içerisinde bakteri inaktivasyonu sağlanmıştır.

Streptococcus mutans ve *Lactobacillus casei* bakterileri üzerine farklı sürelerde (10-30-60 sn) ozon (2100 ppm) uygulanan çalışmada 10 sn ozonun *S. mutans*'ın koloni sayısında %73, *L. casei* ise % 64 azalmalar gözlenmiş; 60 sn'de ise tüm bakterilerde %99 inaktivite saptanmıştır (Johansson ve ark., 2009). Thanomsub ve ark. (2002) tarafından yapılan ozon gazı uygulamasında, 6,6 mg/saat ozon maruziyetinin ilk 10 dk içerisinde bütün bakterilerin ortalama bakteri konsantrasyonlarında %99.79 - %99.84 arasında azalmalar gözlemlendiği bildirilmiştir. Sürenin artmasıyla inaktivasyonun daha yavaş gerçekleştiği saptanmıştır. *Pseudomonas fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* O157:H7 gibi gıda kaynaklı bakterilerin ozona karşı etkinliğinin incelendiği bir diğer çalışmada 1,5 ppm ozon konsantrasyonunda 15 dk'lık bir uygulama süresinde tüm bakterilerin inaktive oldukları bildirilmiştir (Kim ve ark., 1999). Yaptığımız çalışmada iki farklı konsantrasyonda (12 ve 40 γ /ml) ozon gazı dört farklı süreyle (5, 10, 15 ve 30 dk) uygulanmış ve ozonun *Yersinia ruckeri* üzerine etkili olduğu gösterdiği bakterisidal etki ile belirlenmiştir. 12 γ /ml konsantrasyonda ozon gazı uygulanan grupta ilk 5 ve 10 dakika içerisinde bakterisidal etki (sırasıyla %75 ve %90) gözlenmiş fakat izleyen zamanlarda etkinliğini kaybettiği belirlenmiştir ki bu bulgular Thanomsub ve ark. (2002)'nin bulgularını desteklemektedir. Bunun aksine 40 γ /ml ozon uygulamasında zamana bağlı ozon aktivitesini sürdürmüş ve 15 ve 30 dakika sonra tam bir bakterisidal etki (%100) saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgular Kim ve ark. (1999) ve Kowalski ve ark. (1998) ile benzerlik göstermiş fakat Thanomsub ve ark. (2002)'nin çalışmalarına kısmen uyumlu olduğu görülmüştür. Ozon gazı uygulama süre farklılığı, yüksek ya da düşük bakteri konsantrasyonu, ozon bakteri inaktivasyon ilişkisinde etkili olup çalışmalar arasındaki farklılıklar bunun sonucu olabilir (Chiang ve ark., 2003). Ozon gazına maruz bırakılan *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* (10^4 cfu/ml) bakterilerinin 1 saat sonunda koloni sayımları incelenmiş tüm bakterilerin inaktive olup büyüme inhibisyonları ile sonuçlandığı raporlanmıştır (Pereira ve ark., 2005). *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacilli casei* ve *Streptococcus mutans* (NCTC 10449) bakterilerinin ozon ile muamele edilmesinden 60 saniye sonra tümünün elemine edildiği bir diğer çalışma bulgularını göstermektedir (Johansson ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda ise *Y. ruckeri*'nin ozon gazına duyarlılığı özellikle 40 γ /ml konsantrasyonda 15 ve 30 dakika içerisinde tam bir bakterisidal etki ile izlenmiştir.

Mikroorganizmaların inhibisyonunda son yıllarda kullanımı giderek artan ozon gazı uygulamaları balık yetiştiricilik ünitelerinde de işlevsel bir duruma gelmiştir. Güçlü bir

dezenfektan olmasının yanında kalıntı ve koku bırakmaması aynı zamanda mikroorganizmalar üzerine geniş spektrum özellikli olması ozon gazını avantajlı hale getirmektedir. Kararsız bir molekül olan ozon gazı O_3 bileşiminde olup mikroorganizmalar üzerinde hücre yapısını bozma, ortamdaki molekülleri oksitleme gibi etkileri bulunmaktadır ki bu etkilere bağlı olarak mikroorganizmaları yok etmektedir. Balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerinde daha çok dezenfeksiyon amaçlı kullanılan ozon son yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere balık patojen bakterileri üzerine bakteristatik ya da bakterisid etkiler göstermektedir. Bizim çalışmamızda da in vitro olarak balık çiftliklerinde önemli bir patojen olan *Y. ruckeri* bakterisi üzerine ozonun etkinliği araştırılmıştır. İki ozon konsantrasyonu denenmiş ve dört deneysel süre belirlenmiştir. Güçlü ozon konsantrasyonu (40 γ /ml) ile 15 ve 30 dakika süreler sonunda tam bir bakterisidal etki gözlenmiştir. Yapılan birçok çalışma ile uyumlu olan sonuçlarımız bazı durumlarda farklılıklar göstermiştir ki bu farklılıklar muhtemelen mikroorganizmanın ozon gazına duyarlılığı, bakterinin türü ve konsantrasyonu ve uygulanan ozon tekniği, konsantrasyonu ve uygulama süresi vb. gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, 1.5×10^4 cfu/ml bakteri konsantrasyonunda *Yersinia ruckeri* 4 farklı sürede (5 dk, 10 dk, 15 dk ve 30 dk) ozon gazına maruz bırakılarak *Y. ruckeri*'nin ozona karşı inaktivasyonu incelenmiştir. Bakterinin ozon gazına duyarlılığı 12 ve 40 γ /ml konsantrasyonuna sahip jeneratör yardımıyla belirlenmiştir. Denenen tüm sürelerde ozonun aktivasyonu sağlansa da en yüksek bakteri üreme inhibisyonu 40 γ /ml konsantrasyon ozon maruziyetinde 15 ve 30 dakikada gerçekleşmiştir. Süre ve koloni miktarlarının paralel bir seyir izlemesi diğer çalışma bulgularıyla benzerlik gösterse de ilk bakteri inaktivasyonun gözlenmesinde farklılıklar izlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmaya dâhil edilen mikroorganizmanın ozon gazına duyarlı olduğu bu çalışma ile belirlenmiştir. Balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde Yersiniozis hastalığına karşı ozonun etkinliğinin araştırılması ve tedavi stratejisi olarak değerlendirilebilmesi için daha detaylı çalışmalara yer verilmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D.,** 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1103-1113.
- Alvarez, J.D., Austin, B., Conroy, D.A.,** 1992. First outbreak of Enteric redmouth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) cultured in Venezuela. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 189-190.
- Andersen, S.O., Sarma, K.M.,** 2002. Protecting the Ozone Layer: The United Nations History. London, UK: Earthscan Press (official publication of the United Nations Environment Programme).
- Anonim,** 2000. Ülkemiz su ürünleri sektörünü geliştirme stratejileri. T.C., Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Yayın No:8, Ankara, 54s,
- Anonim,** 2008. Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü'nün 2008 üretim verileri, Yayımlanmamış Rapor, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Ankara.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıyüpoğlu, M.,** 2002. Balık Hastalıkları, Medisan Yayın Serisi No: 56, pp:60-61, Ankara.
- Austin, B.,** 1983. Effectiveness of ozone for the disinfection of laboratory effluent. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 19: 211-214.
- Baysan, A., Lynch, E.,** 2004. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am. J.Dent.*, 17:56-60.
- Bocci, V., Valacchi, G., Corradeschi, F., Aldinucci, C., Silvestri, S., Paccagnini, E.,** 1998. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *J Biol Regulat Homeost Agents*, 12(3): 67-75.
- Bocci, V.A.,** 2006. Scientific and medical aspects of ozone therapy: state of the art. *Arch Med Res* 37: 425-35.
- Bocci, V.A.,** 2007. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Arch. Med. Res.*, 38(2): 265-67.
- Brazil, B.L.,** 1996. Impact of ozonation on system performance and growth characteristics of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) and tilapia hybrids (*Sarotherodon* sp.) reared in recirculating aquaculture systems. *Phd Thesis*,

Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, USA.

Broadwater, W.T., Hoehn, R.C., King, P.H., 1973. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl. Microb.* 26: 391-393.

Bullock, G.L., Stuckey, H.M., Shotts, E.B., 1978. Enteric redmouth bacterium: Comparison of isolates from different geographical areas. *J. Fish Dis.*, 1: 351-354.

Bullock, G.L., Summerfelt, S.T., Noble, A., Weber, A.W., Durant, M.D., Hankins, J.A., 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system: I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. *Aquaculture*, 158: 43-55.

Burke, L.E., Dunbar-Jacob, J.M., Hill, M.N., 1997. Compliance with cardiovascular disease prevention strategies: a review of the research. *Annals of Behavioral Medicine*, 19:239-263.

Cengizler, İ., 2000. Balık Hastalıkları Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, Yayın No:7, 17s, Adana.

Chiang, C.F., Tsai, C.T., Lin, S.T., Huo, C.P., Lo, K.V., 2003. Disinfection of hospital wastewater by continuous ozonization. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 38 (12): 2895-908.

Colberg, P.J., Lingg, A.J., 1978. Effect of ozonation on microbial fish pathogens, ammonia, nitrate, nitrite and BOD in simulated reuse hatchery water. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35: 1290-1296.

Conrad, J.F., Holt, R.A., Kreps, T.D., 1975. Ozone disinfection of flowing water. *Prog. Fish-Cult.*, 37: 134-136.

De Fabo, E.C., 2000. Stratospheric ozone depletion : UVB “effects”, the neglected aspect. *Int J Circumpolar Health.*, 59: 2-3.

DeGrandis, S.A., Stevenson, R.M., 1985. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrob Agents Chemother*, 27: 938-942.

Emre, Y., Kürüm, V., 1998. Havuz ve Ağ kafeslerde Alabalık Yetiştiricilik Teknikleri. Ankara.

Fetner, R., Ingols, R., 1959. Bactericidal Activity of ozone and chlorine against *Escherichia coli* at 1 °C. *Ozone Chemistry and Technology, Advances in Chemistry Series*, 21: 370-374.

Giese, A.C., Christensen, E., 1954. Effects of ozone on organisms. *Physiol. Zool.*, 27: 101-105.

Greene, A.K., Few, B.K., Serafini, J.C., 1993. A Comparison of Ozonation and Chlorination for the Disinfection of Stainless Steel Surfaces. *Journal of Dairy Science*, 76: 3617-3620.

- Gürsoy, N.C.,** 2009. Negatif İyon Ve Ozon Uygulamasının Çeşitli Bakteriler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Soğutma Kulesi Ve Hastane Atık Sularının Dezenfeksiyonunda Kullanımının Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Malatya.
- Heindel, T.H., Streib, R., Botzenhart, K.,** 1993. Effect of ozone on airborne microorganisms. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 194(5-6): 464-480.
- Hill, J.E., Nico, L.G., Cichra, C.E., Gilbert, C.R.,** 2005. Prey vulnerability to peacock cichlids and largemouth bass based on predator gape and prey body depth. *Proceedings of the Annual Conference Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies*, 58(2004): 47– 56.
- Hinze, H., Prakash, D., Holzer, H.,** 1987. Effect of ozone on ATP cytosolic enzymes and permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 147: 105 108.
- Hoffman, R.,** 1971. Inhibition and destruction of the Microbial Cell. Ozone. Acaemic Press, pp 251-253, London.
- Horne, M.T., Barnes, A.C.,** 1999. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In *fish diseases and disorders*, eds Woo, P.T.K., Bruno, D.W. Vol 3. Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, p 455–477, Wallingford.
- Johansson, E., Claesson, R., Van Dijken, J.W.V.,** 2009. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent.*, 37(6): 449-53.
- Jordan, L., Beaver, K., Foy, S.,** 2002. Ozone treatment for radiotherapy skin reactions: Is there an evidence base for practice? *Eur J Oncol Nurs.*, 6 (4): 220-7.
- Joseph Mcfarland, M.D.,** 1907. The nephelometer:an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA*. 1907;xlix(14):1176-1178. doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f.
- Khadre, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.G.,** 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Sciences*, 66 (9): 1242-1252.
- Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S.,** 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J. Food Prot.*, 62 (9): 1071-87.
- Kirkan, S., Goksoy, O.E., Kaya, O., Tekbiyik, S.,** 2006. In-vitro antimicrobial susceptibility of pathogenic bacteria in rainbow trout (*O. mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30: 337-341.
- Kowalski, W., Bahnfleth, W., Whitam, T.,** 1998. bactericidal effects of high airborne ozone concentrations on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ozone Science and Engineering*, 20: 205-221.

- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırkan, Ş., Sekkin, S.,** 2004. Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 75 (3): 47-53.
- Leh, F.,** 1973. Ozone, Properties, toxicity, and applications. *J. Chem Ed.*, 50: 404-405.
- Liltved, H., Hektoen, H., Efraimsen, H.,** 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. *Aquacult. Eng.*, 14: 107-122.
- Margalit, M., Attias, E., Attias, D., Zimran, A., Matzner, Y.,** 2001. Effect of ozone on neutrophil function in vitro. *Clin Lab Haematol*, 23(4): 243-7.
- Mudd, J.B., Levitt, R., Ongun, A., McManus, T.T.,** 1969. Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos Environ.*, 3: 669-682.
- Murray, R.G.E., Steed, P., Elson, H.E.,** 1965. The location of mucopeptide of selection of the cell wall of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 11: 547-560.
- Naitoh, S.,** 1994. Inhibition of food spoilagefungi by application of ozone. *Journal of Food Microbiology*, 11: 11-17.
- Otte, G., Rosenthal, H.,** 1979. Management of a closed brackish water system for high density fish culture by biological and chemical treatment. *Aquaculture*, 18:169-181.
- Owsley, D.E.,** 1991. Ozone for disinfecting hatchery rearing water. In *proceedings of the american fisheries society symposium*, eds. Colt, J., White, R.J., American Fisheries Society, Bethesda, pp. 417-420, Maryland.
- Özler, M., Öter, Ş., Korkmaz, A.,** 2009. Ozon gazının tıbbi amaçlı kullanılması. *TAF Prev Med Bull.*, 8(1):59-64.
- Pereira, M.M.S., Navarini, I.I.A., Lúcia, M.J., Pacheco, A.M., Silva, R.A.,** 2005. Effect of different gases on bacterial growth. Experimental study "in vitro". *Rev Col Bras Cir.* 32: 1-10.
- Peeters, J.E., Mazas, E.A., Masschelein, W.J., Martinez de Maturana, I.V., Debacker, E.,** 1989. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.*, 55 (6): 1519-1522.
- Pryor, W.A.,** 1992. How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts. *Free Radical Biology & Medicine*, 12: 83-88.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J. B., Palnikar, P.,** 1995. Efficacy of ozonated water against various foodrelated microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9): 3471-3475.

- Sako, H., Sorimachi, M.,** 1985. Susceptibility of fish pathogenic viruses, bacteria and fungus to ultraviolet irradiation and the disinfectant effect of U.V.-ozone water sterilizer on the pathogens in water. *Bull natn. Res. Inst. Aquacult.*, 8: 51-58.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersone, K., Larsen, J.L.,** 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4908- 4915.
- Scott, D.B.M., Leshner E.C.,** 1963. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 85: 567 576.
- Subaşı, İ.,** 2008. hilminamli.balikesir.edu.tr
- Suffet, I.H., Anselme, C., Mallevialle, J.,** 1986. Removal of Tastes and Odors by Ozonation. AWWA Seminar on Ozonation: Recent Advances and Research Needs, Denver, CO.
- Summerfelt, S.T., Bebak-Williams, J., Fletcher, J., Carta, A., Creaser, D.,** 2008. Description of the surface water filtration and ozone treatment system at the Northeast Fishery Center. Pa in Amaral, S.V., Mathur, D., Taft III, E.P. (Eds.), *Advances in Fisheries Bioengineering*. American Fisheries Society, Symposium 61, Bethesda, MD, pp. 97–121, USA.
- Summerfelt, S.T., Hankins, J.A., Weber, A.L., Durant, M.D.,** 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system. II. Effects of microscreen filtration and water quality. *Aquaculture*, 158: 57–67.
- Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R., Srisukonth, C.,** 2002. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen Appl Microbiol.*, 48: 193 199.
- Timur, G., Timur, M.M.,** 1991. An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 11: 181-182.
- U.S. Environmental Protection Agency.,** 1999. The Facts Speak for Themselves: A Fundamentally Different Superfund Program." Washington: U.S. Environmental Protection Agency.
- Wedemeyer, G.A., Nelson, N.C.,** 1977. Survival of two bacterial fish pathogens (*Aeromonas salmonicida* and the enteric redmouth bacterium) in ozonated, chlorinated and untreated water. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 429-432.
- Wedemeyer, G.A., Nelson, N.C., Smith, C.A.,** 1978. Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis (ihnv) and infectious pancreatic necrosis (ipnv) in ozonated, chlorinated, and untreated waters. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1978, 35(6): 875-879, 10.1139/f78-140.

ÖZGEÇMİŞ

Erciş'te 01.07.1986 yılında doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin'de tamamladı. Adıyaman Üniversitesi Kâhta Meslek Yüksek Okulu Su ürünleri Programı'ndan Haziran 2011'de mezun oldu. Munzur Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliğinden 2013 yılında Su Ürünleri Mühendisi Unvanı ile mezun oldu. Şubat 2014' te Munzur Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

