

Balıklardan İzole Edilen Bazı Bakteriyel Patojenlere Karşı Tannik Asitin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi^[*]

Fikri BALTA^{1*} Neşe TEKİN²

¹Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı, 53100, Rize, Türkiye

²Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Rize, Türkiye

Geliş/Received: 05.10.2021

Kabul/Accepted: 30.11.2021

Yayın/Published: 31.12.2021

Atf yapmak için: Balta, F. & Tekin, N. (2021). Balıklardan izole edilen bazı bakteriyel patojenlere karşı tannik asitin antibakteriyel etkisinin belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 6(4), 532-539.

How to cite: Balta, F. & Tekin, N. (2021). Determination of antibacterial effect of tannic acid against some bacterial pathogens isolated from fish. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 6(4), 532-539.

*ID: <https://orcid.org/0000-0002-1823-5823>
ID: <https://orcid.org/0000-0001-9734-9871>

****Sorumlu yazarın:**

Fikri BALTA
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Anabilim Dalı, Fener Mah. 53100/Rize, Türkiye
✉: fikri.balta@erdogan.edu.tr

Öz: Bu çalışmada, bitkilerden doğal ekstraksiyon işlemiyle elde edilen ve su ürünleri yetiştiriciliğinde tatlandırıcı yem katkı maddesi olarak kullanılan Silvafeed TSP'nin (tannik asit) *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* ve *Escherichia coli*'ye (ATCC 25922) karşı antimikrobiyal etkinliği agar well difüzyon ve minimal inhibisyon konsantrasyon testi (MİK) ile araştırıldı. Agar well difüzyon testinde, *A. hydrophila*, *E. coli* ve *Y. ruckeri* izolatlarının 12,5 µg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlara duyarlı iken, *P. fluorescens* ve *V. anguillarum* izolatlarının 6,25 µg/ml'nin üzerindeki tannik asit konsantrasyonlarına hassas olduğu belirlendi. Disk difüzyon testinde *P. fluorescens*'in gentamisin ve doksisisiklin hariç çalışmada kullanılan diğer antimikrobiyel ajanlara karşı dirençli olduğu, *A. hydrophila*, *E. coli*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri*'nin ise ampisilin hariç çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere karşı hassas olduğu tespit edildi. Bu çalışmada, *P. fluorescens* izolatının florfenikol (FFC)'ün 200 µg/ml hariç bütün konsantrasyonları ve *E. coli* izolatının sadece FFC'nin 3,125 µg/ml konsantrasyonuna dirençli olduğu tespit edildi. Fakat, doksisisiklinin beş bakteri izolatına karşı duyarlı olduğu belirlendi. Tannik asitin 6,25 µg/ml konsantrasyonuna *P. fluorescens* ve *V. anguillarum* dirençli iken, 12,5 µg/ml konsantrasyonu ise *E. coli*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri*'nin dirençli olduğu belirlendi. Tannik asitin MİK değeri; *E. coli* için 187,5 µg/ml, *A. hydrophila* için 250 µg/ml, *P. fluorescens* için 31,25 µg/ml, *V. anguillarum* 375 µg/ml ve *Y. ruckeri* için 125 µg/ml olarak belirlendi. *P. fluorescens* izolatı için florfenikolün MİK değerleri belirlenemezken; *E. coli*, *A. hydrophila*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri* için sırasıyla, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 12,5 µg/ml ve 50 µg/ml olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Akuakültür, antimikrobiyal hassasiyet, MİK, tannik asit, tedavi.

Determination of Antibacterial Effect of Tannic Acid Against Some Bacterial Pathogens Isolated from Fish

Abstract: In this study, the antimicrobial activity was investigated Silvafeed TSP (tannic acid) obtained by natural extraction from plants and used as a flavoring feed additive in aquaculture, against *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* and *Escherichia coli* (ATCC 25922). For this purpose, agar well diffusion and minimal inhibition concentration (MIC) tests were used. In the agar well diffusion test, it was determined that *A. hydrophila*, *E. coli* and *Y. ruckeri* isolates were sensitive to concentrations above 12,5 µg/ml, while *P. fluorescens* and *V. anguillarum* isolates were sensitive to tannic acid concentrations above 6,25 µg/ml. In the disc diffusion test, it was determined that *P. fluorescens* was resistant to other antimicrobial agents used in the study except gentamicin and doxycycline, and *A. hydrophila*, *E. coli*, *V. anguillarum* and *Y. ruckeri* were sensitive to other antibiotics used in the study except ampicillin. In this study, it was determined that the *P. fluorescens* isolate was resistant to all concentrations of florfenicol (FFC) except 200 µg/ml and the *E. coli* isolate was resistant only to the 3.125 µg/ml concentration of FFC. However, doxycycline concentrations were determined to be sensitive to five bacterial isolates. It was determined that *P. fluorescens* and *V. anguillarum* were resistant to the 6.25 µg/ml concentration, while *E. coli*, *A. hydrophila* and *Y. ruckeri* were resistant to the 12.5 µg/ml concentration of tannic acid. The MIC values of tannic acid for *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *V. anguillarum* and *Y. ruckeri* were determined as 187,5 µg/ml, 250 µg/ml, 31.25 µg/ml, 375 µg/ml and 125 µg/ml, respectively. While MIC values of florfenicol could not be determined for *P. fluorescens* isolate; It was determined as 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 12.5 µg/ml and 50 µg/ml for *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *V. anguillarum* and *Y. ruckeri*, respectively.

***Corresponding author's:**

Recep Tayyip Erdoğan University, Faculty of Fisheries, Department of Diseases, Fener Mah. 53100/Rize, Turkey
✉: fikri.balta@erdogan.edu.tr

Keywords: Antimicrobial susceptibility, aquaculture, MIC, tannic acid, treatment.

[*] Bu çalışma, Neşe TEKİN'in yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the master thesis prepared by Neşe TEKİN.

GİRİŞ

İntensif gökkuşağı alabalık yetiştiriciliğinde artan tüketici taleplerini karşılamak için her geçen gün üretimdeki artışa bağlı olarak balık hastalık sorunları ile sıklıkla karşılaşmaktadır. Gökkuşağı alabalık yetiştiriciliğinde havuzlarda aşırı stok yoğunluğu bakteriyel balık hastalıklarının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu hastalıkların erken teşhisinin ve tedavisinin yapılmaması durumu, toplu ölümler görülebilmekte ve bu nedenle işletmelerde ekonomik yönden büyük kayıpların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Bu durum akuakültürde sürdürülebilir üretimi önemli ölçüde etkilemektedir. Balıklardan görülen bakteriyel hastalıkların tedavisi genellikle, antibiyogram test sonuçlarına göre yapılmaktadır. Test sonucuna göre en etkili ve ucuz olan antibiyotik tercih edilmektedir. Son yıllarda; akuakültürde kullanılan antibiyotiklere karşı kazanılan direnci ve insan sağlığı açısından antibiyotik kalıntı problemlerini ortadan kaldırmak amacıyla organik balık yetiştiriciliğinde alternatif olarak kullanılabilir doğal bitkisel kökenli (kestane ağacı) bir yem katkı maddesi olan silvafeed (tannik asit) kullanılması düşünülmüştür. Silvafeed ekşimsi tatta, kahverengi renkte, toz formunda, minimum %75 polifenol içeriğine sahip olan ve maksimum %8 rutubet stoklanmış bir tanen (tannik asit) bileşimidir (http, 2021).

Tanenlerin (tannik asitler), antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antiparazitik aktiviteler gibi önemli biyolojik özelliklere sahip suda çözünebilen polifenolik bileşikler grubu kimyasal maddeler olduğu rapor edilmiştir (Pérez-Fonseca vd., 2016). Tanenlerin çeşitli bitkilerin kabukları, meyveleri, yaprakları ve kökleri gibi farklı kısımlarında yaygın olarak buldukları bildirilmiştir (EL-Hefny vd., 2017). Tanenlerin hidrolize olabilen ve kondanse (yoğunlaştırılmış) olabilen iki farklı tipleri bulunmaktadır. Tanenlerin başlıca görevlerinin proteinleri ve diğer makromolekülleri bağlama ve çökeltme olduğu bildirilmiştir (Brooker vd., 1994). Mide-bağırsak sistemi bakterilerinin tanenleri ve tannik asit-protein komplekslerini parçalayabildikleri veya tolere edebildikleri rapor edilmiştir. Ayrıca, hidrolize olabilen tanenlerin (tannik asit), hayvanlar ve rumen mikroorganizmaları için toksik etki meydana getirdiği bildirilmiştir (Brooker vd., 1994; Salem vd., 2010; Bae vd., 1993). Tanenlerin inhibitör etkisinin bakterilerin hücre duvarında fonksiyon bozukluğu meydana getirmesine, enzim aktivitesini azaltılmasına, metal iyonları (demirle şelasyon oluşturarak) ve minerallerin yoksunluğuna bağlı olarak gösterdiği bildirilmiştir (Goel vd., 2005; Cipriano-Salazara vd., 2018).

Bu çalışmada, Karadeniz bölgesindeki gökkuşağı alabalığı üretim çiftliklerinde hastalık epizootilerinde en çok rastlanılan ve izole edilen Gram negatif bakterilerden olan *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* izolatlarına karşı silvafeed'in (tannik asit) antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERIAL AND METHOD

Silvafeed TSP (Tannik Asit), Doksisisiklin ve Florfenikol Stok Solüsyonlarının Hazırlanması: Bu çalışmada kullanılan Silvafeed TSP, Profeed Gıda ve Kim. Mad. San. Tic. Ltd. Şti. şirketinden ücretsiz olarak temin edildi. Silvafeed TSP, bitkilerden doğal ekstraksiyon işlemleri kullanılarak elde edilen suda çözünür toz şeklindeki ticari bir üründür. Silvafeed'in antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi amacıyla öncelikle, 0,2 ve 0,3gr Silvafeed 100 ml saf suda ayrı ayrı çözdürülerek stok solüsyonları hazırlandı. Hazırlanmış olan bu stok solüsyonlarından 20 ml cam şişeler içerisinde 2 katlı ve 10 katlı dilüsyonları hazırlanarak çalışmada test edilecek konsantrasyonlar hazırlandı. Doksisisiklin (Medox %50 Toz-Medicated) ve florfenikol'ün (Florfish %50 Toz-Medicated) her birinden 0,4'er gr tartıldı. Balon jodede (100 ml) %2'lik 0,1M HCl içeren metanol çözeltisinde manyetik bir bar yardımıyla manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildi. Hazırlanan stok solüsyonları steril 0,45 µm'lik membran flitre (Merck-Millipore) yardımı ile steril edildi. Tannik asit'in (0,2 gr'dan hazırlanmış) dilüsyonları ve konsantrasyonları Tablo 1'de verildi.

Tablo 1. Tannik asitin iki katlı seri dilüsyonlarının konsantrasyonları.

Table 1. Concentrations of two-fold serial dilutions of tannic acid.

Tüpler	Tannik asitin iki katlı seri dilüsyonları	Konsantrasyonu
1.	1 ml → 2 mg (=2000 µg)	2000 µg TA
2.	1 ml 2000 µg TA + 1 ml steril su	1000 µg TA
3.	1 ml 1000 µg TA + 1 ml steril su	500 µg TA
4.	1 ml 500 µg TA + 1 ml steril su	250 µg TA
5.	1 ml 250 µg TA + 1 ml steril su	125 µg TA
6.	1 ml 125 µg TA + 1 ml steril su	62,5 µg TA
7.	1 ml 62,5 µg TA + 1 ml steril su	31,25 µg TA
8.	1 ml 31,25 µg TA + 1 ml steril su	15,625 µg TA
9.	1 ml 15,625 µg TA + 1 ml steril su	7,8125 µg TA
10.	1 ml 7,8125 µg TA + 1 ml steril su	3,90625 µg TA
11.	0,1 M HCl içeren metanol	Kontrol

Hazırlanan stok 0,4 gr %50'lik florfenikol ve 0,4 gr %50'lik doksisisiklin antibiyotik çözeltileri %50'lik olduğu için 1 ml'sinde 2 mg (= 2000 µg) etken madde bulunmaktadır. Florfenikol ve doksisisiklinin iki katlı seri dilüsyonlarının konsantrasyonları aşağıdaki gibi hesaplandı ve Tablo 2'de verildi.

Tablo 2. Florfenikol ve doksisisiklinin iki katlı seri dilüsyonlarının konsantrasyonları.**Table 2.** Concentrations of serial two-fold dilutions of florfenicol and doxycycline.

Tüpler	DO ve FFC'ün iki katlı seri dilüsyonları	Konsantrasyonu
1.	1 ml → 1 mg (=2000 µg)	2000 µg
2.	1 ml 2000 µg + 1 ml steril su	1000 µg
3.	1 ml 100 µg + 1 ml steril su	500 µg
4.	1 ml 500 µg + 1 ml steril su	250 µg
5.	1 ml 250 µg + 1 ml steril su	125 µg
6.	1 ml 125 µg + 1 ml steril su	62,5 µg
7.	1 ml 62,5 µg + 1 ml steril su	31,25 µg
8.	1 ml 31,25 µg + 1 ml steril su	15,625 µg
9.	1 ml 15,625 µg + 1 ml steril su	7,8125 µg
10.	1 ml 7,8125 µg + 1 ml steril su	3,90625 µg
11.	0,1 M HCl içeren metanol + 1 ml steril su	Kontrol

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar:

Çalışmada Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalığı çiftliklerinden daha önceki çalışmalarda izole ve identifiye edilmiş olan *A. hydrophila*, *P. fluorescens* (P73), *V. anguillarum* (V976) ve *Y. ruckeri* izolatları kullanıldı (Balta vd., 2010; Balta, 2016; Balta & Dengiz Balta, 2016; Balta & Dengiz Balta, 2017; Kacar & Balta, 2017, Balta, 2020). Tüm izolatlar kullanılmaya kadar -80°C'de %1,5 gliserol içeren besi yerinde muhafaza edildi. Ayrıca, Silvafeed'in etkinliğinin belirlenmesi amacıyla *E. coli* (ATCC 25922) suşu kullanıldı. Çalışmada test edilen bakteri izolatları ve kökenleri Tablo 3'de verildi.

Tablo 3. Bakteri türleri ve kökenleri.**Table 3.** Bacteria species and origins.

No	Bakteri Türü	Köken
1	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
2	<i>A. hydrophila</i>	Alabalık-Rize
3	<i>P. fluorescens</i>	Alabalık-Rize
4	<i>V. anguillarum</i>	Alabalık-Rize
5	<i>Y. ruckeri</i>	Alabalık-Trabzon

Agar Well Difüzyon Testi: Silvafeed TSP, doksosillin ve florfenikol'ün antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde Arret vd., 1971'de kullanıldığı metot modifiye edilerek kullanıldı (Balta, 1999; Balta & Çağırğan, 2007; Balta & Çağırğan, 2010). Bu amaçla Antibiyotik Medium No: 2 yerine Mueller Hinton Agar (MHA-Merck) kullanıldı. *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens* ve *Y. ruckeri* mikroorganizmaları için normal MHA ve *V. anguillarum* için ise tuzlu MHA kullanıldı. Hazırlanan besi yerleri üzerine steril porselen boncuklar kullanılarak kuyucuklar açıldı. Daha sonra mikroorganizmaların bir gecelik taze kültürlerinden fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içerisine McFarland 0,5'e göre süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanmış olan süspansiyonlardan 1'er ml alınarak besiyerlerine yayma tarzında ekimleri yapıldı. Daha önceden hazırlanan stok tannik asit, doksisisiklin ve florfenikol solüsyonlarından hazırlanan farklı konsantrasyondaki dilüsyonların her birinden otomatik pipet yardımı ile 100 µl alınarak 3'er paralel olmak üzere kuyucuklara ilave edildi. Kontrol olarak 1 kısım metanol (%2'lik 0,1M HCl içeren) + 1 kısım steril saf su içeren dilüsyondan 3 paralel olmak üzere

100 µl miktarında kuyucuklara ilave edildi. Farklı konsantrasyonlardaki tannik asit, doksisisiklin ve florfenikol ilave edilmiş 6 kuyucuklu besiyerleri 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonun sonrasında her bir kuyucuğun etrafında oluşan bakterinin üremediği zon çapları dijital kompas yardımı ile ölçülerek değerlendirildi.

Disk Difüzyon Testi: Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Kirby-Bauer disk difüzyon (1959-1960) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla çalışmada kullanılan her bir bakteri izolatın ve standart suşun bir gecelik subkültürleri FTS içerisine alınarak yoğunlukları Mc Farland No 0,5'e göre ayarlandı. Daha sonra hazırlanmış olan bakteriyel süspansiyonlardan 0.1 ml alınarak MHA'ya ekildi. Ekim sonrası petripler 30 dk oda sıcaklığında bırakıldı ve bu süre sonunda agar yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirildi. Çalışmada ampisilin (10 µg), gentamisin (10 µg), doksisisiklin (30 µg), enrofloksasin (5 µg), oksitetrasiklin (30 µg) sulfamethoksazol (100 µg) ve trimetoprim/sulfamethakzol (1.25/23.75 µg) olmak üzere 8 farklı antibiyotik diski (Bioanalyse) kullanıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirilen petripler 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası antibiyotik diskleri etrafında oluşan bakterinin üremediği inhibisyon zon çapları dijital kumpas yardımı ile ölçüldü (NCCLS, 1993).

Minimal İnhibe Edici Konsantrasyonun (MİK)

Belirlemesi: Testte kullanılacak tannik asit ve florfenikol'ün stok çözeltisi hazırlanırken 100'er ml %2'lik HCl (Merck) içeren metanol solüsyonu kullanıldı. Hassas terazide 0,2 ve 0,3 gr tannik asit ve 0,4 gr florfenikol tartılarak 100 ml'lik balonjojede %2'lik 0,1M HCl içeren metanol çözeltisinde çözdürüldü. Stok solüsyonlar steril 20 ml şişelere 5'er ml olarak bölündü. *E. coli*, *A. hydrophila*, *P. fluorescens* ve *Y. ruckeri* TSB'de ve *V. anguillarum* %1,5 tuz ilave edilmiş TSB'de 25°C'de 18 saat inkübe edilerek üretildi. Üretilen kültürden kontrol grubu hariç her bir tüpe 10 µl (10⁸ cfu/ml) eklendi. Tüpler 25°C'de 24 saat inkübe edildi. Tannik asit ve florfenikol her bir konsantrasyonu için iki tüp paralel olarak çalışıldı. Bakterilerin üremediği tüplerdeki kimyasal maddenin en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edildi (Beşe, 1989).

Önceden steril edilen tannik asit stok solüsyonu Mueller Hinton Broth'da (MHB) iki katlı seri dilüsyonları gerçekleştirildi. Mueller Hinton Broth'da tannik asit MİK değerlerini belirlemek için hazırlanan iki katlı seri dilüsyonların farklı konsantrasyonları Tablo 4'de verildi.

Florfenikol 1 ml'sinde 2000 µg olduğu için ilk önce 10 katlı dilüsyonu yapılarak içindeki etken madde miktarı 200 µg'a düşürüldü. Mueller Hinton Broth'da florfenikolün MİK değerlerini belirlemek için hazırlanan iki katlı seri dilüsyonların farklı konsantrasyonları Tablo 5'de verildi.

Tablo 4. MİK değerleri için tannik asitin farklı konsantrasyonları.
Table 4. Different concentrations of tannic acid for MIC values.

Tüpler	Tannik asit iki katlı seri dilüsyonları	Konsantrasyonu
1.	1 ml MHB + 1 ml (3000 µg TA)	1500 µg
2.	1 ml MHB + 1 ml (2000 µg TA)	1000 µg
3.	1 ml MHB + 1 ml (1500 µg TA)	750 µg
4.	1 ml MHB + 1 ml (1000 µg TA)	500 µg
5.	1 ml MHB + 1 ml (750 µg TA)	375 µg
6.	1 ml MHB + 1 ml (500 µg TA)	250 µg
7.	1 ml MHB + 1 ml (375 µg TA)	187,5 µg
8.	1 ml MHB + 1 ml (250 µg TA)	125 µg
9.	1 ml MHB + 1 ml (187,5 µg TA)	93,75 µg
10.	1 ml MHB + 1 ml (125 µg TA)	62,5 µg
11.	1 ml MHB + 1 ml (62,5 µg TA)	31,25 µg
12.	1 ml MHB + 1 ml (46, 875 µg TA)	23,44 µg
13.	1 ml MHB + 1 ml (31,25 µg TA)	15,625 µg
14.	1 ml MHB + %2 HCl içeren metanol	Kontrol

Tablo 5. MİK değerleri için florfenikolün farklı konsantrasyonları.
Table 5. Different concentrations of florfenicol for MIC values.

Tüpler	Florfenikolün iki katlı seri dilüsyonları	Konsantrasyon
1.	1 ml MHB + 1 ml (200 µg FFC)	100 µg
2.	1 ml MHB + 1 ml (100 µg FFC)	50 µg
3.	1 ml MHB + 1 ml (50 µg FFC)	25 µg
4.	1 ml MHB + 1 ml (25 µg FFC)	12,5 µg
5.	1 ml MHB + 1 ml (12,5 µg FFC)	6,25 µg
6.	1 ml MHB + 1 ml (6,25 µg FFC)	3,125 µg
7.	1 ml MHB + 1 ml (3,125 µg FFC)	1,5625 µg
8.	1 ml MHB + 1 ml (1,5625 µg FFC)	0,78125 µg
9.	1 ml MHB + 1 ml (0,78125 µg FFC)	0,390625 µg
10.	1 ml MHB + 1 ml %2'lik HCl metanol	Kontrol

BULGULAR

Çalışmada dört balık patojeni ve bir standart suşun, silvafeed TSPve sekiz farklı antibiyotiğe karşı hassasiyeti belirlendi. Ayrıca, beş bakterinin tannik asit ve florfenikol karşı MİK değerleri tespit edildi. Agar well difüzyon testinde doksisisiklin'in tüm konsantrasyonlarının test mikroorganizmalarına karşı duyarlı bulunması nedeni ile doksisisiklin'in MİK testi yapılmadı.

Agar Well Difüzyon Testi: Tannik asitin farklı konsantrasyonlardaki dilüsyonlarının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliği Mueller Hinton Agarda açılan kuyucukların etrafında oluşan zon çaplarının dijital kompas yardımı ile ölçülmesi ile gerçekleştirildi. Tannik asitin 25 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarının *E. coli*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* izolatlarına karşı duyarlı olduğu tespit edildi. *P. fluorescens* ve *V. anguillarum*'un ise tannik asitin 12,5 µg/ml ve üzerindeki konsantrasyonlarına karşı duyarlı olduğu tespit edildi (Tablo 6).

Agar well difüzyon testi ile *P. fluorescens* izolatının florfenikolün 200 µg/ml hariç bütün konsantrasyonlarına ve *E. coli* ATCC 25922 suşunun sadece florfenikol'ün 3,125 µg/ml konsantrasyonuna dirençli olduğu tespit edildi. Diğer bakteri türlerinin hepsinin florfenikol'ün farklı konsantrasyonlarındaki dilüsyonlarına karşı hassas olduğu tespit edildi (Tablo 6). Agar well difüzyon testi ile doksisisiklin'in tüm konsantrasyonlarına karşı test mikroorganizmalarının hassas olduğu saptandı (Tablo 6).

Tablo 6. Agar well difüzyon testi ile test mikroorganizmalarına karşı tannik asit, florfenikol ve doksisisiklinin etkinliklerinin karşılaştırılması.
Table 6. Comparison of the efficacy of tannic acid, florfenicol and doxycycline against test microorganisms by agar well diffusion test.

Kimyasallar	Konsantrasyon	Bakteri izolatları				
		<i>E. coli</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P-73</i>	<i>V-976</i>	<i>Y. ruckeri</i>
TA	200 µg	H	H	H	H	H
FFC	200 µg	H	H	H	H	H
DO	200 µg	H	H	H	H	H
TA	100 µg	H	H	H	H	H
FFC	100 µg	H	H	D	H	H
DO	100 µg	H	H	H	H	H
TA	50 µg	H	H	H	H	H
FFC	50 µg	H	H	D	H	H
DO	50 µg	H	H	H	H	H
TA	25 µg	H	H	H	H	H
FFC	25 µg	H	H	D	H	H
DO	25 µg	H	H	H	H	H
TA	12,5 µg	D	D	H	H	D
FFC	12,5 µg	H	H	D	H	H
DO	12,5 µg	H	H	H	H	H
TA	6,25 µg	D	D	D	D	D
FFC	6,25 µg	H	H	D	H	H
DO	6,25 µg	H	H	H	H	H
TA	3,125 µg	D	D	D	D	D
FFC	3,125 µg	D	H	D	H	H
DO	3,125 µg	H	H	H	H	H
Kontrol	0 µg	D	D	D	D	D

D: Dirençli (Resistant), H: Hassas (Sensitive).

Tablo 7. Farklı antibiyotiklerin zon çapı standartları.
Table 7. Zone diameter standards of different antibiotics.

Antimikrobiyal ajanlar	Ölçülen inhibisyon zon çapı (mm)			
	D	OH	H	Literatür
AM-10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	CLSI, 2014
CN-10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	CLSI, 2014
DO-30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14	CLSI, 2013
ENR-5 µg	≤ 16	17-20	≥ 21	CLSI, 2014
FFC-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	CLSI, 2014
T-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	CLSI, 2014
SMZ-100 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	CLSI, 2014
SXT-25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	CLSI, 2014

AM: Ampisilin, CN: Gentamisin, DO: Doksisisiklin, ENR: Enrofloksasin, FFC: Florfenikol, T: Oksitetrasiklin, SMZ: Sulfametoksazol, SXT: Trimethoprim/Sulfametoksazol, D: Dirençli, OH: Orta Hassas, H: Hassas.

AM: Ampiciline, CN: Gentamicin, DO: Doxycycline, ENR: Enrofloxacin, FFC: Florfenicol, T: Oxytetracycline, SMZ: Sulphamethazole, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole, D: Resistant, OH: Intermediate, H: Sensitive.

Agar Disk Difüzyon Testi: Test mikroorganizmalarına karşı sekiz farklı antibiyotiklerin disk difüzyon testi kullanılarak yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonucu ölçülen zon çaplarına ait değerler Tablo 7'de verilen standart zon çapı değerleri ile karşılaştırılarak mikroorganizmaların antimikrobiyal hassasiyetleri belirlendi. Çalışmada kullanılan bakterilerden *P. fluorescens*'in gentamisin ve doksisisiklin hariç çalışmada kullanılan diğer antimikrobiyallerin hepsine dirençli olduğu, *A. hydrophila*, *E. coli*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri*'nin ise ampisilin hariç diğer antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu tespit edildi. Test mikroorganizmalarının sekiz antibiyotiğe karşı hassasiyet değerleri Tablo 8'da verildi.

Tablo 8. Test mikroorganizmalarına karşı sekiz antibiyotiklerin antimikrobiyal hassasiyeti.
Table 8. Antimicrobial susceptibility of eight antibiotics against test microorganisms.

Antibiyotik Diskler	Bakteri izolatları				
	<i>E. coli</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P-73</i>	<i>V-976</i>	<i>Y. ruckeri</i>
AM (10 µg)	D	D	D	D	D
CN (10 µg)	H	H	H	H	H
DO (30 µg)	H	H	H	H	H
ENR (5 µg)	H	H	D	H	H
FFC (30 µg)	H	H	D	H	H
OTC (30 µg)	H	H	D	H	H
SMZ (100 µg)	H	H	D	H	H
STX (25 µg)	H	H	D	H	H

AM: Ampisilin, CN: Gentamisin, DO: Doksisisiklin, ENR: Enrofloksasin, FFC: Florfenikol, T: Oksitetrasiklin, SMZ: Sulfametoksazol, SXT: Trimethoprim/Sulfametoksazol, D: Dirençli, OH: Orta Hassas, H: Hassas.

AM: Ampiciline, CN: Gentamicin, DO: Doxycycline, ENR: Enrofloxacin, FFC: Florfenicol, T: Oxytetracycline, SMZ: Sulphamethazole, SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazole, D: Resistant, OH: Intermediate, H: Sensitive

Minimal İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK)

Belirlenmesi: Bu çalışmada MHB'da iki katlı dilüsyon yöntemi ile hazırlanan tannik asitin (0,2 ve 0,3 gr stok) farklı konsantrasyonlarına karşı beş farklı bakteri izolatlarının MİK değerine araştırıldı. *A. hydrophila*'nın minimal inhibe edici konsantrasyonu (MİK) 187,5 µg/ml konsantrasyonda üremenin meydana gelmesine karşın 250 µg/ml konsantrasyona sahip tüplerde üremenin olmadığı gözlenmiştir. Tannik asitin ilave edilmiş MHB tüplerinde *A. hydrophila*'nın üremediği ilk tüp olarak değerlendirildiğinde 250 µg/ml MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Test sonucu yapılan değerlendirmede *E. coli* ve *Y. ruckeri* edilmiş farklı konsantrasyonlarda tannik asit için MİK değerinin sırasıyla, 187,5 µg/ml ve 125 µg/ml konsantrasyonlara sahip tüpte olduğu tespit edildi. Tannik asitin MİK değeri *P. fluorescens* için 31,25 µg/ml ve *V. anguillarum* için ise 375 µg/ml konsantrasyona sahip tüpte olarak tespit edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Beş farklı bakteri izolatlarına karşı tannik asitin oluşturduğu MİK değerleri.

Table 9. MIC values of tannic acid against five different bacterial isolates.

Silvafeed	Konsantrasyon	Bakteri izolatları				
		<i>E. coli</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P-73</i>	<i>V-976</i>	<i>Y. Ruckeri</i>
TA	3000 µg	-	-	-	-	-
TA	1500 µg	-	-	-	-	-
TA	1000 µg	-	-	-	-	-
TA	750 µg	-	-	-	-	-
TA	500 µg	-	-	-	-	-
TA	375 µg	-	-	-	-	-
TA	250 µg	-	-	-	+	-
TA	187,5 µg	-	+	-	+	-
TA	125 µg	+	+	-	+	-
TA	93,75 µg	+	+	-	+	+
TA	62,5 µg	+	+	-	+	+
TA	46,875 µg	+	+	-	+	+
TA	31,25 µg	+	+	-	+	+
TA	23,44 µg	+	+	+	+	+
TA	15,625 µg	+	+	+	+	+
TA	Kontrol	+	+	+	+	+

+: Bakteriyel üremenin var, -: There is bacterial growth, -: Bakteriyel üremenin yok, -: There is no bacterial growth.

Beş farklı bakteri türü izolatlarına karşı florfenikolün MHB'da iki katlı seyreltilerek hazırlanan dilüsyonları ile yapılan test sonucunda edilen MİK değerleri belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda florfenikol içeren tüplere *E. coli* ilave edildiğinde MİK değerinin 25 µg/ml olduğu tespit edildi. *A. hydrophila* ilave edilen tüplerden florfenikol'ün MİK değeri 12,5 µg/ml yoğunluğundaki tüpte meydan geldiği tespit edildi. Florfenikolün farklı konsantrasyonlarındaki dilüsyonlarına *P. fluorescens* izolatı ilave edilmiş tüplerin hepsinde üreme meydana geldiği için MİK değeri tespit edilemedi. Florfenikolün farklı konsantrasyonlarındaki tüplerine *V. anguillarum* ilave edildiğinde üremenin olmadığı 12,5 µg/ml yoğunluğundaki ilk tüp MİK değeri olarak belirlendi. Farklı konsantrasyondaki florfenikol içeren tüplere *Y. ruckeri* ilave edildiğinde 50 µg/ml içeren üreme olmadığı ilk tüp MİK değeri olarak tespit edildi. Beş farklı bakteri izolatına karşı florfenikolün iki katlı dilüsyonlarının oluşturduğu MİK değerlerine ait veriler Tablo 10'de sunulmuştur.

Tablo 10. Beş farklı bakteri izolatlarına karşı florfenikolün MİK değerleri.

Table 10. MIC values of florfenicol against five different bacterial isolates.

Kimyasal	Konsantrasyon	Bakteri izolatları				
		<i>E. coli</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P-73</i>	<i>V-976</i>	<i>Y. ruckeri</i>
FFC	100 µg	-	-	+	-	-
FFC	50 µg	-	-	+	-	-
FFC	25 µg	-	-	+	-	+
FFC	12,5 µg	+	-	+	-	+
FFC	6,25 µg	+	+	+	+	+
FFC	3,125 µg	+	+	+	+	+
FFC	1,56 µg	+	+	+	+	+
FFC	0,78 µg	+	+	+	+	+
FFC	0,39 µg	+	+	+	+	+
Kontrol	0,00 µg	+	+	+	+	+

FFC: Florfenikol, +: Bakteriyel üreme var, -: Bakteriyel üreme yok. FFC: Florfenicol, +: There is bacterial growth, -: No bacterial grow

SONUÇ VE TARTIŞMA

Ülkemizde kültürü yapılan gökkuşuğu alabalık yavru ve porsiyonluk boydaki balıklarda özellikle su sıcaklığına bağlı olarak ortaya çıkan ve toplu ölümlere neden olan Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinden; *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* tarafından meydana getirilen enfeksiyonların tedavisinde antibiyogram test sonuçlarına göre farklı antibiyotikler kullanılmaktadır (Cagırgan & Tanrikul, 1998; Balta vd., 2010; 2016; Balta & Dengiz Balta, 2016; 2017; 2019; Balta, 2020). Kültür balıkçılığında, hastalıkların tedavisinde gelişmiş güzel antibiyotik kullanımı bazı problemleri beraberinde getirmektedir. Antibiyotikler, uygun süre ve dozda kullanılmadığında bakterilerde bu antibiyotiklere karşı geçici (biyokimyasal) ve kalıcı (genetik) direnç şekillenmektedir. Bu durum daha sonra ortaya çıkan aynı enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa ve rezidü problemlerine neden olmaktadır (Cagırgan & Tanrikul, 1998; Balta, 1999; Balta & Çağırğan, 2007; Balta & Çağırğan, 2010; Balta, 2016; Balta & Dengiz Balta, 2019; Balta & Yılmaz, 2019; Onuk vd., 2015; 2017; Duman vd., 2017; Dinçtürk & Tanrikul, 2021). Tannik asit bitkilerin gövde, yaprak vs. gibi farklı bölgelerinden elde edilen polifenolik yapıda suda eriyen bir bileşiktir. Tanenlerin, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antiviral, antioksidan ve antiparazitik aktiviteler gibi önemli biyolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Aydın & Üstün, 2007; Cipriano Salazara vd., 2018; Kaczmarek, 2020). Bitkilerden elde edilen tannik asit, doğal bir madde olması nedeni ile bakterilerin meydana getirdiği hastalıkların tedavisinde kullanımı bir ayrıcalıktır. Bu çalışmada, tannik asitin bakteriyel balık hastalıklarının hangisinin tedavisinde etkili olduğu belirlenmesi amaçlanmıştır. Tannik asitin balık patojenlerinin tedavisinde kullanılması, balık etinde kemoterapotik maddelerin kalıntı problemlerine neden olmaması, çevre kirliliği ve insan sağlığına olumlu etkilerinin yanı sıra yurt dışına balık ihracatını da kolaylaştıracaktır. Tannik asit, balık etinde rastlanılacak antibiyotik kalıntıları sonucu insanlarda oluşabilecek

kanserojenik ve mutajenik muhtemel etkilerin önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Karadeniz Bölgesindeki faaliyet gösteren balık çiftliklerindeki hasta balıkların iç organlarından izole edilen Gram negatif; *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum*'a karşı, tannik asitin farklı düzeyde antimikrobiyel etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Tannik asitin balık patojenleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda tannik asitin antioksidan aktivitesi, bağırsak mikroflorası ve bağırsak hareketleri üzerine etkileri çalışılmıştır (Sell vd., 1985; Yılmaz & Romeo, 2004; Schiavone vd., 2008). Tannik asit'in yem katkı maddesi olarak lezzetlendirici özelliği sayesinde, kanatlılarda yem alımını artırdığı ve yem stresini düşürdüğü bildirilmiştir (Zaccarato vd., 2006; Schiavone vd., 2008). Rekabetçi dışlama mekanizması sayesinde mikroflora tercihini değiştirerek mikroflorayı dengelediği (Schiavone vd., 2008), patojen bakterilerin artmasını ve toksin oluşumunu baskıladığı için hayvan refahını artırdığı, üreme performansını artırdığı, antibiyotik kullanımını azalttığı, balık ölümlerini azalttığı ve büyüme performansını iyileştirici etkinliğe sahip olduğu bildirmiştir (Zaccarato vd., 2006; Zoccarato vd., 2008).

Kültür balıklarının, bitkilerden elde edilen chaga mantarı (*Inonotus obliquus*) ekstraktı ile beslenmesinin iştah artışına bağlı kilo artışı sağladığı, *V. harveyi* ile enfekte edilen balıklarda beyaz kan hücreleri ve kırmızı kan hücreleri seviyelerinin, hemoglobinin, hematokrit, lenfositlerin ve monositlerin önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Harikrishnan vd., 2012). *A. hydrophila*'ya karşı aşı geliştirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, yavru sazan balıklarına kutsal fesleğen (*Ocimum sanctum*) bitki ekstraktının düşük dozda (10 ppm) verildiğinde kontrol ve diğer deney gruplarına (20 ve 30 ppm) göre maksimum antikor yanıtı sağladığı ve daha fazla fagositik aktivite gösterdiğinin tespit edildiği rapor edilmiştir (Pavaraj vd., 2011). Üç farklı (*Crataegi fructus* (Cf), *Artemisia capillaries* ve *Cnidium officinale*) tıbbi bitkinin özütleri ve karışımlarının, kırmızı çipura (Mercan) larvalarında büyüme ve *V. anguillarum*'a karşı etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bitki ekstraktları ile beslenen rotiferlerde *Vibrio* sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Cf özütü bulduran içerikler ile beslenen rotiferlerin diğer gruplara oranla istatistik olarak boylarının daha fazla büyüdüğü tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Cf ve bu bitki karışımlarının metanol özütleri, *Aeromonas*, *Edwasiella*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* sp. cinsleri dahil, yedi bulaşıcı bakteri izolatının çoğalmasını engellediği bildirilmiştir. Bitki özütü karışımı ile beslenmiş rotiferlerin beslendiği larvaların hayatta kalma oranı *V. anguillarum* ile yapılan çelinç testinde kontrol grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, bitki özütü ile beslenen

rotiferlerin, çipura larvalarında büyüme ve *V. anguillarum*'a karşı direnci artırmak için faydalı olduğunu ve hastalığa dirençli yavrularının sürdürülebilir üretimi için yeni bir teknoloji sağladığını ortaya koymuşlardır (Takaoka vd., 2011). Yapılan bir başka çalışmada *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *A. bestiarum*, *A. sobria*, *Listonella anguillarum*, *L. garviae*, *P. fluorescens*, *P. anguilliseptica*, *Y. ruckeri* ve *V. salmoninarum* gibi önemli balık patojenlerine karşı Silvafeed TSP'nin 6 farklı konsantrasyonunun (%0,05, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 ve 0,1) Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal etkinliğinin test edildiği bildirilmiştir (Tanrıkul & Dinçtürk, 2017). Silvafeed TSP'nin tüm konsantrasyonlarının *L. anguillarum* ve *Y. ruckeri*'ye karşı hassas olmasına karşın *L. garviae* ve *V. salmoninarum*'a dirençli olduğu rapor edilmiştir. *Aeromonas* türlerinin (*A. bestiarum*, %0,05 hariç) hassas olduğu, *P. fluorescens* ve *P. anguilliseptica* ilk iki konsantrasyonda (%0,05 ve 0,01) orta hassasiyette olmasına karşın diğer dört konsantrasyonlarda ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tanrıkul & Dinçtürk, 2017). Fitokimyasalların etkileri üzerine yapılan bir çalışmada oxytetracycline ve enrofloxacin antibiyotiklerinin *Y. ruckeri*'ye dirençli olduğunu bildirmesine rağmen, aynı çalışmada moringa (*Moringa oleifera*) ve üvez (*Sorbus domestica*) bitki ekstraktlarının sıvı ortamda (TSB) yapılan ölçümlerde, bakteri üremesini %40-50 oranında engellemesine karşın katı ortam (MHA) üzerindeki etkilerinin ise daha az olduğu rapor edilmiştir (Önalın & Çevik, 2020). Bu çalışmanın sonuçları ile Tanrıkul ve Dinçtürk (2017)'ün tannik asit üzerine yaptığı çalışmalar ile Önalın ve Çevik (2020)'in fitokimyasalların etkileri üzerine yaptığı çalışmalarını bulguları ile paralellik göstermiştir.

Bu çalışma sonunda, bakteriyel balık patojenlerinin tedavisinde Gram negatif bakteriler karşı Silvafeed TSP etkili olabileceği ve hastalıkların tedavisinden çok yem katkısı olarak hastalık çıkmadan önce koruyucu amaçla yemlere katılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

ÖNERİLER

Bu çalışmada, Silvafeed TSP'nin balıklarda hastalık yapan, özellikle Gram negatif (*A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri*) bakterilere karşı etkili olduğu için su ürünleri yetiştiriciliğinde, hastalık önleyici yem katkı maddesi olarak kullanılabilirliği kanısına varılmıştır. Balıklarda özellikle antibiyotiklere karşı direnç şekillenmiş tedavi edilemeyen (*P. fluorescens* vs) etkenlere karşı tannik asitin etkili olabileceği fakat daha fazla izolatın antibakteriyel etkinliğini belirlemek için yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir. Bu çalışmada florfenikole karşı disk difüzyon yönteminde

dirençli olan *P. fluorescens* bakterisi izolatına karşı tannik asitin disk difüzyon yönteminde 125 µg/ml ve üzeri konsantrasyonların etkili olduğu, aynı bakteri için florfenikol'ün ise 200 µg/ml duyarlı olmasına karşın 100 µg/ml dirençli olduğu belirlenmiştir. Tannik asit'in MİK değeri 31,25 µg/ml olarak tespit edilmesine karşı florfenikol'ün hazırlanan en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) bile MİK değeri tespit edilememiştir. Bu nedenle antibiyotiğe dirençli *P. fluorescens* karşı tannik asit daha ayrıntılı çalışmaları yapılması gerekmektedir. Ayrıca, tannik asidin yem katkı maddesi olarak farklı konsantrasyonlarda balık yemlerine karıştırılıp yedirme denemelerinin yapılarak büyüme performansları ve kan hücreleri üzerine etkilerinin çalışılması gerektiği düşünülmektedir. Balıklarda kullanılan antibiyotiklerin, akuatik ortamdaki bakterilerde dirençli suşların oluşmasına ve balık etinde kalıntı problemlerine neden olabileceği için bitkisel kaynaklı doğal bir madde olması nedeni ile tannik asit içerikli yem katkı maddelerin faydalı olacağı için balık yetiştiriciliğinde kullanılması tavsiye edilebilir. Bu nedenle bir sonraki çalışmada silvafed TSP'nin balık yedirme denemelerinin yapılacağı yeni bir çalışmanın yapılması planlanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezi çalışması Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2019-994 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aydın, S.A. & Üstün, F. (2007).** Tanenler 1. Kimyasal yapıları, farmakolojik etkileri, analiz yöntemleri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 33(1), 21-31.
- Bae, H.D., McAllister, T.A., Yanke, L.J., Cheng, K.J. & Muir, A.D. (1993).** Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2132-2138. DOI: 10.1128/aem.59.7.2132-2138.1993
- Balta, F. & Çağırğan, H. (2007).** Levrek'lerde (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) sağaltım sonrası oksitetrasiklinin kas ve derideki rezidüsünün belirlenmesi. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 24(1), 173-178.
- Balta, F. & Çağırğan, H. (2010).** Oxytetracycline residues in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758) tissues. *African Journal of Biotechnology*, 9(42), 7192-7196.
- Balta, F. & Dengiz Balta Z. (2019).** The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(1), 27-33. DOI: 10.35229/jaes.527258
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2016).** Deniz suyuna nakledilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen vibrio enfeksiyonu ve tedavisi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 14-20.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2017).** Doğu Karadeniz'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64, 321-328.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2019).** Preparation of O-antigen from *Yersinia ruckeri* serotype O1 and use in the slide agglutination test. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(3), 480-483. DOI: 10.35229/jaes.645416
- Balta, F. & Yılmaz, H. (2019).** Kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* enfeksiyonu. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 104-110. DOI: 10.35229/jaes.544439
- Balta, F. (1999).** Levrek (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) balıklarında sağaltım sonrası oksitetrasiklin rezidüsünün belirlenmesi. Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 93s.
- Balta, F. (2016).** Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the Southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(10), 4393-4400.
- Balta, F. (2020).** Fırtına Deresindeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinde izole edilen *Aeromonas* spp. izolatlarının antimikrobiyel hassasiyetin belirlenmesi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 5(3), 397-407. DOI: 10.35229/jaes.785447
- Balta, F., Dengiz Balta, Z., Ozgumus, O.B. & Çağırğan, H. (2016).** Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin portörlük yönünden tetkiki ve antimikrobiyal direncin tespiti. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 72-76.
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S. & Ozgumus, O.B. (2010).** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30(6), 211-219.
- Beşe, M. (1989).** Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri. İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayınları, İstanbul, 133s.
- Brooker, J.D., O'Donovan, L.A., Skene, I., Clarke, K., Blackall, L. & Muslera, P. (1994).** *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 313-318. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00877.x
- Çağırğan, H. & Tanrikul, T.T. (1998).** Testing the effectiveness of a *Yersinia* vaccine in infected and chemically treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*, 14, 239-243.
- Cipriano Salazara, M., Rojas Hernández, S., Olivares Pérez, J., Jiménez Guillén, R., Cruz Lagunasc, B., Camacho Díaz, L.M. & Ugbogud, A E. (2018).** Antibacterial activities of tannic acid against isolated ruminal bacteria from sheep. *Microbial Pathogenesis*, 117, 255-258. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.01.045
- CLSI. (2013).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational

- Supplement. CLSI document M100-S23. Vol. 33, No.1, Wayne, PA.
- CLSI. (2014).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230.
- Dinçtürk, E. & Tanrıku, T.T. (2021).** *Yersinia ruckeri* and *Pseudomonas fluorescens* co-infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Aquaculture Research*, **52**(10), 4858-4866. DOI: [10.1111/are.15320](https://doi.org/10.1111/are.15320)
- Duman, M., Altun, S., Cengiz, M., Saticioglu, I.B., Buyukekiz, A.G. & Sahinturk, P. (2017).** Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, **125**, 31-44. DOI: [10.3354/dao03132](https://doi.org/10.3354/dao03132)
- 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. DOI: [10.1016/j.micpath.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.004)
- Goel, G., Puniya, A.K. & Singh, K. (2005).** Tannic acid resistance in ruminal streptococcal isolates. *Journal of Basic Microbiology*, **45**, 243-245. DOI: [10.1002/jobm.200410517](https://doi.org/10.1002/jobm.200410517)
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. & Heo, M.S. (2012).** Effect of *Inonotus obliquus* enriched diet on hematology, immune response, and disease protection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, **344-349**, 48-53. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2012.03.010](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.010)
- http-1. (2021).** Silvafeed TSP. Silvateam. Products and services, plant based extracts. <https://www.silvateam.com>
- Kacar, Z.Z. & Balta, F. (2017).** Multi locus sequence analysis (MLSA)-based identification of *Pseudomonas* spp. isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Eastern Black Sea Region of Turkey using *Fresenius Environmental Bulletin*, **26**(12), 7506-7512.
- Kaczmarek, B. (2020).** Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials-a minireview. *Materials*, **13**, 3224. DOI: [10.3390/ma13143224](https://doi.org/10.3390/ma13143224)
- NCLLS. (1993).** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. NCCLS document M2-A5. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Onuk, E.E., Çaycı, Y.T., Çoban, A.Y., Çiftci, A., Balta, F., Didinen, B.I., Pekmezci, G.Z., Altun, S., Ünlü, M.S. ve Deveci, A. (2015).** Türkiye’de su kaynaklı *Aeromonas* izolatlarında saptanan ilk QnrS gen Pozitifliği. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **49**(1), 114-123.
- Onuk, E.E., Çaycı, Y.T., Çoban, A.Y., Çiftci, A., Balta, F., Didinen, B.I. ve Altun, S. (2017).** Balık ve yetiştirme suyu kökenli *Aeromonas* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının saptanması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **64**(1), 69-73.
- Önalın, Ş. & Çevik, M. (2020).** Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Biology*, **80**(4), 934-942. DOI: [10.1590/1519-6984.234969](https://doi.org/10.1590/1519-6984.234969)
- Pavaraj, M., Balasubramanian, V., Baskaran, S. & Ramasamy, P. (2011).** Development of immunity by extract of medicinal plant *Ocimum sanctum* on common carp *Cyprinus carpio* (L.). *Research Journal of Immunology*, **4**(1), 12-18. DOI: [10.3923/rji.2011.12.18](https://doi.org/10.3923/rji.2011.12.18)
- 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. DOI: [10.1016/j.vetpar.2016.11.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.009)
- Salem, A.Z.M., Robinson, P.H., Lopez, S., Gohar, Y.M., Rojo, R. & Tinoco, J.L. (2010).** Sensitivity of sheep intestinal lactic acid bacteria to secondary compounds extracted from *Acacia saligna* leaves. *Animal Feed Science and Technology*, **161**, 85-93. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2010.08.003](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.08.003)
- Schiavone, A., Gua, K., Tassone, S., Gasco, Hernandez, E., Denti, R. & Zoccarato, I. (2008).** Effects of a natural extract of chestnut wood on digestibility, performance traits, and nitrogen balance of broiler chicks. *Poultry Science*, **87**(3), 521-527. DOI: [10.3382/ps.2007-00113](https://doi.org/10.3382/ps.2007-00113)
- Sell, D.R., Reed, W.M., Chrisman, C.L. & Rogler, J.C. (1985).** Mucin excretion and morphology of the intestinal tract as influenced by sorgunm tannins. *Nutrition Raports International*, **31**, 1369-1374.
- Spencer, C.M., Cal, Y., Martin, R., Gaffney, S.H., Goulding, P.N., Magnolato, D., Lilley, T.H. & Haslam, E. (1988).** Polyphenol complexation: some thoughts and observations. *Phytochemistry*, **27**, 2397-2409. DOI: [10.1016/0031-9422\(88\)87004-3](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87004-3)
- Takaoka, O., Ji, S.C., Ishimaru, K., Lee, S.W., Jeong, G.S., Ito, J., Biswas, A. & Takii, K. (2011).** Effect of rotifer enrichment with herbal extracts on growth and resistance of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) larvae against *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture Research*, **42**, 1824-1829. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2010.02783.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02783.x)
- Tanrıku, T.T. & Dinçtürk, E. (2017).** Antibacterial susceptibility of hydrolysable tannins (Silvafeed TSP) against bacterial fish pathogens. *Aquaculture Europe 2017, October 17-20*, Dubrovnik, Croatia.
- Yılmaz, Y. & Romeo, T.T. (2004).** Major flavomolds in grapeseeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(2), 255-260. DOI: [10.1021/jf030117h](https://doi.org/10.1021/jf030117h)
- Zoccarato, I., Gasco, L., Schiavone, A., Guo, K., Barge, P., Rotolo, L., Savarino, G. & Masoero, G. (2008).** Effect of extract of chestnut wood inclusion (ENC) in normal and low protein amino acid supplemented diets on heavy broiler rabbits. In *Proceedings of the 9th world rabbit congress* (pp. 873-877), 10-13 June 2008, Verona, Italy.
- Zoccarato, I., Schiavone, A., Tassone, S., Gasco, L. & Malfatto, V. (2006).** Study on the utilisation of a natural silvafeed in the nutrition of heavy chickens. *XII European Poultry Conference*, Verona, Italy