



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENİZ KÜLTÜR BALIKLARINDA GÖRÜLEN
BAKTERİYEL PATOJENLERİN TEŞHİSİ VE
ANTİBAKTERİYEL MADDELERE DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Hilal GÜRALP

**Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Hastalıklar Programı**

Danışman

Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM

Haziran, 2012

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DENİZ KÜLTÜR BALIKLARINDA GÖRÜLEN
BAKTERİYEL PATOJENLERİN TEŞHİSİ VE
ANTİBAKTERİYEL MADDELERE DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

Hilal GÜRALP

**Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Hastalıklar Programı**

Danışman

Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM

Haziran, 2012

İSTANBUL

2601080440 Öğrenci numaralı Hilal GÜRALP tarafından hazırlanan bu çalışma 08/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Hastalıklar programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Gülşen TİMUR
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Soner ALTUN
Uludağ Üniversitesi
Veterinerlik Fakültesi



Doç. Dr. Ahmet AKMİRZA
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Tülay AKAYLI
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 7781 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM’a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Gülşen TİMUR, Prof. Dr. Devrim MEMİŞ, Doç. Dr. Tülay AKAYLI, Yard. Doç. Dr. Aygöl EKİCİ, Araş. Gör. Dr. Eda YARDIMCI, Araş. Gör. Dr. Güneş YAMANER, Araş. Gör. Dr. Kamil Mert ERYALÇIN, Araş. Gör. Dr. Deniz Devrim TOSUN, çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Emre TURGAY, Araş. Gör. Özgür ÇANAK, Araş. Gör. Çiğdem ÜRKÜ, İ.Ü. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Hastalıklar programında Yüksek Lisans öğrencisi Buket BAŞARAN, Su Ürünleri Mühendisi Ege GÜNGÖR ile diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Haziran, 2012

Hilal GÜRALP

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. DENİZ BALIKLARINDA GÖRÜLEN PATOJEN BAKTERİLER.....	5
2.2. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA TEŞHİS YÖNTEMLERİ	30
2.2.1. Rutin Bakteriyolojik Yöntemler	30
2.2.2. Aglütinasyon Yöntemleri.....	32
2.2.3. Moleküler Yöntemler.....	34
2.2.3.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu.....	34
2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	35
2.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	36
2.2.3.4. 16S ve DNA Dizi Analizi.....	37
2.3. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA KORUNMA VE TEDAVİ	40
2.4. ANTİBAKYERİYEL MADDELERE DUYARLILIKLARIN BELİRLENMESİ.....	47
2.4.1. Disk Difüzyon ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK).....	48

3. MALZEME VE YÖNTEM	52
3.1. MALZEME.....	52
3.1.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Örneklenen Balıklar	52
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	53
3.1.3. Araştırmada Kullanılan Kitler, Primerler ve Referans Suş	54
3.1.4. Araştırmada Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar	54
3.1.5. Araştırmada Kullanılan Cihazlar	55
3.2. YÖNTEM.....	55
3.2.1. Bakteri İzolasyonu	55
3.2.2. Rutin Bakteriyolojik Yöntemler	56
3.2.3. API Hızlı Tanı Kitlerinin Kullanımı	57
3.2.4. Aglütinasyon Yöntemi	57
3.2.5. Moleküler Yöntemler	57
3.2.5.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu.....	57
3.2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	58
3.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	59
3.2.5.4. 16S ve DNA Dizi Analizi.....	60
3.2.6. Antibakteriyel Maddelere Duyarlılıkların Belirlenmesi	60
3.2.6.1. Disk Difüzyon Testi	60
3.2.6.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Testi	61
4. BULGULAR	62
4.1. KLİNİK VE OTOPSİ BULGULARI.....	62
4.2. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR	67
4.3. API HIZLI TANI KİTİ BULGULARI	89
4.4. AGLÜTİNASYON TESTİ BULGULARI	90
4.5. MOLEKÜLER BULGULAR.....	91
4.6. ANTİBAKTERİYEL MADDELERE DUYARLILIK TESTİ BULGULARI.....	93
4.6.1. Disk Difüzyon Testi Bulguları	93
4.6.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Testi Bulguları	95
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	98

KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	128

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1	: Levrek balığında ventral ve pektoral yüzgeçte hemoraji	62
Şekil 4.2	: Tek gözünü yitirmiş 6 numaralı levrek balığının ve solgun solungaç lamellalarında görülen hemoraji	62
Şekil 4.3	: Levrek balığında solungaçta hemoraji, karaciğerde anemi ve iç organlarda yağlanma.....	63
Şekil 4.4	: Normalden daha büyük olan dalağın görüntüsü.....	63
Şekil 4.5	: 7 numaralı Levrek balığında Cranium'u ortaya çıkaran ülseratif lezyon	64
Şekil 4.6	: Gözde opaklaşma ve eriyerek birbirine yapışan solungaç lamellaları	64
Şekil 4.7	: numaralı levrek balığında beyaz – opak, şeritler halinde mukoid sarı şeffaf bir sıvı ile dolu hiperemik bağırsak	64
Şekil 4.8	: 1 numaralı çipura balığının oldukça şişkin olan karın görüntüsü	65
Şekil 4.9	: 2 numaralı çipura balıklarında kuyruk yüzgecinde erime.	65
Şekil 4.10	: 4 numaralı çipura balığında hiperemik solungaçlar, solgun ve peteşiyal hemorajik karaciğer	66
Şekil 4.11	: 1, 2, 3 numaralı izolatların TSA'daki koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000)	68
Şekil 4.12	: 1, 2, 3 numaralı izolatların O/F profilleri	68
Şekil 4.13	: 1 numaralı izolata ait eskülin testi pozitif sonucun görüntüsü	69
Şekil 4.14	: Arjinin dihidrolaz testine pozitif, ornitin ve lizin dekarboksilaz testlerinin negatif sonuçları	72
Şekil 4.15	: Kanlı agarda 4 ve 8 numaralı izolatların A) 24 saat ve B) 72 saat sonunda β -hemolizi	73
Şekil 4.16	: 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000)	74
Şekil 4.17	: 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların VAM' da ve TCBS agarda üreme özelliği	75
Şekil 4.18	: 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı izolatların koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000).....	85
Şekil 4.19	: 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı izolatların VAM' da ve TCBS agarda üreme özelliği	82
Şekil 4.20	: 13 ve 14 numaralı izolatların koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000)	86
Şekil 4.21	: 13 ve 14 numaralı izolatların koagülasyon ve O/F profili.....	86
Şekil 4.22	: 6 numaralı izolata ait API 20E profili	89
Şekil 4.23	: 11 numaralı izolata ait API 20E profili	89
Şekil 4.24	: BIONOR Mono-Va kiti ile aglütinasyon kitinde çökme oluşumu.....	90
Şekil 4.25	: A18 ve S20 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.....	91

Şekil 4.26	: Disk difüzyonda farklı zon çaplarının görünüşü (10 numaralı suş)	94
Şekil 4.27	: Disk difüzyonda dirençli, hassas ve belirsiz zon görünüşü (9 numaralı suş)	94
Şekil 4.28	: Disk difüzyonda dirençli, hassas ve belirsiz zon görünüşü (4 numaralı suş)	99
Şekil 4.29	: Disk difüzyonda dirençli, hassas ve belirsiz zon görünüşü (4 numaralı suş)	99

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Deniz balıklarında görülen bakteriyel hastalıklar	6
Tablo 2.2	: Balıklardan izole edilen patojen <i>Vibrio</i> türlerinin fenotipik özellikleri	14
Tablo 2.3	: <i>Pseudoalteromonas</i> türlerinin bazı önemli özellikleri	26
Tablo 2.4	: <i>V. anguillarum</i> serotip O1 ve O2 için su ürünleri yetiştiriciliğinde tercih edilen antibiyotiklere olan duyarlılıkları	46
Tablo 2.5	: Kültür balıkçılığında kullanılan bazı antimikrobiyal maddelere karşı hassaslık değerlerini yorumlama standardı	51
Tablo 4.1	: 1, 2 ve 3 numaralı izolatlarla ait fenotipik özellikler	70
Tablo 4.2	: 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların fenotipik özellikleri	76
Tablo 4.3	: 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı izolatların fenotipik özellikleri	83
Tablo 4.4	: 13 ve 14 numaralı izolatların fenotipik özellikleri	87
Tablo 4.5	: İzolatların Gen Bankası nükleotid blast işlemi ile tespit edilen en yakın türler ve benzerlik oranları	92
Tablo 4.6	: 1-14 numaralı suşların disk difüzyon çapları (mm)	93
Tablo 4.7	: 1-14 numaralı suşların MİK testi bulguları	96

SEMBOL LİSTESİ

°C	: derece santigrat
µl	: mikro litre
µg	: mikro gram
BHI	: Beyin kalp infüzyon agar
CA	: Cytophaga agar
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FMM	: <i>Flexibacter maritimus</i> besiyeri
TAE	: Tris asetik asit EDTA
TSA	: Triptik soy agar
TCBS	: Tiyosülfat sitrat safra tuzları sukraz agar
MHA	: Müeller Hinton agar
MHB	: Müeller Hinton broth
KOH	: potasyum hidroksit
LPS	: Lipopolisakkarit
MA	: Marine agar
MR	: Metil Red
NaCl	: Sodyum klorür
O/F	: Oksidasyon/Fermantasyon
ONPG	: Orta nitrofenil beta galaktosidaz
RNA	: Ribonükleik asit
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik asit
TSI	: Üç şeker demir besiyeri
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
VAM	: <i>Vibrio anguillarum</i> besiyeri
VP	: Vogues-Proskauer

ÖZET

Deniz Kültür Balıklarında Görülen Bakteriyel Patojenlerin Teşhisi ve Antibakteriyel Maddelere Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmada ülkemizde deniz balıkları yetiştiriciliğinin en çok yapıldığı Ege bölgesindeki Muğla ve İzmir illerinde bulunan bazı çiftliklerden hastalık bulguları gösteren çipura (*Sparus aurata* L., 1758) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) balıklarından izole edilen bakteriyel etkenlerin bakteriyolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak teşhis edilmesi ve bazı antimikrobiyal maddelere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

İncelenen hasta balık örneklerinde, Mart 2011 ve Ağustos 2011 tarihlerinde Muğla ili Güllük ve İzmir Körfezi'nde bulunan iki adet deniz balığı işletmesinde ağırlıkları 250 – 300 g olan 7'şer adet hasta levrek ve çipura balığında yüzeye yakın ve yavaş yüzme, ülseratif deri lezyonları, yüzgeç diplerinde hemoraji ve erime tespit edilmiştir.

Hasta çipura ve levrek örneklerinin karaciğer, böbrek ve dalaklarından % 1,5 NaCl içeren TSA, BHI, MHA, ile FMM, MA ve CA besi yerlerine yapılan bakteriyolojik ekimlerde 21°C'de 72 saat süreli inkübasyon sonunda elde edilen 14 adet saf kültürü yapılan izolat bakteriyolojik yöntemler, API hızlı tanı kitleri, BIONOR Mono-Va aglütinasyon kiti ve 16S rDNA dizi analizi ile teşhis yapılmıştır.

Hasta levrek balıklarından izole edilen 10 adet bakteri suşundan üç adet *Pseudoalteromonas* genusuna ait Gram negatif, hareketli, oksidatif basiller, dört adet Gram negatif, hareketli, fermentatif *V. anguillarum*, bir adet O/129'a dirençli *Vibrio* spp., bir adet *V. splendidus* ve bir adet *Psychrobacter* genusuna ait Gram negatif bakteri teşhis edilmiştir.

Hasta çipura balıklarından izole edilen dört adet bakteri suşundan üç adet O/129'a farklı duyarlılık profilleri gösteren *V. harveyi* ve bir adet *Kocuria* genusuna ait Gram pozitif, kok teşhis edilmiştir. Hasta levrek ve çipura balıklarından baskın olarak izole edilen bakteri türlerinin *Vibrio* genusuna ait olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada Vibriosis'in birincil etkeni olan *Vibrio* türlerinin izole edilen diğer genoslara ait bazı Gram negatif bakterilerle birlikte karma enfeksiyonlara neden olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada tespit edilen bakterilerin disk difüzyon ve MİK yöntemi ile antibakteriyel maddelere karşı duyarlılıkları belirlenmiş, Gram negatif bakterilere karşı Vibriosis tedavisi için önerilen oksitetrasiklin, sülfanamidler, oksolinik asit, nalidiksik asit, flumequin ve rifampisin gibi antibiyotiklerin başarılı bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

Determination of Antibacterial Drugs Sensitivity and Diagnosis of Bacterial Pathogens in Cultured Marine Fish

The aim of this study was to identify the bacterial agents isolated from gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) specimens which showing disease symptoms in several fish farms in the cities of Muğla and İzmir in the Aegean region where the most marine fish farming takes place in our country by using bacteriological and molecular diagnostic methods and determination of susceptibility to some antimicrobial agents.

In this study, seven sea bass and seven gilthead sea bream specimens weighted 250 – 300 g were examined from two marine fish farms located in Güllük Gulf (Muğla) and İzmir Gulf in March and August 2011, slowly and near the sea surface swimming behavior, ulcerative skin lesions, hemorrhages at the base of the fins and fin erosions were observed.

Bacterial inoculations were streaked on TSA, BHI, MHA containing % 1,5 NaCl, FMM, MA and CA from liver, kidney and spleen of the sea bass and sea bream samples. At the end of the incubation period (72 hours at 21°C), 14 pure cultures were isolated and identified by using bacteriological methods, API rapid diagnostic kits, BIONOR Mono-Va agglutination kits and 16S rDNA sequence analysis.

Among the 10 isolated strains from moribund sea bass; three strains were motile, Gram negative, oxidative bacillus and belong to the genus *Pseudoalteromonas*; four motile, Gram negative, fermentative bacillus strains were identified as *V. anguillarum*; one strain was identified as *Vibrio* sp. resistant to the vibriostatic O/129; one strain was identified as *V. splendidus*; one nonmotile, Gram negative, oxidative coccobacillus was belongs to the genus of *Psychrobacter*.

Among the four isolated strains from moribund gilthead sea bream; three strains were identified as *V. harveyi* showing different susceptibility profile of the vibriostatic O/129; one Gram positive coccus strain was belong to the genus of *Kocuria*. The isolated bacterial strains as the dominant from diseased gilthead sea bream and sea bass specimens which they were belong to the genus of *Vibrio* were determined.

In this study, it was found that *Vibrio* species as the primary agent of vibriosis caused of mixed infections with other isolated Gram negative bacterial strains belong to the other.

Antibacterial drugs susceptibility of the identified bacterial strains were determined by using disc diffusion and MIC methods and it was concluded that proposed antibiotics

used for the treatment of Vibriosis such as oxytetracycline, sulfonamides, oxolinic acid, nalidixic acid, flumequine and rifampicin can be used successfully against Gram negative bacteria and standart methods for determination of antibacterial drugs susceptibility of the bacterial pathogens in cultured marine fish.

1. GİRİŞ

Avrupa akuakültür endüstrisi, kendi içinde rekabetçi olmasının yanı sıra teknolojik yeniliklere ve pazarın taleplerine uyum sağlamaya açık dinamik bir sektördür. Bu nedenle sürekli olarak larval üretim alanında çeşitlilik, genişleme ve ilerleme göstermekte, avcılık düzenlemeleri ve pazar fiyatlarının istenilen düzeyde olmaması özellikle deniz balıkları yetiştiriciliğini ticari olarak cazip hale getirmektedir. Balık ürünlerine talebin tüm dünyada artmasıyla birlikte deniz balıkları üretiminin gelecek yıllarda hem ulusal hem de uluslararası düzeyde daha önemli bir hale geleceği açıktır. Akuakültür endüstrisi son otuz yılda, hem güney hem de kuzey bölgelerde olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde büyük bir büyüme göstermiştir.

2009 yılı istatistiklerine göre dünyada toplam kültür balıkçılığı üretimi 145,1 milyon ton olarak belirlenmiştir. Türkiye ise 623 bin ton toplam üretim ile dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık % 43'ünü karşılamaktadır (FAO, 2010; TÜİK, 2011). 2010 Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre ülkemizde toplam su ürünleri üretimi bir önceki yıla göre % 4,83 artarak 653 bin tona yükselmiştir. Bunun 167 bin tonu yetiştiricilik yolu ile üretilen miktardır. Yetiştiriciliği yapılan türler arasında 78 bin ton ile tatlı suda en çok üretilen alabalıktan sonra denizde yetiştirilen 28 bin ton çipura ve 50 bin ton levrek gelmektedir (TÜİK, 2011). Günümüzde iç sularda yaklaşık 1400'ü aşkın kara işletmesi, 17 kuluçkahane ve deniz balığı üretiminde 350'ye yakın ağ kafeslerde üretim yapan işletme bulunmaktadır (Tarım ve Ziraat Bilgi Bankası, 2011; TÜGEM, 2011). Bu işletmelerin sayıca % 50'si, üretim kapasitesi olarak % 80'i Muğla ilimizde bulunmaktadır. İzmir'de bulunan işletmeler ise sayıca ve üretim kapasitesi olarak toplam işletmelerin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (TÜİK, 2011).

Ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde deniz balığı yetiştiriciliği çoğunlukla levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) türlerinin kültürü üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte, Ege ve Akdeniz'de bulunan işletmelerin üretiminin tamamına yakını ihraç edilmektedir. Hem yetiştiricilikte gözlenen büyük

miktardaki artışla birlikte üretilen balıkların pazarlanmasıyla ilgili sorunların yaşanması hem de akuakültür sektörüne yeni bir ivme kazandırabilmek amacı, ekonomik değeri yüksek alternatif türlerin üretimini gündeme getirmiştir. Resmi kayıtlara girmemesine rağmen ülkemizde bazı alabalık işletmelerinde az miktarda da olsa kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve kahverengi alabalık (*Salmo trutta fario*) yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bunun yanı sıra Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı araştırma enstitülerinde yetiştiricilik çalışmalarına başlanan ve önemli başarılar sağlanmış balık türleri ise Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*) ve JICA destekli olarak kalkan balığıdır (*Psetta maxima*). Doğadan yakalanan küçük yılan balıklarının (*Anguilla anguilla*) ise kültür ortamında besleme çalışmalarında başarı sağlanmış ve porsiyonluk boya kadar büyütülmüştür. Mersin balıkları (*Acipenser* sp.) ile ilgili çalışmalar devam etmekle birlikte, özel sektörde son yıllarda çipura ve levrek üretimine alternatif olarak sinarit (*Dentex dentex*), fangri (*Pagrus pagrus*), sariağız (*Argyrosomus regius*), sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*), kalkan (*Psetta maxima*), minekop (*Umbrina cirrosa*), eşkina (*Sciaena umbra*), orkinos (*Thunnus thynnus*) ve çizgili mercan (*Pagrus auriga*) balıkları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. (Çelikkale ve diğ., 1999; Shields, 2001; Kaiser ve Stead, 2002; Başçınar, 2004).

Kültür balıkçılığında artış hızla devam ederken üretimde karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi de ekonomik kayıplara yol açan hastalıkların ortaya çıkmasıdır. Ülkemizde rapor edilmiş yetiştiriciliği yapılan balıklarda görülen bakteriyel hastalıklar; furunculosis (Timur ve diğ., 1999, Korun ve Timur, 2001; Kırkan ve diğ., 2003, Kayış ve diğ., 2009), hareketli *Aeromonas* septisemisi (Candan ve diğ., 1995), atipik *Aeromonas* enfeksiyonu (Karataş ve diğ., 2005), yersiniosis (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1991; Timur ve Timur, 1991; Karataş Düğenci ve Candan, 1997; Karataş Düğenci ve diğ., 2004), fry mortalite sendromu (Çağırğan ve diğ., 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler ve diğ., 2003; İspir ve diğ., 2004; Timur ve diğ., 2004; Kum ve diğ., 2008; Kayış ve diğ., 2009; Durmaz ve diğ., 2012), *Pseudomonas* septisemisi (Akaylı ve Timur, 2004), streptococcosis (Diler ve diğ., 2002; Özer ve diğ., 2008; Avcı ve diğ., 2010), staphylococcosis (Timur ve Akaylı 2003; Kubilay ve Uluköy 2004; Turgay 2009), vibriosis (Timur ve Korun, 2004; Akaylı ve Timur, 2004; Demircan ve Candan, 2006), pasteurellosis (Candan ve diğ., 1996; Çolak, 1999; Yaman ve diğ., 2003; Korun ve Timur, 2005) ve bakteriyel böbrek hastalığıdır (Savaş ve diğ., 2006). Bununla birlikte

son yıllarda Rickettsial enfeksiyonlar (Timur ve diğ., 2005) ve deniz Flexibacteriosis (Şen, 2007; Yardımcı, 2011) de rapor edilmiştir.

Hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli etken balığın bağışıklık sistemini baskılayan stres faktörleridir. Su sıcaklığındaki ve oksijen miktarındaki ani değişimler, hijyen kurallarına dikkat edilmemesi, boylama, taşıma, yemleme ve ortamda bulunan hastalık etkenleri kültür koşullarında strese neden olan etkenler arasındadır. İşletmelerde optimum koşulların sağlandığı durumda bile hastalıklar ile karşılaşmak mümkündür. Genel olarak kültürü yapılan balıklarda hastalık oranı, doğal ortamda bulunan balıklardakine göre daha yüksektir (Rodgers, 2003). Önemli olan hastalığın büyük kayıplara neden olmadan yayılmasını engellemek ve tedavi etmektir. Ülkemizde ve tüm dünyada balık hastalıklarını tedavi etmek için çeşitli antibakteriyel maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı ise dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve giderek kullanılabilecek etkili antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Bu durumda tedavideki başarısızlık ile mortalite ve tedavi maliyeti artmaktadır. (Smith ve diğ., 1994; Rodgers, 2003; Colquhoun ve diğ., 2007). Ülkemizde ve tüm dünyada balık hastalıklarını tedavi etmek için çeşitli antibakteriyel maddeler (oksitetrasiklin, enroflaksin ve sülfonamidler gibi) kullanılmaktadır. Bu maddelerin uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı ise dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve giderek kullanılabilecek etkili antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca etken teşhis edilmeden ve antibiyogram testi yapılmadan antibiyotik kullanılması, doz ve süreye uyulmaması, ilaçlı yem verilmeden önce 12-24 saat balığın aç bırakılmaması, yasal ve bilinen antibiyotiklerin kullanılmaması, yanlış kombinasyonlar yapılması ve sekonder enfeksiyonlarda primer etkenlerin göz ardı edilmesi gibi nedenler ile tedavideki başarısızlık mortaliteyi ve tedavi maliyetini artırmaktadır. Bu nedenlerle hastalık etkeninin kısa sürede, doğru ve hassas bir şekilde teşhis edilmesi, etkene uygun tedavi aşamasına geçilmesi gerekmektedir (Smith ve diğ., 1994; Colquhoun ve diğ., 2007).

Antibakteriyel duyarlılık testlerinde güvenilir sonuçların alınabilmesi için standart yöntemlerin uygulanması şarttır. Etkene göre antibiyotik seçimi, antibiyotiklerin kısıtlı bildirimi gibi konular da standardizasyonla birlikte ele alınmalıdır. Bu nedenle

antimikrobiyal duyarlığı etkileyen faktörlerin, uygun yöntemlerin belirlenmesi ve laboratuvara adapte edilmesi çok önemlidir.

Bu çalışmada, deniz kültür balıklarında görülen bakteriyel hastalık etkenlerinin, örnekleme yapılan işletmelerdeki balıklardan izole edilerek farklı yöntemlerle (rutin bakteriyolojik yöntemler, API hızlı tanı kitleri ve moleküler yöntemler) teşhis edilmesi ve günümüzde yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklere olan duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DENİZ BALIKLARINDA GÖRÜLEN PATOJEN BAKTERİLER

Balık yetiştiriciliğini etkileyen ve üretimde büyük kayıplara yol açan en önemli neden hastalıkların ortaya çıkmasıdır. Ülkemizde şimdiye kadar rapor edilmiş deniz balıklarında görülen bakteriyel hastalıklar; atipik furunculosis (Karataş ve diğ., 2005), hareketli *Aeromonas septisemisi* (Candan ve diğ., 1995), vibriosis (Akaylı ve Timur, 2002; Demircan ve Candan, 2006), mycobacteriosis (Korun ve diğ., 2005) ve pasteurellosis (Çağırğan 1993; Çağırğan ve Yürekli Türk, 1996; Candan ve diğ., 1996; Timur ve diğ., 1999; Korun ve Timur, 2005), deniz flexibacteriosis ve rickettsial enfeksiyonlardır (Timur ve diğ., 2005, Şen, 2007, Yardımcı, 2011). Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan deniz balıklarında viral eritrosit enfeksiyon (VEI) ile birlikte karma enfeksiyon şeklinde *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria*, *Listonella (Vibrio) anguillarum* ve *Staphylococcus epidermidis*’in izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir (Timur ve diğ., 2008). Yine Karadeniz’de beş işletmede yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında ilk kez yüksek mortaliteyle seyreden eritrositik inklüzyon cisimciği sendromu (EIBS) tespit edilen balıklarda *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flexibacter maritimus*, *Listonella (Vibrio) anguillarum* visceral organlardan izole ve identifiye edildiği bildirilmiştir (Timur ve diğ., 2011).

Aeromonas salmonicida tatlı su balıklarında özellikle alabalıklarda patojen olarak bilinen ve bu nedenle birçok araştırmacı tarafından çalışılan bir türdür (Hiney ve Olivier, 1999). Türkiye’de ilk olarak 1995 yılında Timur ve arkadaşları tarafından genç kültür gökkuşağı alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) tipik frunculosis rapor edilmiştir (Timur ve diğ., 1999). Türkiye’de atipik furunculosisin ilk teşhisi 2002 yılında Karadeniz’de kültür levreklerinde (*D. labrax*) yapılmıştır (Karataş ve diğ., 2005). Hareketli *Aeromonas septisemisi* (MAS) birçok etkenin bir araya gelmesiyle oluşabilen bir balık hastalığıdır.

Tablo 2.1: Deniz balıklarında görülen bakteriyel hastalıklar (Seng ve Colorni, 2002; Timur ve Timur, 2003; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Karataş ve Candan, 2007; Candan ve Karataş, 2010; Noga, 2010; Abowei ve Briyai 2011; Actis ve diğ., 2011)

Etken	Hastalık Adı	Balık Türü	Coğrafik Dağılım	Teşhis eden kiş/tarih
<i>Aeromonas caviae</i>	Hereketli Aeromonad Septisemisi	Atlantik salmonu (<i>Salmo salar</i>) Gökkuşağı alabalığı (<i>Onchorhynchus mykiss</i>) Lepistes (<i>Poecilia reticulata</i>)	Türkiye, Kenya	Miller ve Chapman, 1976; Doukas ve diğ., 1998; Aoki, 1999; Timur ve diğ., 1999; Korun ve Timur 2001; Seng ve Colorni, 2002; Kırkan ve diğ., 2003; Timur ve Timur, 2003; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Karataş ve Candan, 2007; Kayış ve diğ., 2009; Candan ve Karataş, 2010; Noga, 2010; Abowei ve Briyai 2011; Actis ve diğ., 2011
<i>A. hydrophila</i> <i>A. jandei</i>	Hereketli Aeromonad Septisemisi	Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Lepistes (<i>P. reticulata</i>) Yılan balığı (<i>Anguilla anguilla</i>) Deniz levreği (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Karagöz (<i>Puntazzo puntazzo</i>) Çizgili levrek (<i>Morone saxatilis</i>)	Türkiye, ABD	
<i>A. salmonicida</i>	Furunculosis	Gökkuşağı alabalığı (<i>O. mykiss</i>) Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Japon balığı (<i>Carassius auratus</i>) Sazangiller (<i>Cyprinus spp.</i>)	Türkiye, ABD, İspanya, Avrupa, Japonya	
<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. salmonicida</i>	Furunculosis	Salmonidler (<i>Onchorhynchus sp., Salmo sp.</i>)	ABD, Türkiye	
<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. achromogenes</i>	Atipik furunculosis	Deniz levreği (<i>D. labrax</i>) Gökkuşağı alabalığı (<i>O. mykiss</i>)	Türkiye	Karataş ve diğ., 2005
<i>V. (Listonella) anguillarum</i>	Vibriosis	Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Kalkan balığı (<i>Scophthalmus maximus</i>) Deniz levreği (<i>D. labrax</i>) Çipura (<i>Sparus aurata</i>) Çizgili levrek (<i>M. saxatilis</i>) Yılan balığı (<i>A. japonica, A. anguilla</i>) Ayu balığı (<i>Platyglilellus altivelis</i>) Morina balığı (<i>Gadus morhua</i>) Kırmızı mercan (<i>Pagrus major</i>) Çipura (<i>Acanthopagrus cuvieri</i>)	Amerika, Avrupa, Türkiye, Japonya, İsrail, Kuveyt	Colwell ve Grimes, 1984; Toranzo ve Barja, 1990; Soffientino ve diğ., 1999; Akaylı, 2001; Korun ve Timur, 2008; Seng ve Colorni, 2002; Timur ve Timur, 2003; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Karataş ve Candan, 2007; Candan ve Karataş, 2010; Noga, 2010; Abowei ve Briyai 2011; Actis ve diğ., 2011
<i>V. ordalii</i>		Salmonidler (<i>Onchorhynchus sp., Salmo sp.</i>) Çipura (<i>S. aurata</i>)	Avrupa, Türkiye,	
<i>V. alginolyticus</i>		Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Çipura (<i>S. aurata</i>) Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>) Yılan balığı (<i>A. anguilla</i>)	İsrail, İskoçya, Kızıl deniz,	
<i>V. cholerae</i>		Ayu balığı (<i>P. altivelis</i>)	Japonya	
<i>V. fischeri</i>		Çipura (<i>S. aurata</i>) Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>)	İspanya	
<i>V. splendidus</i>		Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Çipura (<i>S. aurata</i>) Kalkan (<i>Colistium nudipinnis, C. guntheri</i>)	İskoçya, İspanya, Yeni Zelanda, Norveç	
<i>V. harveyi</i> (= <i>V. carchariae</i> = <i>V. trachuri</i>)		Çipura (<i>S. aurata</i>) Levrek (<i>Lates calcarifer</i>) Dil balığı (<i>Dicologlossa cuneata</i>) Common snook <i>Centropomus undecimalis</i> Cobia <i>Rachycentron canadum</i>	ABD, Tayvan, İspanya	

Tablo 2.1'in devamı

Etken	Hastalık Adı	Balık Türü	Coğrafik Dağılım	Teşhis eden kişi/tarih
<i>V. carchariae</i>		Köpek balıkları (<i>Carcharinus plumbeus</i>)	ABD	Colwell ve Grimes, 1984; Toranzo ve Barja, 1990; Ringø ve Vadstein, 1998; Akaylı, 2001; Korun ve Timur, 2008; Seng ve Colorni, 2002; Villamil ve diğ., 2003; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Karataş ve Candan, 2007; Candan ve Karataş, 2010; Noga, 2010; Abowei ve Briyai 2011; Actis ve diğ., 2011
<i>V. parahaemolyticus</i>		Çipura (<i>S. aurata</i>) <i>Larimichthys polyactis</i>	Kızıl deniz, Çin	
<i>V. salmonicida</i>		Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Morina balığı (<i>Gadus morhua</i>)	Norveç, Kanada, İskoçya, ABD	
<i>V. pelagius</i>		Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>)	İspanya, Norveç	
<i>V. logei</i>		Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>)	Norveç, İzlanda, İskoçya	
<i>V. ichthyenteri</i>		Kuluçkahanelerde	Japonya	
<i>V. campbelli</i>		Levrek (<i>D. labrax</i>)	İspanya	
<i>V. marinus</i>		Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>)	İspanya	
<i>V. vulnificus</i>		Yılan balığı (<i>A. japonica</i> , <i>A. anguilla</i>)	Japonya, İspanya, ABD, Danimarka	
<i>V. viscosus</i> (<i>Moritella viscosa</i>)	Kış ülseri	Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>) Deniz levreği (<i>D. labrax</i>)	Norveç, İzlanda, İspanya	Tison ve diğ., 1982; Biosca ve diğ., 1991; Dalsgaard ve diğ., 1999; Fouz ve Amaro, 2003;
<i>V. vulnificus</i>		Yılan balığı (<i>A. japonica</i> , <i>A. anguilla</i>)	Japonya, İngiltere, İspanya, Danimarka	
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> = <i>V. damsela</i> (<i>Pasteurella piscicida</i>)	Photobacteriosis (Pasteurellosis)	Çipura (<i>S. aurata</i>) Deniz levreği (<i>D. labrax</i>) Dil balığı (<i>Solea senegalensis</i> , <i>Solea solea</i>) Çizgili levrek (<i>M. saxatilis</i>) Sarıkuşuk (<i>Seriola quinqueradiata</i>) Ayu balığı (<i>P. altivelis</i>) Atlantik ton balığı (<i>Thunnus thynnus</i>) Kefal (<i>Mugil cephalus</i>) Mavri kefal (<i>Chelon labrosus</i>) Köpek balıkları Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>)	ABD, Japonya, İspanya, Türkiye, Danimarka	Bullock, 1978; Hawke ve diğ., 1987; Toranzo ve diğ., 1991; Çağırğan 1993; Korun ve diğ., 2005
<i>Flexibacter maritimus</i> (<i>Tenacibaculum maritimum</i>) <i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Flexibacteriosis	Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>) Salmonidler (<i>Onchorhynchus sp.</i> , <i>Salmo sp.</i>) Dil balığı (<i>S. senegalensis</i> , <i>S. solea</i>) Deniz levreği (<i>D. labrax</i>) Çipura (<i>S. aurata</i>) Kırmızı mercan (<i>P. major</i>) Kara mercan (<i>Acanthopagrus schlegelii</i>) Dere pisisi (<i>Paralichthys olivaceus</i>) Beyaz levrek (<i>Atractoscion nobilis</i>) Pasifik sardalyası (<i>Sardinops sagax</i>), Kuzey hamsisi (<i>Engraulis mordax</i>) Gökkuşuğu alabalığı (<i>O. mykiss</i>) Asya levreği (<i>Lates calcarifer</i>)	Avrupa, ABD, Japonya, Türkiye, Avustralya, Kuzey ABD, Japonya,	Candan, 1991; Şen, 2007; Yardımcı, 2011; Seng ve Colorni, 2002; Timur ve Timur, 2003; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Karataş ve Candan, 2007; Candan ve Karataş, 2010; Noga, 2010; Abowei ve Briyai 2011; Actis ve diğ., 2011

Tablo 2.1'in devamı

Etken	Hastalık Adı	Balık Türü	Coğrafik Dağılım	Teşhis eden kişi/tarih
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Pseudomonadiazis	Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>) Yılan balığı (<i>A. anguilla</i>) Ayu balığı (<i>P. altivelis</i>) Çipura (<i>S. aurata</i>) Salmonidler (<i>Onchorhynchus</i> sp., <i>Salmo</i> sp.) Ringa (<i>Clupeaharengus membras</i>) Siyah benekli çipura (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Japonya, Tayvan, İskoçya, Danimarka, Finlandiya, Baltık Denizi, Akdeniz, İspanya	Seng ve Colorni, 2002; Timur ve Timur, 2003; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Karataş ve Candan, 2007; Candan ve Karataş, 2010; Noga, 2010; Abowei ve Briyai, 2011; Actis ve diğ., 2011
<i>Lactococcus garvieae</i> (<i>Enterococcus seriolicida</i>)	Streptococcosis / lactococcosis	Sarıkuyruk (<i>Seriola quinqueradiata</i>) Yılan balığı (<i>A. anguilla</i>) Gökkuşluğu alabalığı (<i>Onchorhynchus mykiss</i>)	Türkiye, Japonya, İtalya, İsrail, ABD, Meksika	
<i>Streptococcus iniae</i>		Sarıkuyruk (<i>S. quinqueradiata</i>) Dere pisisi (<i>P. olivaceus</i>) Deniz levreği (<i>D. labrax</i>) Asya levreği (<i>L. calcarifer</i>) Gökkuşluğu alabalığı (<i>O. mykiss</i>) Çizgili levrek (<i>M. saxatilis</i>)	İsrail, ABD, Japonya,	
<i>S. parauberis</i>		Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>)	İspanya	
<i>Streptococcus</i> sp.		Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>) Sarıkuyruk (<i>S. quinqueradiata</i>) Kırmızı mercan (<i>P. major</i>)	Japonya	
<i>Renibacterium salmoninarum</i>	BKD	Salmonidler (<i>Onchorhynchus</i> sp., <i>Salmo</i> sp.) Çar salmonu (<i>Salvelinus fontinalis</i>) Alabalık (<i>S. trutta</i>) Cutthroat trout (<i>O. clarkii</i>)	İskoçya, ABD, Kanada, Danimarka, Finlandiya, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya, Norveç, İsveç, Yugoslavya, İzlanda	Sanders ve Fryer, 1980; Halaihel ve diğ., 2009
<i>Mycobacterium marinum</i>	Mycobacteriosis	Deniz levreği (<i>D. labrax</i>) Kalkan balığı (<i>S. maximus</i>) Atlantik salmonu (<i>S. salar</i>)	Akdeniz, Kızıl deniz,	Colornia ve diğ., 1998; Diamant ve diğ., 2000; Sechi ve diğ., 2002; Seng ve Colorni, 2002; Ucko ve diğ., 2002; Brocklebank ve diğ., 2003;
<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i>		Kefal, salmonid, tilapya, kalkan, deniz levreği, çizgili levrek, uskumru, morina, karagöz, hibrid çipura, tekir, atlantik salmon	Afrika, Kenya, İsrail, ABD, Türkiye	
<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Piscirickettsiosis	Salmonidler (<i>Onchorhynchus</i> sp., <i>Salmo</i> sp.)	Şili, Norveç, İrlanda, İskoçya	Comps ve diğ., 1996; Lannan ve diğ., 1999; Fryer ve Hedrick, 2003; Chen ve diğ., 2000; Timur ve diğ., 2005
Rickettsia-benzeri organizmalar	Rickettsial enfeksiyonlar	Salmonidler (Coho salmon) Tilapya (<i>Oreochromis mossambicus</i> , <i>O. niloticus</i> , <i>O. aureus</i> , <i>Tilapia zilli</i> , <i>T. hornorum</i>) Beyaz levrek (<i>Atractoscion nobilis</i>) Deniz Levreği (<i>D. labrax</i>) <i>P. salmonis</i>	Şili, Tayvan, Fransa, Yunanistan, Türkiye	
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	Karma enfeksiyon	<i>Amphiprion clarkii</i> <i>Amblyglyphidodon curacao</i> Deniz kültür balıkları	ABD Florida	Bein, 1954; Nelson ve Ghiorse, 1999
<i>Psychrobacter. immobilis</i>		Gökkuşluğu alabalığı (<i>O. mykiss</i>)	Türkiye	Hisar ve diğ., 2002

A. hydrophila, *A. cavie*, *A. sobria*, *A. punctata*, *A. allosaccharophila*, *A. jandaei*, *A. bestiarum*, *A. veronii* gibi hareketli aeromonadların neden olduğu bu hastalık birçok tatlı su ve deniz balığı türünde aşırı stoklama ile ortaya çıkan hemorajik sepsisemiye neden olduğu bildirilmiştir (Noga, 2010) (Tablo 2.1). 1995’de Candan ve arkadaşları, Karadeniz’de deniz suyu sıcaklığı 23°C’yi bulduğunda kültür Atlantik salmonlarında (*S. salar*) ölümler ile seyreden hastalığın birincil etkeni olarak *A. hydrophila* rapor etmişlerdir. Daha sonra Ege denizinde ilk olarak kültür levrek (*D. labrax*) ve karagöz (*Puntazzo puntazzo*) balıklarında lezyon ve ölümlerle seyreden enfeksiyonlar rapor edilmiştir (Doukas ve diğ., 1998). Şahrikoğlu ve Candan 2002 yılında hasta kültür levreklerinden *A. hydrophila* izole edildiğini bildirmiştir.

Mycobacteriosis akvaryum balıklarının en yaygın kronik hastalığı olan ve balık tüberkülozu olarak bilinen, kültür deniz balıklarında da görülen önemli hastalıktır. Hastalığın etkeni olarak *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve diğer türlerin neden olduğu bu hastalık, kültürü yapılan salmonid, tilapia, kalkan, deniz levreği, çizgili levrek, uskumru, morina, karagöz, hibrid çipura ve tekir balıklarında ciddi problemlere neden oldukları çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Seng ve Colorni, 2002; Timur ve Timur, 2003; Noga, 2010; Abowei ve Briyai, 2011). Balıklarda tüberküloza neden olan en yaygın tür olan *M. marinum* Akdeniz’de ve Kızıldeniz’de kültür levrek balıklarında rapor edilmiştir (Colornia ve diğ., 1998, Diamant ve diğ., 2000; Sechi ve diğ., 2002; Ucko ve diğ., 2002). Kültür Atlantik salmon balıklarında hastalık etkeni olarak *M. chelonae* izole edilmesiyle mycobacteriosis teşhis edilmiştir (Brocklebank ve diğ., 2003). Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan levrek balıklarında mycobacteriosis letarji, solgun solungaçlar ve ekzoftalmus ile iç organlarda grimsi beyaz renkte nodüller gibi bulgular ile seyrettiği rapor edilmiştir (Korun ve diğ., 2005). Hastalığın teşhisi nodüller içeren iç organların histolojik kesitlerinde granuloma içersinde bulunan çomak şekilli bakterilerin asit fast boyalar ile boyanması ile yapılabildiği bildirilmiştir (Seng ve Colorni, 2002; Timur ve Timur, 2003; Noga, 2010; Abowei ve Briyai, 2011). Birçok ilaç bu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak yayınlanmış birkaç kapsamlı klinik çalışma vardır. Kawakami ve Nakajima tarafından 1990 yılında gerçekleştirilen çalışmada

eritromisin, rifampisin veya streptomisinin deneysel enfeksiyonlara karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Kawakami ve Nakajima, 2002). Değerli ekzotik deniz balıklarının mycobacteriosis tedavisinde izoniyazid ve rifampisin önerildiğı bildirilmiştir (Chinabut, 1999) (Tablo 2.1).

Pasteurellosisin etkeni olan *P. damsela* subsp. *piscicida* kültür balıklarında görülen en önemli hastalıklardan biridir. Japonya’da kültür deniz balıkları, ayu balığı, çipura, sarıkuyruk, dil balığı, Atlantik ton balığı gibi çeşitli türlerde yaygın bir hastalık olarak rapor edilmiştir (Bullock, 1978; Toranzo ve diğ., 2005; Noga, 2010). *Pasteurella* sp. ilk kez Snieszko ve arkadaşları (1964) tarafından Amerika’da Chesapeake Körfezinde, acı ve tuzlu suda kültürü yapılan çizgili levreklerde bildirilmiştir (Noga, 2010). Daha sonra Hawke ve arkadaşları tarafından (1987) Alabama’da çizgili levrek fingerling stoklarında % 80 oranında ölüm görüldüğü rapor edilmiştir (Hawke ve diğ., 1987). İspanya’da ilk *Pasteurella* enfeksiyonu 1991 yılında kültür çipura balıklarında görüldüğü bildirilmiştir (Toranzo ve diğ., 1991). Bu hastalık ülkemizde ilk olarak 1993 yılında kültür çipura balıklarında görülmüştür (Çağırhan, 1993), daha sonra Yalova’da bir kamu işletmesinde kültürü yapılan dokuz aylık levrek balıklarında *I. hoferi* ile birlikte karma enfeksiyona (Timur ve diğ., 1996) ve Ege denizinde yetiştirilen levrek balıklarında enfeksiyona neden olduğı bildirilmiştir (Candan ve diğ., 1996; Korun ve Timur, 2005). Ayrıca denizde ve düşük tuzluluktaki sularda kültür levreklerinden, doğada bulunan has kefal (*Mugil cephalus*) ve mavri kefal (*Chelon labrosus*) izole edildiğı bildirilmiştir (Tanrikul ve Çağırhan, 2001) (Tablo 2.1).

Deniz flexibacteriosisi genel olarak hasta balıklarda erimiş ve hemorajik ağız, ülseratif deri lezyonları, yüzgeçlerde erime ile seyreden internal organlarda da gelişebilen sistemik bir hastalıktır (Toranzo ve diğ., 2005). Avrupa’da levrek (*D. labrax*), dil balığı (*Solea solea* ve *S. senegalensis*), salmon (*O. kisutch*), sinarit (*Dentex dentex*), Amerika’da beyaz levrek (*Atractoscion nobilis*), pasifik sardalyası (*Sardinop sagax*), kuzey hamsisi (*Engraulis mordax*), Japonya’da pisi balığı (*Paralichthys olivaceus*), kara mercan (*Acanthopagrus schlegeli*), kırmızı mercan (*Pagrus major*) türleri başta olmak üzere birçok deniz balığı türlerinde sık olarak görülen, “tuzlu su kolumnarisi”, “erimiş ağız sendromu” ve “siyah benek nekrozisi” şeklinde birkaç isimle anılan bir hastalıktır (Toranzo ve diğ., 2005; Karataş ve Candan,

2007; Noga, 2010). *Tenacibaculum maritimum* (*Flexibacter maritimus*) ve yakın türlerin neden olduğu bu hastalığın genellikle bahar aylarında ağ kafese aktarılan juvenil çipura balıklarında gelişen lezyonlarla seyrettiği bildirilmiştir (Wakabayashi ve diğ., 1986). Türkiye’de 1991 yılında çipura balıklarında görüldüğü (Candan, 1991), özellikle kuluçkahanelerden kafeslere yavru transferinden sonra hastalığa sık rastlandığı ve bazı çiftliklerde %60’a varan morbidite ve yüksek oranda mortalite ile seyrettiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Şen, 2007). Ege Denizi’nde kültür çipura ve levrek balıklarında (Yardımcı, 2011), Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında bu hastalığın görüldüğü rapor edilmiştir (Timur ve diğ., 2007). Avusturalya’da deniz flexibacteriosisine neden olan tür *Flavobacterium johnsoniae*’ün Asya levreği (*Lates calcarifer*) çiftliğinde deniz suyu sıcaklığının 27-28°C’ye ulaştığı dönemde %2-5 mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

Bakteriyel böbrek hastalığı (BKD) doğada bulunan ve yetiştiriciliği yapılan salmonid balıklarında genellikle yüksek mortaliteye neden olan sistemik bakteriyel bir enfeksiyondur. Korinebakteriyel balık hastalığı, salmonid böbrek hastalığı gibi isimlerle anılan ilk BKD raporu İskoçya’da 1930 yılında Atlantik salmon (*Salmo salar*) türünde tanımlanmıştır. Amerika’da ilk BKD raporu 1935 yılında Belding and Merrill tarafından dere salmonu (*Salvelinus fontinalis*) ve alabalık (*Salmo trutta*) kuluçkahanelerinde rapor edilmiştir (Sanders ve Fryer, 1980). Kanada’da ilk BKD 1937 yılında *Oncorhynchus clarkii* türünde saptanmıştır. Danimarka, Finlandiya, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya, Norveç, İsveç, Yugoslavya, İzlanda gibi batı Avrupa ülkelerinde, Japonya, Kuzey Amerika ve Şili’de hastalık rapor edilmiştir (Halaihel ve diğ., 2009).

Rickettsia-benzeri organizmaların hem tatlı su hem de deniz ortamında birçok balık türünde enfeksiyona sebep olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Lannan ve diğ., 1999; Chen ve diğ., 2000; Fryer ve Hedrick, 2003; Timur ve diğ., 2005; Timur ve diğ., 2011). İlk olarak Şili’de kültürü yapılan Coho salmon balıklarında enfeksiyona neden olduğu ve 1989’dan beri artış gösterdiği bildirilmiştir (Lannan ve diğ., 1999). Norveç’de Atlantik salmonu (*S. salar*)’nda, Fransa’da juvenil levrek (*D. labrax*), Tayvan’da tilapya balıklarında, orfoz balığında (*Epinephelus melanostigma*) hastalık etkeni olarak Rickettsia-benzeri organizma rapor edilmiştir (Chen ve diğ., 2000). Amerika, Kanada, Şili, İrlanda ve Norveç’de salmonidlerde (*S. salar*, *O. gorbusha*, *O.*

tshawytscha, *O. kisutch*, *O. mykiss*, *O. tshawytscha*, *O. masou*), beyaz levrek (*A. nobilis*) balığında *Piscirickettsia salmonis*'in neden olduğu enfeksiyonlar bildirilmiştir (Fryer ve Hedrick, 2003). Türkiye'de 2003 yılında Karadeniz'de yetiştiriciliği yapılan levrek balıklarında *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* ve *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ile birlikte karma enfeksiyona neden olarak bu etken rapor edilmiştir (Timur ve diğ., 2005). Daha sonra Ege Denizi'nde bir işletmedeki kültür levrek balıklarında da yoğun ölümlere neden olduğu tespit edilmiştir (Timur ve diğ., 2011).

Vibriosis Türkiye'de ve dünyada en yaygın görülen hastalıktır. Açık denizlerle bağlantısı olan kapalı kıyı su (östarin) ve deniz balığı artıklarıyla beslenen tatlı su balıklarında çok sık görülüşü rapor edilmiştir (Toranzo ve diğ., 2005; Candan ve Karataş, 2010; Actis ve diğ., 2011). İlk olarak 1718 yılında Bonaveri tarafından yılan balıklarında "kızıl veba" olarak tanımlanmış, Avrupa'da rapor edilen ilk bakteriyel balık hastalığıdır (Austin ve Austin, 2007). Bu hastalığın etkeni olan bakteriler, *V. anguillarum* (*Listonella anguillarum*), *V. ordalii* (*V. anguillarum* biyotip 2) (Schiewe ve diğ., 1981), *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela*), *V. harveyi* (*V. cairchariae*) (Kraxberger-Beatty ve McGarey 1990), *V. splendidus*, *V. cholerae* non-O1, *V. marinus* (*Moritella marina*), *V. ichthyenteri*, *V. logei*, *V. pelagius*, *V. trachuri*, *V. salmonicida* (Reed ve Floyd, 1996; Austin ve Austin, 2007), *V. tubiashii* (Hada ve diğ., 1984), *V. campbelli* (Tendencia, 2002), *V. nereis*, *V. parahaemolyticus*, *V. viscosus* (*Moritella viscosa*), *V. mediterrani*, *V. fischeri*, *V. chagasii*, *V. pomeroyi* ve *V. kanaloae* (Thompson ve diğ., 2003a) ve sınıflandırmaya sonradan katılan *V. xuii*, *V. braziliensis*, *V. neptunis* (Thompson ve diğ., 2003b), *V. tasmaniensis* (Thompson ve diğ., 2003c), *V. fortis* sp. nov. ve *V. hepatarius* (Thompson ve diğ., 2003d) gibi türlerdir.

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Gammaproteobacteria*

Order: *Vibrionales*

Family: *Vibrionaceae*

Genus: *Vibrio*

Vibrio türleri, Gram negatif, hareketli, kıvrık basil, 0,5-0,8 X 1,4-2,6 µm boyutlarında besiyerlerinde krem renginde, yuvarlak, kenarları düzgün koloniler oluşturan, fermantatif, oksidaz pozitif, genellikle O/129'a hassas bakterilerdir. Optimum 20-30°C'de üreme özelliği göstermelerine rağmen (Noga, 2010, Sarjito ve diğ., 2009; Actis ve diğ., 2011) tatlı sularda 1-4°C'de hastalık oluşturdıkları rapor edilmiştir (Yaman ve diğ., 2003). Bazı O/129'a (150 µg) dirençli *V. cholerae*, *V. damsela* gibi *Vibrio* türlerinin yanı sıra *V. harveyi* suşlarının O/129'a dirençli olabileceği bildirilmiştir (Alsina ve Balnch, 1994; Karunasagar ve diğ., 1994; Lopez ve diğ., 2009). Balıklardan izole edilen *Vibrio* türlerinin genel fenotipik özellikleri Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Baltık denizindeki yılan balıklarında (*Anguila anguila*) meydana gelen "kızıl veba" salgınının etkeni olarak *V. anguillarum* Bergman tarafından 1909 yılında teşhis edilmiştir. Amerika'da 1953 yılında rapor edilen vibriosis Rucker ve arkadaşları tarafından chum salmon (*O. keta*) balıklarından *V. anguillarum* izole edilmesiyle bildirilmiştir. Daha sonra deniz ve tatlı su balığı olan (salmonid, kalkan, levrek, çipura, ayu, morina ve kırmızı mercan gibi) 50'ye yakın türde birçok ülkede büyük kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Toranzo ve Barja, 1990; Actis ve diğ., 2011). Tüm dünyada gelişen su ürünleri yetiştiriciliğine paralel olarak farklı *Vibrio* türlerinin hastalık oluşturduğu görülmüştür.

İlk olarak Schiewe ve arkadaşları tarafından 1977 yılında *V. anguillarum* iki farklı biyotipe ayrılmış, daha sonra biyotip 2 olarak tanımlanan tür 1981 yılında *V. ordalii* olarak isimlendirilmiştir (Actis ve diğ., 2011). *V. ordalii* salmonid balıklarda, çipuralarda ve levreklerde vibriosis etkeni olarak Avrupa'da ve ülkemizde rapor edilmiştir (Colwell ve Grimes, 1984; Candan, 1991; Çağırğan ve Yürekli Türk, 1996; Akaylı, 2001; Toranzo ve diğ., 2005; Korun ve Timur, 2008).

Tablo 2.2: Balıklardan izole edilen patojen *Vibrio* türlerinin fenotipik özellikleri (Biosca ve diğ., 1991; Alsina ve Balnch, 1994; Holt ve diğ., 1994; Karunsagar ve diğ., 1994; Cerda-Cuellar ve diğ., 1997; Whitman, 2004; Buller, 2004; Hendlinger ve diğ., 2005; Lunder ve diğ., 2000; Austin ve Austin, 2007; Lopez ve diğ., 2009)

		<i>V. anguillarum</i> biyovar 1	<i>V. ordalii</i> (<i>V. anguillarum</i> biyovar 2)	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. pomeroyi</i>	<i>V. natrigens</i>	<i>V. Pelagius</i> (<i>Listonella pelagia</i>)	<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (<i>V. damsela</i>)	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>Moritella viscosa</i> (<i>V. viscosus</i>)	<i>V. wodanis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mediterrani</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. scophthalmi</i>	<i>Moritella marina</i> (<i>V. marinus</i>)
Düz çomak		-	d+	+	d	+	+	+	d+	-	+	d	d	d	d	d+	d	+	+	-	+	+	+	-	d
Hareket		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lüminesans		-	d	d	d	-	-	-	-	-	-	-	d	d+	-	-	-	-	-	-	-	d	d	?	-
Swarming		-	-	?	?	+	+	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-
Sitokrom oksidaz		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz		+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+
β-hemoliz		+	+	-	+	+	?	-	+	?	-	d	-	+	+	d	+	+	?	+	?	-	d-	?	+
O/F		F	F	F	F	F	?	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
O/129	10 µg	H	H	d	H	d	?	D	d	H	d	H	H	d	d	d	H	H	H	H	?	H	d	H	d
	150 µg	H	H	d	H	H	?	H	H	H	H	H	H	d	d	H	H	H	H	H	?	H	H	H	H
TCBS		S,Y	S	S,Y	S,Y	S	?	Y	Y	S	S/-	S,Y	Y	S	Y	S	Y	?	?	Y	?	?	d	?	-
WAM		S	S	S,M	?	?	?	-	-	?	?	?	?	?	?	S	?	?	?	?	?	?	?	?	?
ONPG		+	d	-	d	-	?	-	d-	+	d	+	-	d	-	+	+	+	?	d(s-)	?	?	d	-	-

Tablo 2.2.'nin devamı

	<i>V. anguillarum</i> biyovar 1	<i>V. ordalii</i> (<i>V. anguillarum</i> biyovar 2)	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. pomeroiyi</i>	<i>V. natriegens</i>	<i>V. Pelagius</i> (<i>Listonella pelagia</i>)	<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (<i>V. damsela</i>)	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>Moritella viscosa</i> (<i>V. viscosus</i>)	<i>V. wodanis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mediterrani</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. scophthalmi</i>	<i>Moritella marina</i> (<i>V. marinus</i>)
TDA	?	-	?	?	-	?	?	-	-	?	?	-	-	-	-	?	?	?	-	?	?	-	?	-
İndol	d+	d	+	d+	+	?	+	d+	+	-	+	-	d	-	d	d	-	d	d	?	-	-	-	-
Üre	-	-	d	d	d	?	-	t+	-	d	-	-	-	d+	-	-	+	d	-	?	d	d	?	d
MR	d	-	+	+	+	?	d	+	?	-	+	-	-	+	+	+	d-	+	+	?	d	d	?	d
VP	d	d	d	d	+	?	-	-	d	-	-	-	d	d	d	d-	-	-	-	?	-	d	?	-
Sitrat	d	d	d	+	d	+	d	d+	-	+	+	-	d	d-	d+	+	?	-	d	?	-	d	-	-
Nitrat	+	d	+	+	+	+	+	d+	+	+	+	-	d+	+	+	+	?	+	+	+	+	d+	+	+
Jelatin	+	d+	d	d+	d+	+	+	+	+	d	+	d	d+	d-	+	d+	+	+	+	-	d	d-	-	+
TSI	d	K/A, A/A	?	-	A/A	?	?	?	?	?	?	K/A	?	?	?	?	?	A/A	?	?	?	?	?	?
H ₂ S	-	-	-	-	d	?	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	?	?	-	?	-	-	?	-
Amilaz	+	+	+	d	d	+	+	+	?	d	d	?	+	?	d+	+	d+	+	+	?	-	d-	-	-
Eskülin	d	d-	-	+	d-	?	d	d-	?	+	-	d	d	-	d	-	?	d	-	?	+	d	?	+
McConkey	-	-	+	-	d+	?	?	+	?	?	?	?	+	+	+	+	?	?	d	?	?	-	?	-

Tablo 2.2'nin devamı

	<i>V. anguillarum</i> biyovar 1	<i>V. ordalii</i> (<i>V. anguillarum</i> biyovar 2)	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. pomeroiyi</i>	<i>V. narriegenis</i>	<i>V. pelagius</i> (<i>Listonella pelagia</i>)	<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (<i>V. damsela</i>)	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>Motiella viscosa</i> (<i>V. viscosus</i>)	<i>V. wodanis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mediterrani</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. scophthalmi</i>	<i>Moritella marina</i> (<i>V. marinus</i>)
Arginin	+	d	-	d	-	+	-	-	d+	-	-	-	-	+	+	d-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	d	-	d	d	-	+	-	d	d	-	d	-	d	d	-	-	d	-	d	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	d	d+	d+	-	+	+	-	+	?	d	+	-	d
Glukoz	+	+	+	+	d+	?	+	+	?	+	d	d	+	+	+	+	?	?	d	-	d+	d	?	d
Glukozdan gaz oluşumu	-	-	-	d	-	-	-	-	?	?	?	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	-	?	?
Arabinoz	d	d-	d	d	d-	-	-	d+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	d-	?	-	-	?	-
Maltoz	d	+	+	+	d+	?	+	+	?	+	+	d	d+	+	+	+		+	+	?	+	d	?	-
Mannitol	d+	d	+	+	d+	+	d	+	+	+	+	d	d+	-	+	d	-	d	d	?	d	d+	-	-
Sakkaroz	+	+	d	d-	+	-	-	-	+	+	d	-	+	-	+	-	-	+	d-	+	-	d-	+	-
Mannoz	+	d	d	d	d	+	d	+	+	d	d	d	d+	+	+	d	-	+	d+	?	d	d+	?	d-
İnositol	d	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-
Sorbitol	+	d-	d	d	-	+	-	-	-	-	-	d-	d-	-	-	d-	-	d	d-	+	d-	-	?	-
Galaktoz	d	d	d	d	d	-	-	+	+	+	+	d	d+	+	+	d+	+	d	+	+	+	+	?	+
Laktoz	-	d-	d	-	-	-	-	-	-	-	d	-	d-	-	-	d+	-	-	d	+	d-	-	?	-

Tablo 2.2'nin devamı

	<i>V. anguillarum</i> biyovar 1	<i>V. ordalii</i> (<i>V. anguillarum</i> biyovar 2)	<i>V. harveyi</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. pomeroiyi</i>	<i>V. natrigens</i>	<i>V. pelagius</i> (<i>Listonella pelagia</i>)	<i>V. salmonicida</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (<i>V. damsela</i>)	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>Motilla viscosa</i> (<i>V. viscosus</i>)	<i>V. wodanis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. mediterrani</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. scophthalmi</i>	<i>Moritella marina</i> (<i>V. marinus</i>)
Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	d-	-	?	-
Fruktoz	+	d	?	?	+	?	?	?	?	?	?	+	d-	?	?	?	?	+	?	?		+	?	?
Ramnoz	-	d-	-	-	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-	?	-
Melibioz	-	-	-	d	d-	-	?	-	?	d	-	-	d-	-	-	?	?	-	-	?	-	-	?	-
4°C' de üreme	-	d	-	d	-	-	-	-	-	d	d	+	d	-	-	-	?	+	-	-	+	-	-	+
37°C' de üreme	+	d	+	d	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	?	-	+	?	-	+	-	-
40°C' de üreme	-	-	d	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	d	d+	?	-	+	-	-	d-	-	-
44°C' de üreme	-	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-	-	-
NaCl içeren NB'de üreme	0%	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	+	-	-	-	?	-	-	?	-	-	-	-
	3%	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	?	+	+	+	+
	5%	+	+	+	?	+	?	+	+	+	+	-	+	+	+	+	?	-	+	?	+	+	-	+
	8%	-	-	d	-	+	?	-	+	+	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-	-	-
	10%	-	-	d	-	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-	-	-
	15%	-	-	-	-	?	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-	-	-	-

O= Oksidatif, F= Fermentatif, Z=Zayıf, D=Dirençli, H=Hassas, A=Asit K=Alkalin H₂S=Hidrojen sülfid üretimi, S=Sarı, Y=Yeşil, M=Mavi, d=değişken, d-=çoğu negatif, d+=çoğu pozitif, ?=belirsiz, s-= tuz varlığında negatif

Deniz salmon balıklarında ve çipura balıklarının yetiştiriciliğinde sıklıkla karşılaşılan, ayrıca kefal ve yılan balıklarından izole edilen *V. alginolyticus* ilk olarak İsrail’de rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 2003,). Juvenil kalkan balıklarında düşük de olsa mortaliteyle sonuçlanan solungaç hastalığına neden olduğu bildirilmiştir (Austin ve diğ., 1993). *V.vulnificus* yılan balıklarında vibriosis etkeni olarak Japonya (Tison ve diğ., 1982), İngiltere, İspanya (Biosca ve diğ., 1991; Fouz ve Amaro, 2003) ve Danimarka (Dalsgaard ve diğ., 1999) gibi bir çok ülkede rapor edilmiştir. *V. cholerae* ilk olarak Japonya’da Ayu balıklarında vibriosis etkeni olarak Muroga ve arkadaşları tarafından 1979 yılında bildirilmiştir (Kiiyukia ve diğ., 1992). *V. fischeri* çipura balıklarında ekzoftalmiye neden olan fırsatçı patojen olarak (Bordas ve diğ., 1996) ve İspanya’da kalkan balıklarında deride papilloma ve viseral neoplazi ile seyreden hastalık etkeni olarak (Candan ve Karataş, 2010) bildirilmiştir. *V. splendidus*, *V. fischeri* ve diğer *Vibrio* türleri ile birlikte İspanya’da yetiştiriciliği yapılan çipuralarda (Balebona ve diğ., 1998) ve kalkan balığı kuluçkahelerinde (Angulo ve diğ., 1994; Diggles ve diğ., 2000), İskoçya’da Atlantik salmonu ve kalkan balıklarında, Norveç’te salmon balıklarında bildirilmiştir (Candan ve Karataş, 2010). *V. harveyi* ABD’de çeşitli deniz balıklarında fırsatçı patojen olarak (Kraxberger-Beatty ve McGarey, 1990), Filipinler’de yetiştiriciliği yapılan *Lates calcarifer* türü levreklerde strese bağlı sekonder etken olarak (Tendencia, 2002), Tayvan’da kültürü yapılan deniz balığı *Rachycentron canadum* juvenillerinde büyük oranda mortalite nedeni olarak (Liu ve diğ., 2004), İspanya’da yetiştiriciliği yapılan çipuralarda primer vibriosis etkeni olarak rapor edilmiştir (Balebona ve diğ., 1998). Venezuela’da paneid karidesleri ve balıklarda *V. harveyi* türünün hastalık etkeni olarak teşhisinin yapıldığı bildirilmiştir (Alvarez ve diğ., 1998). İspanya’da sinagrit çiftliklerinde yüksek ölümlere neden olan hastalığın etkeni olarak diğer vibrio türleri ile birlikte *V. harveyi*’nin teşhis edildiğini bildirilmiştir (Company ve diğ., 1999). Juvenil ve büyük çipura ve levrek balıklarında ülseratif lezyonlar ile seyreden hastalığın etkeni olarak *V. harveyi* bildirilmiştir (Le Breton, 1999). İspanya’da dil balıklarında farklı yıllarda meydana gelen hastalık çıkışlarında hastalık etkeni olarak *V. harveyi* teşhis edildiği rapor edilmiştir (Lopez ve diğ., 2009). *V. cairchariae*’nin yalnız köpek balıklarında (*Carcharinus plumbeus*) ölümle sonuçlanan vibriosis etkeni olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 2007). *V. damsela* (*Photobacterium damsela*) sarıkuyruk, kalkan, çipura ve köpek balıklarında sistemik enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir (Fouz ve diğ. 1997; Candan ve Karataş, 2010). *V. parahaemolyticus* ve *V.*

alginolyticus'un Kızıl Deniz'de yetiştirilen çipura balıklarından izole edildiği ve birlikte mortaliteye neden oldukları bildirilmiştir (Leong ve Colorni, 2002). *V. parahaemolyticus* Çin'de tropikal deniz balığı olan *Larimichthys* türlerinde vibriosis etkeni olarak görüldüğü rapor edilmiştir (Noga, 2010). Salmonid balıklarında 1979'dan beri sistemik enfeksiyonlara neden olan *V. salmonicida*, Norveç, Kanada, İskoçya ve Amerika'da izole edilmiştir (Austin ve Austin, 2007). *V. pelagius* kalkan balığı larvalarında hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Villamil ve diğ., 2003, Ringø ve Vadstein, 1998). Bivalve'lerde patojen olduğu bildirilen *V. tubiashii* (Hada ve diğ., 1984), canlı yem ile beslenen juvenil çipura ve levreklerin mikroflorasında tespit edilmiştir (Grisez ve diğ., 1997). *V. logei* düşük sıcaklıklarda Atlantik salmonların eksternal lezyonlarından izole edilmiştir. *V. fischeri* hasta balıkların deri lezyonlarından ve tümürlü safra kanallarından izole edilerek % 39'una varan kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. *V. ichthyenteri* 1971 den beri Japonya'da kuluçkahanelerde yüksek mortaliteye neden olduğu rapor edilmiştir. (Austin ve Austin, 2007). Levrek balıklarında sekonder patojen olarak tespit edilen *V. campbelli* (Tendencia, 2002), fırsatçı patojen olarak bildirilen *V. marinus*, kalkan balıklarından İspanya'da izole edilmiş *V. pomeroyi* (Thompson ve diğ., 2003a) hastalık etkeni olarak bildirilen diğer vibrio türleridir.

V. anguillarum ve *V. vulnificus* Akdeniz'de en sık karşılaşılan Vibriosis hastalığının etkenleri olarak bildirilmiştir. Ülkemizde vibriosis ilk olarak *V. anguillarum*'un çipura balıklarında hastalık etkeni olarak tanımlanmıştır (Candan, 1993). Daha sonra çipura balıklarında *V. ordalii* çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Candan, 1993; Çağırğan ve Yüreklitürk, 1996; Akaylı, 2001; Türk, 2002). Kültür levrek balıklarında ise vibriosise neden olan Vibrio türleri *V. anguillarum* (Çağırğan ve Yüreklitürk, 1996; Akan ve diğ., 1996; Korun, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008), *V. ordalii* (Timur ve diğ., 2007; Korun ve Timur, 2008) *V. harveyi* (Korun ve Akaylı, 2004; Korun ve Timur, 2008) ve *V. alginolyticus* (Korun, 2008) olarak bildirilmiştir. Ayrıca Karadeniz'de kültürü yapılan Atlantik salmon balıklarında rapor edilmiştir (Candan, 2000). *V. anguillarum* genellikle deniz balıklarında hastalık etkeni olarak bildirilmesine rağmen son yıllarda tatlı suda kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında da hastalık etkeni olarak rapor edilmiştir (Timur ve Korun, 2004).

Hasta balıklarda deri rengine koyulaşma, vücut üzerinde nekrotik lezyonlar ve erimeler klinik bulgulardır. Nekrotik lezyonlar daha çok abdominal kaslarda, erimeler karın altında, yüzgeç kaidelerinde ve ağız etrafında görülür. Bazı balıklarda asites ve ekzoftalmus dikkati çeker. Kaudal yüzgeçte erime ve ülser görülür. Otopside karın duvarında, karaciğerde hemoraji bazen sararma ve enteritis (bağırsak iltihabı) görülür. Pilorik seka hiperemik ve bağırsakların içi açık renkli şeffaf bir sıvıyla doludur. Ayrıca dalak normalden oldukça büyüktür (Inglis, 1993; Akan ve diğ., 1996; Çağırgan ve Yüreklitürk, 1996; Alvarez ve diğ., 1998; Company ve diğ., 1999; Le Breton, 1999; Soffiento ve diğ., 1999; Akaylı, 2001; Tendencia, 2002; Timur ve Timur, 2003; Korun, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008; Lopez ve diğ., 2009; Noga, 2010; Actis ve diğ., 2011).

Deniz suyu sıcaklığı arttığında deniz mikrobiyal florasında *Vibrio* türlerinin sayısının arttığı bilinmektedir. Deniz balıklarının normal bağırsak florasında bulunur. Hastalığın ortaya çıkmasındaki en önemli nedenlerden biri olumsuz çevre faktörlerinden kaynaklanan strestir. Etken deri, solungaç ve anüs yoluyla girerek hastalığa neden olur. Aynı zamanda enfekte gıdaların ağız yoluyla alınmasıyla da bulaşır. Taze yemler pastörize edilmelidir. Ayrıca ağır metaller mucusu denatüre ederek hastalık oluşumunu kolaylaştırır (Yaman ve diğ., 2003; Sarjito ve diğ., 2009; Noga, 2010; Actis ve diğ., 2011).

Vibriosis akut ve kronik olarak görülebildiği bildirilmiştir. Balıkların tatlı su ve deniz suyundaki bakır (>30 g/ml) ve demir (>10 g/ml) moleküllerine maruz kalmaları hastalık çıkışının çevresel nedenleri olarak bildirilmiştir. Tedavi için oksitetrasiklin, nitrofuranlar, sülfanamidler ve oksolinik asitin başarılı bir şekilde kullanıldığı, fakat özellikle *V. anguillarum* ve *V. salmonicida* türlerinin bu kemoterapötiklere direnç geliştirdikleri rapor edilmiştir (Noga, 2010).

Vibriosis hastalığının tedavisinde ve koruyucu olarak antibiyotikler ve kemoterapötik ajanlar yeme ilave edilerek kullanılmaktadır. Son yıllarda yetiştiricilik koşullarında balıklar ticari vibriosis aşılı ile her yıl aşılanmalarına rağmen, özellikle Vibriosise karşı aşılanmış levreklerde (*D. labrax*) *V. anguillarum* ve *V. ordalii* türlerinden başka bazı *Vibrio* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar rapor edilmiştir. Bu nedenle Avrupa

su ürünleri yetiştiriciliğinde Vibriosis önemini hala korumaktadır (Pedersen ve diğ., 1999).

İlk kez Canestrini (1893) tarafından göç eden yılan balıklarında (*Anguilla vulgaris*) “kızıl veba hastalığı” etkeni olarak *Bacillus anguillarum* olarak tanımlanmıştır. Bu bakteriye *V. anguillarum* ismini 1909 yılında Bergman vermiştir. Baumann ve arkadaşları tarafından 1978 yılında *Benecka anguillara* biyotip 1 olarak yeniden isimlendirilmesi önerilmiştir. Daha sonra McDowell ve Cowell tarafından 1985 yılında *Listonella anguillarum* olarak isimlendirilmesi önerilse de halen *Vibrio* genusu içerisinde yer alması gerektiği bir çok araştırmacı tarafından savunulmaktadır (Austin ve Austin, 2007; Actis ve diğ., 2011).

Schiewe ve arkadaşları tarafından 1977 yılında *V. anguillarum* iki farklı biyotipe ayrılmış, daha sonra biyotip 2 olarak tanımlanan tür 1981 yılında *V. ordalii* olarak isimlendirilmiştir (Actis ve diğ., 2011). *V. anguillarum*’un belirlenmiş (O1- O23) yirmiden fazla farklı serotipi olduğu rapor edilmiştir (Boesen ve diğ., 1999). Dünya çapında özellikle morina balığı ve salmonid türü balıklarda hastalık oluşturan serotipleri O1, O2 ve O3 olarak bildirilmiştir (Noga, 2010). Levreklerde çoğunlukla serotip O1 ve O3, alabalıklarda serotip O1 ve O2’nin enfeksiyonlara yol açtığı (Yaman ve diğ., 2003; Korun ve Timur, 2008), ülkemizde son 15 yılda levreklerden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının genellikle serotip O1 olarak teşhis edildiği bildirilmiştir (Çağırğan, 2004).

V. anguillarum Vibrionaceae familyasının halofilik grubuna ait, Gram negatif, tek polar flagelası olan, 0,5 X 2 µm boyutlarında kıvrık çomak şeklinde, fakültatif anaerob, guanin ve sitozin (G+C) içeriği %43-46 olan, 25-30°C’de % 1,5 NaCl içeren TSA, BHI gibi zengin besiyerlerinde rahatça gelişebilen bir bakteridir. Katı besiyerinde yuvarlak düzgün, krem renkli koloniler oluştururlar (Timur ve Timur, 2003; Actis ve diğ., 2011). Sitokrom oksidaz, katalaz, ONPG (β- galaktosidaz), indol, nitrat, jelatin, amilaz, arjinin dihidrolaz, glukoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz testleri pozitif; lüminisans, üre, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu, laktoz, ksiloz, ramnoz ve melibioz testlerine negatif olarak sonuç verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Holt ve diğ. 1994; Whitman 2004; Buller, 2004; Austin ve

Austin, 2007). MR, VP, sitrat, TSI, eskülin, arabinoz, maltoz, inositol ve galaktoz testleri için bu araştırmacılar tarafından farklı sonuçlar bildirilmiştir. Öte yandan O/129'a hassaslık, TCBS agarda sarı ve yeşil koloni oluşturma, VAM (*Vibrio anguillarum* Medium) seçici besiyerinin rengini sarıya çevirerek sarı koloniler oluşturma, 37°C'de ve % 3-5 NaCl içeren besiyerinde gelişebilme özellikleri aynı araştırmacılar tarafından verilen benzer özelliklerdir (Tablo 2.2). Serotip 1 suşunun arabinoz testine pozitif sonuç verme eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Toranzo and Barja, 1990). Serotip 1, 2, 3, ve çevresel suşlar olan 4, 5 ve 7 'nin teşhis edilmesinde spesifik monoklonal antikor testi BIONOR Mono-Va, (BIONOR, Norveç) test kiti ile yapılması önerilmiştir.

V. harveyi düzgün çomak şeklinde, sitokrom oksidaz, katalaz, indol, MR, nitrat, amilaz, lizin dekarboksilaz, maltoz, mannitol, glukoz, mannoz testlerine pozitif; eskülin, arjinin dihidrolaz, glukozdan gaz oluşumu, inositol, ksiloz, ramnoz ve milibioz testlerine negatif; ONPG, üre, VP, sitrat, jelatin, ornitin dekarboksilaz, arabinoz, sakkaroz, sorbitol, galaktoz, laktoz testlerine değişken sonuç verdiği bildirilmiştir. TCBS agarda sarı ve yeşil gelişebilen suşlarının olduğu, VAM seçici besiyerinde sarı ve mavi gelişme gösterdiği rapor edilmiştir (Biosca ve diğ., 1991; Holt ve diğ., 1994; Buller, 2004; Lopez ve diğ., 2009). O/129'a hassaslık değişkenlik gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Baumann ve Schubert, 1984; Kraxberger-Beatty ve McGarey, 1990; Alsina ve Blanch, 1994; Karunasagar ve diğ., 1994; Balebona diğ., 1998; Liu diğ., 2004; Tendencia, 2002; Gomez-Gil ve diğ., 2004; López ve diğ., 2009; Haldar ve diğ., 2010; Zhou diğ., 2012). Noguerola ve Blanch (2007) tarafından lizin ve ornitin dekarboksilaz testinin pozitif, arjinin dehidrolaz testinin negatif olduğu rapor edilmiştir.

Karunasagar ve diğ. (1994) tarafından *V. harveyi*'nin diğer dirençli *Vibrio* türleri olan *V. cholerae* ve *V. parahaemoliticus* gibi O/129'a karşı direnç kazanmış olabileceği rapor edilmiştir. Zhou ve arkadaşları (2012) tarafından hasta karideslerden izole edilen virülensi yüksek ve limünisans özellik göstermeyen *V. harveyi* suşlarının O/129'a hassas oldukları tanımlanmıştır. Kraxberger-Beatty ve McGarey (1990) zargana balıklarında yapmış oldukları çalışmada fırsatçı patojen olan *V. harveyi*'nin tüm suşlarının O/129'a hassas olduğunu rapor etmişlerdir. Liu ve arkadaşları (2004) tarafından Tayvan'da kültürü yapılan deniz balığı olan *Rachycentron canadum* juvenillerinde büyük oranda mortalite nedeni olan *V. harveyi* (= *V. carchariae*)'nin

O/129'a hassas olduğu ve TCBS agarda sarı geliştikleri bildirilmiştir. Tendencia (2002) Filipinler'de yetiştiriciliği yapılan *Lates calcarifer* türü levreklerde strese bağlı sekonder etken olarak bildirdiği *V. harveyi* suşlarının O/129'a hassas olduğunu ve referans olarak aldığı Baumann ve Schubert (1984) suşlarında 10µg etken madde içeren O/129'a dirençli olduklarını rapor etmiştir. Balebona ve arkadaşları (1998) tarafından İspanya'da yetiştiriciliği yapılan ipuralarda primer vibriosis etkeni olarak rapor edilen *V. harveyi* suşlarının 10µg etken madde içeren O/129'a dirençli olduklarını bildirilmiştir. Gomez-Gil ve arkadaşları (2004) tarafından *V. harveyi* ve yakın türlerinin teşhisini moleküler yöntemlerle yapmış oldukları çalışmada tüm suşların 10µg etken madde içeren O/129'a dirençli olduğu bildirilmiştir. Lopez ve arkadaşları (2009) tarafından dil balıklarında görölen vibriosis etkeni olarak teşhis edilen *V. harveyi* suşlarının tamamının O/129'a (10 µg ve 150 µg) dirençli oldukları rapor edilmiştir.

V. alginolyticus ve *V. harveyi* birbirinden gülölkle ayırt edilmektedir. VP testi ile ayırt edilebileceğini ve ek olarak glukuronat fermentasyonuna bakılması gerektiği bildirilmiştir. *V. alginolyticus* MSA-B (deniz tuzu içeren kanlı agar) besiyerinde 25°C'de 24 saat inkübasyon sonucunda yayılarak geliştiği, 42°C'de gelişebildiği, D-Glukronat ve üre testine negatif sonuç verdiği, *V. harveyi*'nin ise daha yavaş geliştiği ve üre testine genellikle (%50) pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir (Buller, 2004).

İki çeşit biyovarı bulunan *V. splendidus* hareketli, fermentatif, Gram negatif omak şekilli bir bakteri olarak tanımlanmıştır. TCBS agarda yeşil ve sarı koloniler oluşturduğu (Zifeng ve diğ., 2009), her iki biyovarın da balıklarda hastalık oluştuduğu bildirilmiştir. Guanin ve sitozin oranı (G+C) % 45,5 – 47,8 moldür. (Austin ve Austin, 2007). *V. splendidus* türüne ait diğer fenotipik özellikler Tablo 2.2'de verilmiştir.

Deniz balıklarında görölen önemli bakteriyel patojenlerin dışında çok yaygın olmamakla birlikte *Pseudoalteromonas* ve *Psycrobacter* genusuna ait bakterilerin neden olduğu hastalıklar rapor edilmiştir (Bein, 1954; Nelson ve Ghiorse tarafından 1999; Hisar ve diğ., 2002)

Bir deniz bakteri genusu olan *Pseudoalteromonas* sayısız türler içerir. Bu türler iki sebeple ilgi çekmiştir. Öncelikle büyük bir kısmı sıklıkla balıklar, mollusklar,

tunikatlar, süngerler, mikro – makroalgler gibi ökaryotik deniz konaklarında bulunurlar. İkinci olarak, *Pseudoalteromonas* türlerinin birçoğu fouling organizmaların geniş bir hedefi olan biyolojik olarak aktif bileşikler üretirler. Bu biyoaktif bileşikler antibakteriyel, algisidal, antifungal, agarolitik ve antiviral etki gösterirler. *Pseudoalteromonas* genusunun bazı üyeleri dikkat çeken fizyolojik özellikler taşırlar. Bazı türlerin güçlü toksinler üreterek ve agarolitik enzimler salgılayarak balıklarda hastalığa neden olduğu, bazı türlerin de daha az öldürücü ve hatta onların doğal konakları için yararlı oldukları bildirilmiştir (Holmström ve Kjelleberg, 1999; Skovhus, 2004; Bowman, 2007).

Pseudoalteromonas genusuna ait toplam 39 tür mevcuttur (LBSN, 2012). Daha önce *Alteromonas* genusuna ait olan (*P. atlantica*, *P. aurantia*, *P. carrageenovora*, *P. citrea*, *P. denitrijicans*, *P. distincta*, *P. elyakovii*, *P. espejiana*, *P. haloplanktis*, *P. tetraodonis*, *P. luteoviolacea*, *P. nigrifaciens*, *P. rubra*, *P. undina*) 14 tür *Pseudoalteromonas* genusu altında toplanmıştır (Gauthier, 1995; LPSN, 2012). *P. sagamiensis* Nam ve diğ. (2007) tarafından *Pseudoalteromonas* genusundan çıkartılarak *Algicola sagamiensis* olarak yeniden sınıflandırılmıştır. *Pseudoalteromonas* türlerine ait önemli bazı özellikler Tablo 2.3’de özetlenmiştir (Gauthier, 1995; Bozal ve diğ., 1997; Nelson ve Ghiorse, 1999; Sawabe, 1998; Holmström ve Kjelleberg, 1999; Skovhus, 2004; Bowman, 2007).

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Gammaproteobacteria*

Order: *Alteromonadales*

Family: *Pseudoalteromonadaceae*

Genus: *Pseudoalteromonas*

Alteromonas genusu altında incelenen *Pseudoalteromonas* 0,7-1,5 µm çapında ve 1,8-3,0 µm uzunluğunda hafif kıvrık çomaklardır. Mikroist ya da endospor oluşturmazlar. Gram negatif, tek polar flegellası ile hareketlidir. Glukoz gibi maddeleri fermente edebilmesi için oksijene ihtiyaç duyar. Bazı suşlar 4°C’de, bütün suşlar 20°C’de gelişebilir iken hiç biri 35°C’de gelişemez. Koloniler pigment içermezler. Nitratı nitrite

indirgemez, denitrifikasyon yapmazlar. Gelişmek için deniz suyuna ihtiyaç duyarlar. Jelatin, lipaz ve kitinaz üretirler fakat aljinaz üretmezler. Bazı suşlar amilaz üretir. Sukroz, maltoz, asetilglukozamin, süksinat, fumarat ve tirozin gibi karbon kaynaklarını kullanırlar. Mannoza, galaktoza, fruktoza, selobioza, melibioza, laktoza, eritritol, mannitol, gliserol, salisin, glukonat, laktat, sitrat, sorbitol, malat, ketogutarat ve hidroksibenzoat gibi kaynakları kullanmazlar. Arjinin dihidrolaz negatiftir. Yaşam alanları açık okyanuslar ve kıyı sularıdır (Holt ve diğ., 1994).

Pseudoalteromonas genusu Gram negatif, aerobik, deniz bakterisi olan ve fenotipik özellikleri nedeniyle önceden Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ve The Prokaryotes kitaplarında *Alteromonas* genusuna dâhil edilmiştir. *Pseudoalteromonas* türleri Gram negatif, spor oluşturmeyen, 0,2-5 X 1,8-3 µm boyutlarında düz ya da kıvrık çomaklardır. *P. luteoviolacea* ve *P. denitrificans* gibi çoğu türü tek polar flagellası ile hareketli ve liminisans özellik göstermezler. Birçok türü pigment oluşturur. Zorunlu aerobiklerdir. Oksidaz pozitif, katalaz aktivitesi değişken ve genellikle zayıftır.

Bütün türler 20°C'de gelişebilir. Yalnızca bir tür (*P. denitrificans*) denitrifikasyon yapabilir. Hiçbir suş arjinin dihidrolaz aktivitesi göstermez. Bütün suşlar gelişmek için deniz suyuna ihtiyaç duyarlar. Çoğu suş organik besleyici faktörlere ihtiyaç duyar. *P. atlantica*, *P. aurantia*, *P. carrageenovora*, *P. citrea*, *P. denitrificans*, *P. espejiana*, *P. haloplanktis* subsp. *haloplanktis*, *P. haloplanktis* subsp. *tetraodonis*, *P. luteoviolacea*, *P. nigrifaciens*, *P. piscicida*, *P. rubra*, *P. undina*' dan oluşan 12 türün jelatin, lipaz, lektinaz, DNaz aktiviteleri ve glukoz kullanımı pozitif; riboz, ramnoz, turanoz, salisin, glukonat, glukuronat, gliserat, eritritol, sorbitol, mozoinositol, adonitol, valin, ornitin dekarboksilaz ve hidrobenzonat kullanımı negatif olduğu bildirilmiştir (Gauthier ve diğ., 1995).

Pigment, denitrifikasyon ve gaz oluşumu, nişasta, kitin, agar ve aljinat hidrolizi, 4 ve 35°C'de gelişme, arjinin dihidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz, glukoz, mannoza, fruktoza, sukroza, maltoza, selibioza, laktoza, glukonat, pruvat, fumarat, gliserol, ramnoz, sitrat kullanımının *Pseudoalteromonas* türlerinde değişken özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Ivanova ve diğ., 1998). 72 saat inkübasyon sonunda pigment oluşumu gösterdikleri (Bein, 1954), çevresel *Pseudoalteromonas* türlerinin çoğunun pigment

içermeyen koloniler oluşturduğu bildirilmiştir. Antartik kıyı sularından izole edilen *P. antarctica* sp. nov.'nın pigment oluşturmadığı, *P. nigriyaciens* türünün melanin pigmentine sahip olduğu bildirmiştir (Bozal ve diğ., 1997) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: *Pseudoalteromonas* türlerinin bazı önemli özellikleri (Gautheier, 1995; Bozal ve diğ., 1997; Nelson ve Ghiorse, 1999; Sawabe, 1998; Holmström ve Kjelleberg, 1999; Skovhus, 2004; Bowman, 2007)

Tür	Teşhis eden kişi ve tarih	Kaynak	Pigment	Etki alanı
<i>P. flavipulchra</i>	Ivanova ve diğ., 2002	deniz	+	(turuncu)
<i>P. elyakovii</i>	(Ivanova ve diğ., 1997) Sawabe ve diğ., 2000	midye, deniz algi	-	-
<i>P. donghaensis</i>	Oh ve diğ., 2011	-	-	-
<i>P. distincta</i>	(Romanenko ve diğ., 1995) Ivanova ve diğ., 2000	sünger	± (melanin)	-
<i>P. byunsanensis</i>	Park ve diğ., 2005	Gelgit düzlüğü, sediment	-	-
<i>P. arctica</i>	Al Khudary ve diğ., 2008			-
<i>P. aliena</i>	Ivanova ve diğ., 2004	deniz	+	Anti-tümörojenik aktivite - Ehrlich Asitli karsinom hücre hattı inhibe
<i>P. agarivorans</i>	Romanenko ve diğ., 2003	Deniz, tunikat	-	Algal plisakkaritler
<i>P. issachenkonii</i>	Ivanova ve diğ., 2002	deniz algi	-	Anti-fungal activite; hemolitik
<i>P. lipolytica</i>	Xu ve diğ., 2010			
<i>P. maricaloris</i>	Ivanova ve diğ., 2002	sünger	+	(sarı) Antibakteriyel aktivite; Deniz kestanelerine karşı sitotoksiste
<i>P. marina</i>	Nam ve diğ., 2007	gelgit düzlüğü, sediment	-	-
<i>P. mariniglutinosa</i>	(Berland ve diğ., 1969) Romanenko ve diğ., 2003	diyatomlar	-	-
<i>P. paragorgicola</i>	Ivanova ve diğ., 2002	sünger	-	-
<i>P. peptidolytica</i>	Venkateswaran ve Dohmoto 2000	deniz	+	(sarı) Antibakteriyel activite, hemolitik
<i>P. phenolica</i>	Isnansetyo ve Kamei 2003	deniz	+	(kahverengi) Antibakteriyel aktivite
<i>P. piscicida</i>	(Bein 1954) Gauthier ve diğ., 1995	Haliç suları, balık	+	(sarı) Antibakteriyel; algisidal aktivite; muhtemel sitotoksiste [fırsatçı balık patojeni; trombolitik enzimler]
<i>P. prydzensis</i>	Bowman, 1998	-	-	-
<i>P. ruthenica</i>	Ivanova ve diğ., 2002	kabuklular	+	(soluk turuncu) Antibakteriyel aktivite
<i>P. spongiae</i>	Lau ve diğ., 2005	sünger	+	(soluk turuncu) <i>Hydroides elegans</i>
<i>P. tetraodonis</i>	(Simidu ve diğ., 1990) Ivanova ve diğ., 2001	Kirpi balığı	-	Nörotoksik etkiler
<i>P. tunicata</i>	Holmström ve diğ., 1998	deniz algi, tunicates	+	(yeşil, mor, sarı) Anti-fungal, anti-algal, antimikrobiyel, omurgasız larvaları ve alg sporlarının yerleşimini engeller; protistler inhibe eder
<i>P. ulvae</i>	Egan ve diğ., 2001	deniz algi	+	(mor) omurgasız larvaları ve alg sporlarının yerleşimini engeller; protistler inhibe eder
<i>P.translucida</i>	Ivanova ve diğ., 2002,	deniz	-	-

Tablo 2.3'nin devamı

Tür	Teşhis eden kişi ve tarih	Kaynak	Pigment	Etki alanı
<i>P. antarctica</i>	Bozal ve diğ., 1997,	deniz, buzullar, çamurlu toprak, sediment	-	polisakkaritler, soğuk-aktif enzimler
<i>P. atlantica</i>	(Akagawa-Matsushita ve diğ., 1992) Gauthier ve diğ., 1995	deniz, deniz algi	-	Yengeçlerde fırsatçı patojen [algal polisakkaritlerin güçlü indirgeyicisi]
<i>P. aurantia</i>	(Gauthier and Breittmayer 1979) Gauthier ve diğ., 1995	Ulva Lactuca yüzeyi, deniz	+ (sarı)	Antimikrobiyel aktivite; omurgasız larvalarının yerleşmesini engeller
<i>P. bacteriolytica</i>	Sawabe ve diğ., 1998	-	-	Deniz yosunu <i>Laminaria japonica</i> 'nın kırmızı benek hastalığı etkeni
<i>P. carrageenovora</i>	(Akagawa-Matsushita ve diğ., 1992) Gauthier ve diğ., 1995	deniz, deniz algi	-	[algal polisakkaritlerin güçlü indirgeyicisi]
<i>P. citrea</i>	(Gauthier, 1977) Gauthier ve diğ., 1995	deniz, midye, tunikatlar, süngerler	+ (sarı)	omurgasız larvalarının yerleşmesini engeller; deniz kestanesine karşı sistotoksik etki [algal polisakkarit bozulması]
<i>P. denitrificans</i>	(Enger ve diğ., 1987) Gauthier ve diğ., 1995	deniz	+ (kırmızı)	Anti-tumoriyenik aktivite; T-hücresi'ni engeller/ Lenfosit çoğalması; anti-sıtma aktivitesi; deniz kestanesinin <i>Heliocidaris erythrogrammag</i> yerleşimini yardımcı olur; denitrifikasyon.
<i>P. espejiana</i>	(Chan ve diğ., 1978) Gauthier ve diğ., 1995	deniz	-	-
<i>P. haloplanktis</i>	(ZoBell and Upham 1944) Gauthier ve diğ., 1995	deniz	-	[kabuklulara probiyotik yarar; Soğukta çalışan enzimler]
<i>P. haloplanktis</i> <i>subsp. haloplanktis</i>	(ZoBell and Upham 1944) Gauthier ve diğ., 1995	-	-	-
<i>P. haloplanktis</i> <i>subsp. tetraodonis</i>	Simidu ve diğ., 1990	-	-	-
<i>P. luteoviolacea</i>	(Gauthier 1982) Gauthier ve diğ., 1995	deniz, deniz algi	+ (mor, sarı)	Antimikrobiyel aktivite; algal sporların yerleşmesini engeller; denizkestanesine karşı sitotoksik etki <i>Strongylocentrotus</i> <i>intermedius</i> ; denizkestanesinin <i>Heliocidaris erythrogrammag</i> yerleşimini yardımcı olur
<i>P. nigrifaciens</i>	(Baumann ve diğ., 1984) Gauthier ve diğ., 1995	deniz, tuzlu gıdalar, midye	± (melanin)	-
<i>P. rubra</i>	(Gauthier 1976) Gauthier ve diğ., 1995	deniz	+ (kırmızı)	Antimikrobiyel aktivite; antitumoriyenik aktivite; T-hücresi'ni engeller /lenfosit çoğalması; anti-sıtma; bronchodilatatoricef
<i>P. undina</i>	(Chan ve diğ., 1978) Gauthier ve diğ., 1995	deniz, balık	-	hemolitik; [probiyotik yarar; fırsatçı balık patojeni]

Sarı pigment üreten *P. piscicida*'nın nöromuskular toksin üreterek çeşitli balıklarda ve yengeç türlerinde ölüme neden oldukları bildirilmiştir. Ancak bu özelliği doğrulayan ya da yeniden inceleyen yeni bir çalışmanın olmadığı ve toksin bileşiğinin tespit edilemediği, bunun yanında *P. undina* ve *P. piscicida*'nın nadir de olsa fırsatçı patojen olarak görüldüğü rapor edilmiştir (Bowman 2007) (Tablo 2.3).

İki Papaz balığı (*Pomacentridae*) türü olan *Amphiprion clarkii* ve *Amblyglyphidodon curacao* yumurtasından *P. piscicida* izole edildiği Nelson ve Ghiorse tarafından 1999 yılında rapor edilmiştir. Balık patojeni olarak bilinen bu türün teşhisinin 16S rDNA karşılaştırmalı dizi analizi ile yapıldığı belirtilmiştir. Balıklardan *P. piscicida* ile birlikte *V. parahaemolyticus* ve *V. anguillarum* izole edildiği, *A. clarkii* ve *A. curacao* yumurtalarının mortalite artışının *P. piscicida* ile ilişkili olduğunu ortaya koymutur. (Nelson ve Ghiorse, 1999). *P. piscicida* ilk olarak Bein tarafından 1954 yılında *Flavobacterium piscicida* olarak Florida'da deniz kültür balıklarında ölümlere neden olduğu rapor edilmiştir. Daha sonra Gauthier ve arkadaşları 1995 yılında *P. piscicida* olarak tanımlamıştır (Nelson ve Ghiorse, 1999).

Psychrobacter 1986 yılında Juni ve Heym tarafından tanımlanarak isimlendirilmiştir (Juni ve Heym, 1986). Önceleri *Morexella* benzeri organizma olarak tanımlanmışlardır. Rossau ve arkadaşları tarafından *Moraxella* ve *Acinetobacter* (*Achrurnubacter*) genusları ile olan ilişkileri moleküler yöntemlerle ortaya konmuştur (Bowman ve diğ., 1996).

Güncellenmiş son taksonomik listeye göre toplam *Psychrobacter* genusuna ait 34 adet tür bildirilmiştir: *Psychrobacter adeliensis*, *P. vallis*, *P. salsus*, *P. aestuarii*, *P. alimentarius*, *P. aquimaris*, *P. celer*, *P. aquaticus*, *P. arcticus*, *P. arenosus*, *P. maritimus*, *P. cibarius*, *P. cryohalolentis*, *P. faecalis*, *P. fozii* (Bozal ve diğ., 2003), *P. frigidicola* (Bowman ve diğ., 1996), *P. fulvigenes*, *P. glacincola*, *P. immobilis*, *P. jeotgali*, *P. luti* (Bozal ve diğ., 2003), *P. lutiphocae*, *P. marincola*, *P. namhaensis*, *P. nivimaris*, *P. okhotskensis*, *P. pacificensis*, *P. phenylpyruvicus*, *P. piscatorii*, *P. proteolyticus*, *P. pulmonis*, *P. sanguinis*, *P. submarinus*, *P. urativorans* (Bowman ve diğ., 1996). Bøvre ve Henriksen tarafından 1967 yılında *M. phenylpyruvica* olarak tanımlanan tür

Bowman ve diğ. (1996) tarafından *P. phenylpyruvicus* olarak yeniden isimlendirilerek *Psychrobacter* genusuna dâhil edilmiştir (LPSN, 2012; Leibniz Institute DSMZ, 2012).

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Gammaproteobacteria*

Order: *Pseudomonadales*

Family: *Moraxellaceae*

Genus: *Psychrobacter*

BHI agarada düz ve opak kolaoniler oluşturdıkları (Holt ve diğ., 1994), TSA'da krem, hafif konveks, düzgün, 2-3 mm çapında 10°C'de 3-7 gün içerisinde gelişebildikleri bildirilmemiştir (Bowman ve diğ., 1996). Gram negatif, 0,9-1,3X1,5-3,8 µm boyutlarında, hareketsiz, pigmentsiz, sporsuz, aerobik kokobasil, nadiren uzunca olabilen bakterilerin, katalaz ve oksidaz pozitif, çoğunun psikrofilik olduğu (Holt ve diğ., 1994), -10°C ile 42°C'de gelişebildikleri (Ayala-del-Río ve diğ., 2010), 5°C'de ve optimum 20°C'de gelişebilirken, nadiren 35-37°C'de gelişemedikleri, 35-37°C'de gelişebilen suşların insan ve hayvandan izole edilmiş patojen türleri mevcut olduğu, çoğu suşun glukozdan ve diğer şekerlerden asit üretebildikleri, *P.immobilis* türüne ait çoğu suşun aerobik olarak glukozdan asit ürettiği ve birkaç farklı şeker, deamin fenilalanin ve triptofan, üre, nitrat ve tween 80 gibi testlerinin pozitif olduğu. fruktoz, sukroz ve amilaz testlerinin negatif olduğu bildirilmiştir (Holt ve diğ., 1994). Ayrıca çeşitli API test kitleri ile biyokimyasal özellikleri doğrulanarak doğru teşhis yapılabildiği gibi Lipopolisakkarit (LPS) tayini, DNA analizi ve kompozisyonunun belirlenmesi, DNA-DNA hibritlenmesi ve filogenetik analizler ile doğru ve kesin teşhisin yapılabildiği rapor edilmiştir (Bozal ve diğ., 2003).

Çevresel ve klinik izolatları olan *Psychrobacter* genusuna ait türler çeşitli işlenmiş gıdalarda, balık ve et üretim prosesinde kontamine ürünlerle ilgili oldukları (Holt ve diğ., 1994), fermente su ürünlerinden izole edildikleri (Jung ve diğ., 2005), tavuk gibi kümes hayvanlarından, balıklardan ve soğuk deniz suyundan (Pasifik ve Atlantik okyanusu) izole edildikleri bildirilmiştir (Bozal ve diğ., 2003). Soya küspesi ile beslenen Atlantik morina (*Godus morhua*) balıklarının gastrointestinal kanalından izole

edilen *Psychrobacter* türlerinin normal bağırsak florasını oluşturdıkları rapor edilmiştir (Ringø ve diğ., 2006). Balıklarda yem ile birlikte uygulanan probiyotik olarak kullanıldığı, büyüme üzerinde, diyet yönetiminde ve immün sistemin güçlenmesinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Sun ve diğ., 2011). Şili’de tatlı suda yetiştirilen Atlantik salmon çiftliğinde fingerlinglerden, pelet yemlerden ve sudan izole edilen aerobik bakterilerin *Psychrobacter* genusuna ait iki farklı tür (*P. glacincola* ve *P. pacificens*) oldukları rapor edilmiştir (Armstrong ve diğ., 2005). Doğal olarak enfekte olmuş gökkuşağı alabalıklarından (*O. mykiss*) izole edilmiş *P. immobilis*’in patojenitesinin deneysel olarak enfekte edilmiş alabalıklarda hastalık semptomlarına rastlanmış fakat hastalığın ölümle sonuçlanmadığı rapor edilmiştir (Hisar ve diğ., 2002).

2.2. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA TEŞHİS YÖNTEMLERİ

Hastalıklar ile mücadelede en önemli unsur, işletmedeki hastalık etkenini en kısa sürede tanımlamak ve kontrol altına almaktır. Balık hastalıklarının doğru teşhis edilebilmesinde anemnez bilgilerinin doğru alınması kadar kaba klinik bulgular, mikrobiyolojik, histopatolojik, serolojik, moleküler biyolojik ve diğer bulguların diagnostik sentezinin de yapılması önemlidir. Balıklarda patojen bakterilerin teşhisi için visceral organlardan bakteriyolojik besiyerlerine ekimler yapılarak izolasyon gerçekleştirilir. Daha sonra da elde edilen saf kültürler morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal, serolojik ve moleküler testlere tabi tutularak teşhis gerçekleştirilir (Timur ve Timur, 2003; Whitman, 2004; Austin ve Austin, 2007).

2.2.1. Rutin Bakteriyolojik Yöntemler

Bakterilerin izole edilmesi yapay besiyerleri kullanılarak başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Saf kültür elde etmek için genel ve seçici besiyerlerinin kullanılması tercih edilmektedir. Bakteri kültürleri sıvı ve katı besiyerlerinde yapılmaktadır. Agar besiyeri kullanılarak azaltma yöntemi ile bakterilerin koloni yapısı, şekli, rengi gibi koloni morfolojisine dayalı ilk tanımlama gerçekleştirilmektedir. Bakteriyel izolasyon çok spesifik bir tanı yöntemidir. Ancak bazı bakteriler yapay besiyerlerinde gelişmemektedir (Whitman, 2004; Çotuk, 2003).

Bakterilerin hücre morfolojilerinin belirlenmesi Gram boyama yöntemi ile yapılmaktadır. Ayrıca bu yöntem ile bakterilerin en temel sınıflandırılması yapılmış olur. Balıklarda patojen olan bakterilerin Gram pozitif ve Gram negatif olarak genel ayrımı yapıldıktan sonra katalaz üretimi, sitokrom oksidaz reaksiyonu, oksidasyon-fermentasyon (O/F), O/129 (10 µg ve 150 µg) hassasiyet, glukoz testi, indol üretimi, Metil-red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri, lizin ve ornitinden dekarboksilaz üretimi, arjinin dihidrolaz üretimi, eskülin üretimi, sitrat kullanımı, nitrat redüksiyonu, amilaz, jelatin, üreaz üretimi, β-galaktosidaz (ONPG), şeker fermentasyon testleri, farklı tuzluluk (% 0, 3, 5, 8, 10 ve 15) ve sıcaklık (4, 37 ve 44°C) toleranslarının belirlenmesi gibi bazı biyokimyasal testler kullanılmaktadır (Timur ve Timur, 2003; Çotuk, 2003; Whitman, 2004; Buller, 2004).

Koagülasyon stafilokokların ayrımında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştıran koagülaz enzimi (stafilokoagülaz) ile patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılmaktadır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon göstermektedir (Bekker, 1946). Ancak koagülazın patojenite ile ilişkisi de tam olarak aydınlatılmamıştır (Otto, 2004). Ayrıca *Staphylococcus* genusu içinde koagülaz pozitif olan *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudointermedius*, *S. schleiferi* subs. *coagulans* ve koagülaz değişken olan *S. hyicus* türleri bulunmaktadır. Memeli plazmasını pıhtılaştırmak stafilokoklar içinde sadece *S. aureus*'a özgü bir özellik olmadığı ve bu türün bazı suşlarının da plazmayı pıhtılaştırmadığı bildirilmiştir (Bayraktar ve diğ., 2004). Lam koagülaz testinde sadece bağlı koagülaz (kümeleşme faktörü) tespit edilebilirken, tüp koagülaz testiyle hem serbest koagülaz hem de bağlı koagülaz tespit edilebilmektedir. Bu nedenle tüp koagülaz testinin daha güvenilir sonuç verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Whitman, 2004). Son yıllarda geliştirilen tavşan plazması kullanılarak yapılan tüp koagülaz testi insan hekimliği laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmakta ve oldukça güvenilir sonuçlar alınmaktadır (Bayraktar ve diğ., 2004; Turgay, 2009).

Rutin bakteriyolojik yöntemlerin yanı sıra önceleri insan hekimliğinde sonra veteriner hekimlikte kullanılan, daha sonra da balık patojenlerinin teşhisinde de kullanılmaya

başlayan, hızlı teşhise olanak sağlayan API hızlı tanı kitleri kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 2007). Günümüzde balık patojeni olan bakterilerin teşhisinde API hızlı tanı kitleri biyokimyasal testlerden kısa sürede sonuç alabilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gram negatif ve fermentatif basillerin teşhisinde API 20E, API 10S, Gram negatif ve fermentatif olmayan basillerin teşhisinde API 20NE; *Neisseria haemophilus* türününün teşhisinde API NH; *Campylobacter* türlerinin teşhisinde API Campy; Gram pozitif basiller olan *Clostridium* türlerinin teşhisinde API 20 A, *Corynebacterium* türlerinin teşhisinde API Coryne, *Listeria* türlerinin teşhisinde API Listeria, *Bacillus* türlerinin teşhisinde API 50 CHB/E, *Lactobacillus* türlerinin teşhisinde API 50 CHL; Gram pozitif kokların teşhisinde API Staph ve API Strep; *Enterobacteriaceae* üyelerinin teşhisinde RapiD 20E; 49 karbonhidrat reaksiyonunu tanımlayan API 50 CH ve enzimatik aktiviteleri tanımlayan API ZYM teşhisin yanı sıra 19 enzimatik reaksiyonun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Biomerieux, 2012).

2.2.2. Aglütinasyon Yöntemleri

Patojen bakterilerin teşhis edilmesinde biyokimyasal testleri destekleyecek serolojik yöntemler mevcuttur. Aglütinasyon, hemagglütinasyon, presipitasyon, kompleman fiksasyon testleri, nötralizasyon, Florasan Antikor Tekniği (FAT), Radioimmüno tekniği (RIA), Enzim Bağlayıcı İmmunosorbent teknik (ELISA; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Nokta-leke tekniği (Dot-Blot) gibi serolojik yöntemler balık hastalıkları teşhisinde kullanılan serolojik yöntemlerdendir (Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Aglütinasyon, uygun bir sıvı ortamda, partiküler formdaki antijenlerle antikorların bağlandıktan sonra kümeler oluşturarak bir arada kümelenmesidir. Laboratuvar şartlarında, aglütinasyon iki amaca yönelik olarak yapılmaktadır. Bunlardan ilki, antijen olarak kullandığımız bilinen bir bakteri veya hücre süspansiyonunu ayıraç olarak kullanarak, serumda buna karşı oluşmuş antikorları saptayamaya dayalı bir tekniktir. Bu test kan serumundaki antikorların atijen veya antijen taşıyıcıları ile birleşerek gözle görülebilir kümeler oluşturmasını sağlar. Diğeri ise bilinen antikorların bulunduğu bağışık serumlar ayıraç olarak kullanıp izole edilmiş bir bakterinin antijenik yapısını ortaya koyarak onu teşhis etmeye dayalı bir yöntemdir. Sıvı ortamda antijen ve

antikorlar birbirlerine yapışarak gözle görülebilecek kümeler halinde çökerler (Anderson, 1974).

Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde sıklıkla tercih edilen aglütinasyon testleri 1963 yılından bu yana patojen suşların serolojik karşılaştırılmalarında ve patojenlere karşı balık serumlarında antikör aranmasında kullanılmış ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaya devam edilmektedir (Krantz ve diğ., 1963; Kitao ve diğ., 1983; Sorensen ve Larsen, 1986; Hawke ve diğ., 1987; Toranzo ve diğ., 2005). Günümüzde belli antijenlere karşı geliştirilmiş ticari antiserumlar kullanılarak hızlı ve basitçe hastalık etkeni teşhis edilebilmektedir. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin % 98.7'ye ulaştıkları bildirilmiştir (Akarsu ve diğ., 2000).

Lam ve tüp aglütinasyon testleri ilk olarak 1963 yılında Krantz ve arkadaşları tarafından, daha sonra 1964'te Rabb ve arkadaşları tarafından, 1974'te ise Anderson tarafından *Aeromonas salmonicida*'ya karşı oluşan antikörlerin varlığının tespit edilmesiyle frunkulosis'in teşhisinde kullanılmıştır (Anderson, 1974). *P. damsela* subsp. *piscicida* (Bullock, 1978; Hawke ve diğ., 1987; Toranzo ve diğ., 1987; Toranzo ve diğ., 1991), *Edwardsiella ictulari* (Bertolini ve diğ., 1990; Toranzo ve diğ., 1987), *V. anguillarum* (Pacha ve Kiehn, 1969; Larsen ve Møllergaard, 1984), *Lactobacillus piscicola*, çeşitli *Aeromonas*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* türü (Toranzo ve diğ., 1987; Toranzo ve diğ., 2005) suşlarının lam aglütinasyon testi ile basitçe teşhis edilebildiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Lam aglütinasyon, bir damla anti serum ile bir damla antijenin fizyolojik su ile lam üzerinde karıştırılmasıyla yapılan basit ve hızlı bir aglütinasyon testidir. Tüp aglütinasyonda ise anijen ve antikör birleşimi cam tüp içerisinde gerçekleştirilir. Lateks aglütinasyonda yapay olarak lateks yüzeylere yapıştırılan antijenler veya antikörler elektrolitli ortamda kendi antikör veya antijenleri ile birleşerek, lam aglütinasyonda ve tüp aglütinasyonda olduğu gibi, hücre veya parçacıklar gözle görülebilecek kümeler halinde çökerler. Lateks aglütinasyon testi bir çok bakteriyel balık patojenin teşhisinde kullanılmak üzere adapte edilmiştir. Ancak dokulardan antijenin tespit edilmesine yönelik daha uygun olduğu rapor edilmiştir. *Y. ruckeri*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum*

ve *V. ordalii* için geliştirilmiş ticari lateks aglutinasyon kitleri mevcut olduğu bildirilmiştir (Whitman, 2004).

Günümüzde BIONOR (Norveç) marka ticari aglutinasyon kitleri bakteriyel balık hastalık etkenlerinden *A. salmonicida*, *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *Y. ruckeri*, *P. damsellae* subsp. *piscicida* ve *M. viscosa* türlerine karşı özel polivalent koyun antiserumu ile kaplanmış lateks partiküllerinden oluşan bir ürün olarak kullanılmaktadır. Mono-Va kiti *V. anguillarum*'un O1, O2, ve O3 serotiplerine karşı anti-serum içermektedir. Saf kültürden alınan mikroorganizma örnekleri spesifik antiseruma bağlanır ve lateks partiküllerinin kümeleşmesiyle bakterinin tanısı yapılmış olur. Hazır lateks aglutinasyon test kitleri hızlı, kolay, ucuz ve sahada kullanıma elverişli olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (BIONOR, 2012).

2.2.3. Moleküler Yöntemler

2.2.3.1. Bakterilerden Genomik DNA izolasyonu

Genetik yapılanmanın hücrede moleküler düzeydeki temelini oluşturan nükleik asitlerin iki türü (DNA ve RNA) nükleotidlerin polimeridir. Bu nükleotid heterosiklik halka yapısı gösteren 5 karbonlu bir şeker (pentoz), heterosiklik bir karbon halkası ile azot atomları içeren organik bir baz (pürin veya pirimidin) ve bir fosfat grubundan oluşan üç kısımdan meydana gelir. Canlıların büyük çoğunluğunda çift zincirli olan DNA birbirlerine kovalent olmayan hidrojen bağları ile bağlı ve zıt yönde paralel uzanan iki iplikten oluşmaktadır. Bu hidrojen bağları birbirini tamamlayan adenin ile timin, guanin ile sitozin bazları arasında bulunmaktadır. (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Topal Sarıkaya, 2008).

DNA hücrede bazı proteinler ve RNA ile bir kompleks halinde bulunur. DNA'nın izolasyonunun bir çok farklı yolu olsa da temel olarak üç aşamadan meydana gelir. Sırasıyla hücre duvarının parçalanması ile yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkması, denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin çözülmesi ve enzimatik ve kimyasal yöntemlerle DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden (proteinler ve RNA) ayrılmasıdır (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Topal Sarıkaya, 2008).

Hücre duvarının parçalanması aşamasında çalışılacak molekül grubunun elde edilmesi için hücre çeperi ve zar yapısı parçalanarak yok edilir. Bu işlem önce hücre çeperini zayıflatmak ve akbinde parçalamak şeklinde iki basamaklı olarak oluşabildiği gibi, tam bir parçalama işlemi de fiziksel ve kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Bunun için SDS gibi deterjanlar kullanılır. Bakterilerde lizozim ve proteinaz K enzimleri ile hücre duvarındaki glukoprotein yapıya etki ederek şeker molekülleri arasındaki bağların kopması sonucunda hücre duvarının yapısı bozulur. DNA-protein kompleksinin çözülmesi işlemi denatürasyona dayalı ve çoğunlukla fenol ekstraksiyonu ile gerçekleşir. DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden (proteinler ve RNA) ayrılması işlemi fiziksel ve kimyasal etkiler ile olur. DNA kimyasal olarak çöktürülebilir. Bunun için etanol, izopropanol gibi kimyasal maddeler kullanılır. Çöken DNA'yı sıvı çözücülerden ayırmak için ise fiziksel etkiye (santrifüj) maruz bırakılır (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Topal Sarıkaya, 2008).

İzole edilen DNA miktarının ölçülmesi için spektrofotometre kullanılır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından bu dalga boyu kullanılır. DNA'nın saf olup olmadığını anlamak için 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapılarak ortalama değerin 1,8-2,0 arasında değerlerde olup olmadığına bakılır. Eğer bu değer 1,8'in altında ise protein ve 2,0'dan yüksek ise fenol/kloroform kontaminasyonunu gösterir (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Topal Sarıkaya, 2008).

2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) spesifik bir DNA parçasının *in vitro* koşullarda DNA polimeraz enzimi ile uygun iki primer tarafından sentezlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Newton ve Graham, 1994; McPherson ve Møller, 2006; Pelt-Verkuil ve diğ., 2008). 1985 yılında ABD'de bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen yöntem nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan uygun koşullar sağlanarak çoğaltılmasına dayanmaktadır. Hem araştırma hem de klinik laboratuvar tanısında kullanılmak üzere PCR yöntemini geliştiren K. Mullis 1993 Nobel Kimya Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır (McPherson ve Møller, 2006). Ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda ve birçok hastalığın teşhisi için klinik tıpta kullanılmaya başlanmıştır.

1980'lerden beri günümüzde balık hastalıklarında etkenin direk teşhisi ve etken mikroorganizmanın karakterizasyonunun doğrulanması amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. RAPD, PCR-RFLP, AFLP, Real Time PCR, RT-PCR (reverse transcription PCR) gibi farklı PCR yöntemleri çoğunlukla kültürü zor olan bakteri ve virüslerin teşhis edilmesi için sıklıkla tercih edilmektedir (Altınok ve Kurt, 2003).

R. salmoninarum (McIntosh ve diğ., 1996; Rhodes ve diğ., 1998), *A. salmonicida* (Miyata ve diğ., 1996; Høie ve diğ., 1999), *Y. ruckeri* (Argenton ve diğ., 1996; Altınok ve diğ., 2001), *V. anguillarum* (Martinez-Picado ve diğ., 1994; Pedersen ve diğ., 1999), *L. garvieae* (Zlotkin ve diğ., 1998), *P. salmonis* (Marshall ve diğ., 1998), *Flexibacter* (Bader ve Shotts, 1998), *Flavobacterium* (Izumi ve diğ., 2005), *Photobacterium* (Osorio ve diğ., 1999), *Mycobacterium* (Patel ve diğ., 1997) gibi bir çok balık patojeninin teşhisinde çeşitli PCR yöntemleri kullanılmıştır.

PCR tekrarlanan 3 basamak şeklinde gerçekleşir. Bu basamaklardan ilki amplifiye edilecek DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (94°C), ikinci basamak primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıktaki birleşme (annealing) reaksiyonu, üçüncü basamak Taq DNA polimeraz enziminin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C'de primerlerin uzaması-tamamlayıcı zincir sentezi olarak tanımlanabilir. Böylece DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonları istenilen miktarda tekrarlanan döngü ile hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilebilir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. PCR'ın en önemli özelliği çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamasıdır. Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde, DNA örneği, genomik DNA, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksi-nükleotit-trifosfatlar (dNTP), yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımıdır (MgCl₂) (Newton ve Graham, 1994; McPherson ve Möller, 2006).

2.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez elektriksel alanda farklı elektrik yüklerine sahip moleküllerin ayrılmasına yönelik bir yöntemdir. Bir elektriksel alanda çözünmüş durumdaki moleküllerin

kitlelerine oranı ile hızda hareket etmeleri (ilerlemeleri) prensibine dayanır. Bir homojenattaki farklı molekülleri ayırma kapasitesi genellikle sınırlı olmasına karşın az miktarda protein ya da nükleik asitleri saflaştırmakta ve analizini yapmakta kullanılır (Topal Sarıkaya, 2008).

Nükleik asitler genellikle agarozdan hazırlanmış jellere uygulanır. Bu sistemde analizi yapılacak öreneğe (DNA) uygun tampon kullanılarak işlem gerçekleştirilir. Hafif moleküller hızlı ilerlerken ağır olanlar daha yavaş ilerleyebilir. Ayrılan farklı DNA parçalarına ait bantları saptamakta flouresan bir boya kullanılır ve UV ışıktaki gözlem yapılır. Agaroz jel elektroforezinde DNA için kullanılan flouresan boya olan edityum bromür elektroforez işleminin tamamlanmasından sonra çift iplikçikli DNA'nın baz çiftlerine bağlanır ve kırmızı flouresan yayarak DNA profillerinin görüntülenmesini sağlar. Bazı durumlarda jel ve edityum bromür arasındaki etkileşimler nedeniyle zeminde flouresan oluşumu sonucunda hatalı pozitif sonuç da verebilir (Topal Sarıkaya, 2008).

Tüm elektroforez tiplerinin aralarındaki başlıca fark destek ortamının (örneğin agaroz jel) tipi ve konumudur. Jeller kullanım amacına göre farklılık göstermektedir. Düşük molekül ağırlıklı aminoasitler ve karbonhidratlar gibi moleküller için selüloz jel, nükleikasitler ve proteinler gibi daha yüksek molekül ağırlıklı moleküller için agaroz ya da poliakrilamid jel destek ortamı olarak kullanılır. Jellerin konumu dikey ya da yatak olarak tercih edilebilir. Nükleik asit moleküllerinin (DNA ve RNA) saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntemlerden birisi, yatay tipte olan agaroz jel elektroforezidir (Topal Sarıkaya, 2008).

2.2.3.4. 16S ve DNA Dizi Analizi

Bakterilerin sınıflandırılmasında 1880'lerden bu yana geliştirilmiş morfolojik, metabolik, fizyolojik ve kimyasal karakter tayini yapmaya yönelik klasik yöntemler filogenetik ilişkiyi ortaya koymaya yetmemiştir. Bu da birçok farklı bakteri grubunun tanımlanmasında ciddi bir sorun olmuştur. Son on yılda kimya, moleküler biyoloji ve bakteriyel taksonomi alanlarında yaşanan gelişmeler ile bakterilerin moleküler teşhisi yapılmakta ve yakın akrabaları ile olan ilişkileri ortaya konmaktadır. 1980'lerden beri erişime açık veritabanlarına binlerce rDNA (rRNA) dizisi eklenmiş ve günümüzde en

geniş nükleotid verisine sahip GenBank 2 818 654 adet 16S rDNA dizi bilgisine sahiptir. (Nascimento, 2011).

Günümüzde bakterilerin spesifik 5S, 16S ve 23S rDNA dizileri ile genetik olarak teşhisinin yapılması oldukça yaygın bir yöntemdir. Ancak bakterilerin moleküler yöntemlerle teşhisinde kullanılan 16S rDNA gen dizisi tüm canlılarda yüksek derecede korunmuşluk gösterdiği ve türe göre değişken olan dizileri de barındırdığından PCR ile bakterilerin tanısı için primer bölgelerinin tasarlanmasında tercih edilmektedir (Martinez-Picado ve diğ., 1994; Bader ve Shotts, 1998; Osorio ve diğ., 1999; Nascimento, 2011). Filogenetik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bu yöntem rDNA genleri arasındaki ara bölge hedef bölge olduğu için PZR-ribotiplendirme olarak da adlandırılmıştır. Çoğaltılan bölgeler agaroz jelde ayrılarak karşılaştırılabilir. Çoğaltılmış bölgenin restriksiyon veya dizi (sekans) analizi, yöntemin teşhis gücünü yükseltmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011)

Dizi analizi, bir DNA molekülün nükleotid kompozisyonunun belirlenmesidir. İzolatların ayrımı için DNA dizisinin kullanılması en ideal yöntemdir. Ancak her izolatin tüm genomunun dizilenmesi pratik değildir. Bu nedenle yüksek derecede korunmuşluk gösteren 16S rDNA dizileri tercih edilmektedir. GenBank veri tabnında bu dizilerin karşılaştırılması ile bakterilerin teşhisi ve filogenetik ilişkileri belirlenmektedir. DNA dizisi için en popüler yöntem klasik dideoksi veya “Sanger” yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Birçok laboratuvar için bu teknik şu an için uygulanabilir durumda değildir. Daha ucuz DNA dizileme araçlarının uygulanabilirliği bu tekniği gelecekte daha ulaşılabilir hale getirebilir (Üstek ve diğ., 2011; Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Otomatik DNA dizileme cihazları sayesinde DNA dizileme yöntemi, floresan işaretli dideoksi nükleotitler kullanılarak zincir sonlandırma yaklaşımına dayalı Sanger dizi yaklaşımının kapiller elektroforez teknolojisiyle kombine edilmesiyle çeşitli genetik analiz çalışmalarında rutin olarak uygulanabilmektedir. DNA dizileme çalışmasında dizilenecek DNA fragmanları primer adı verilen, çoğaltılması istenilen bölgeye özgü başlatıcı DNA parçacıkları yardımıyla PCR reaksiyonunda çoğaltılır. Dizileme cihazında anot ve katot kutuplar arasında uzanan kapiller, polimerle doldurulduktan sonra negatif yüklü saflaştırılmış PCR ürünü DNA örneğini elektrokinetik yöntemle

çekerek pozitif yüklü anoda doğru yürütür. Kapillerin anot ucuna yakın bir bölgesinde bulunan lazer lambasından gelen ışıkla uyarılan floresan boyaların geri yansıttığı ışık detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler dizileme cihazının yazılımı ile matematiksel olarak değerlendirilerek bir grafikte görüntülenir. Elektroferogram adı verilen dizi sonucunun okunabildiği grafik, gözle ya da çeşitli yazılımlarla incelenebilir. PCR reaksiyonları ve 250-800 nükleotid baz streçleri tek bir dizi reaksiyonu içinde dizilenebilir. DNA dizilenmesi filogenetik yakınlığı ölçmek için ve popülasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Teknik zorluklar ve harcama geleneksel dizileme yöntemlerinin kullanımını sınırlar. Flouresan tabanlı otomatik dizileme makinası daha kolay ve hızlı bir teknolojiyle çalışmaktadır. Fakat pahalı olması nedeniyle yaygın bir şekilde kullanımı kısıtlıdır (Sanger ve diğ., 1977; Jayasankar, 1998).

DNA dizileme genetik bozukluklara yol açan DNA baz değişimlerinin belirlenmesi, topluma özgü gen polimorfizmlerinin bulunması, mikrobiyal hastalıklara neden olan mikroorganizmaların saptanması, RNA düzeyinde gen anlatım farklılıkları, adli tıp tanımlamalarına yönelik DNA testleri gibi çok çeşitli çalışmalarda kullanılabilir (Sanger ve diğ., 1977; Sentomer, 2012).

Martinez-Picado ve arkadaşları tarafından 1994 yılında yapılmış olan çalışmada *V. anguillarum*'un 16S rRNA dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen bilgiler ışığında 24 bazlık oligonükleotidler dizayn edilmiş ve radyoaktif madde ile işaretli sentetik spesifik probalar kullanılmıştır. Kullanılan problemlerin çevresel suşlar ve diğer bakteri türleri ile çapraz reaksiyon göstermediği ve yakın türlerin elenmesine olanak sağladığı bildirilmiştir (Martinez-Picado ve diğ., 1994). Bir çok kimyasal ve immünolojik yöntem de balıktan bakterinin izolasyonuna ve kültürüne ihtiyaç duyulmasına rağmen bu teknik ile saf kültüre gerek olmadığı bildirilmiştir (Actis ve diğ., 2011).

Bader ve arkadaşları (1998) A ve H primerleri kullanılarak 16S rRNA nükleotid gen dizisi çoğaltımı ile *F. psychrophilum* teşhis edilmiş ve *F. columnare*, *F. maritimus* gibi türler ile olan yakınlık dereceleri saptanmıştır. Pasteurellosisin etkeni olarak bilinen *P. damsela* subsp. *piscicida* 16S rRNA gen dizisine dayalı karşılaştırmalar ve kromozomal DNA melezleme verileri sonucunda *P. damsela* subsp. *piscicida* olarak

tekrar sınıflandırılmıştır (Osorio ve diğ., 1999). Soya küspesi ile beslenen Atlantik morina (*Godus morhua*) balıklarının gastrointestinal kanalından izole edilen yeni *Psychrobacter* türlerinin teşhisini 16S rRNA analizi ile yapıldığı bildirilmiştir (Ringø ve diğ., 2006). *Kocuria* genusu *Micrococcus* ile *Arthrobacter* ve *Rothia* gibi diğer yakın Gram pozitif koklardan 16S rRNA gen dizisi ile kesin bir şekilde ayrıldığı bildirilmiştir (Stackebrandt ve diğ., 1995). Kim ve arkadaşları (2004) *K. marina* türünü 16S rRNA gen dizisi ile birbirine yakın fenotipik özellik gösteren diğer *Kocuria* türlerinden ayırt ederek filogenetik olarak rapor etmiştir. Lai ve arkadaşları (2010) aynı türün teşhisi için geleneksel yöntemlere ek olarak 16S rRNA gen dizi analizini kullanmıştır.

V. harveyi ile yakın türlerin farklı tekniklerle moleküler teşhisini yaptıkları çalışmada 16S rRNA'nın *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. natrieigenis*, *V. rotiferanus* ve *V. harveyi* gibi yakın türlerden oluşan *Vibrio* grubunu ayırt ederken kullanışlı olmadığı bildirilmiştir (Thompson ve diğ., 2007). Buna karşın Pedersen ve arkadaşları (1998) 16S rDNA sekans analizleri sonucunda *V. carchariae*'nin, *V. harveyi*'nin bir sinonimi olduğunu ortaya çıkartmıştır. Genetik olarak ilişkili türler olan *V. harveyi* ve *V. campbellii* DNA benzerlik oranı % 69, 16S rRNA benzerlik oranı % 97 olarak rapor edilmiştir (Gomez-gill ve diğ., 2004). Liu ve arkadaşları (2004) *V. alginolyticus* teşhisini % 99,9 benzerlik oranı ile 16S rDNA dizi analizi sonucunda yapmış olduklarını bildirmiştir. İspanya'da dil balıklarında farklı yıllarda meydana gelen hastalık çıkışlarında hastalık etkeni olarak 16S rRNA spesifik primerleri ile dizi analizi sonucunda *V. harveyi* teşhis edildiği rapor edilmiştir (Lopez ve diğ., 2009).

2.3. BAKTERİYEL BALIK HASTALIKLARINDA KORUNMA VE TEDAVİ

Ülkemizde ve tüm dünyada balık hastalıklarını tedavi etmek için çeşitli antibakteriyel maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerin uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı ise dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve giderek kullanılabilir etekli antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca etken identifiye edilmeden ve antibiyogram testi yapılmadan antibiyotik kullanılması, doz ve süreye uyulmaması, ilaçlı yem verilmeden önce 12-24 saat balığın aç bırakılmaması, yasal ve bilinen antibiyotiklerin kullanılmaması, yanlış kombinasyonlar yapılması ve sekonder enfeksiyonlarda primer nedenlerin göz ardı edilmesi gibi nedenler ile tedavideki

başarısızlık mortaliteyi ve tedavi maliyetini artırmaktadır. Avrupa Hayvan Sağlığı Federasyonunun yaptığı bir çalışmada 1999 yılında hayvansal üretim için kullanılan antibiyotik miktarı 4700 ton, insan için tüketimi ise 8500 ton olarak belirtilmiştir. Hayvansal üretimde kullanılan antibiyotiğin 3900 tonu hastalıkların tedavisinde, 786 tonu ise büyümeyi destekleyici olarak kullanılmıştır (Lalitha, 2004; Kav ve Erganiş, 2007; Turgut Neary ve diğ., 2008).

Kültür balıkçılığında meydana gelen bir hastalık çok kısa zamanda diğer balıklara bulaşıp yayılarak ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bakteriyel enfeksiyonlar özellikle su sıcaklığının arttığı ve ani değişimler gösterdiği mevsimlerde, hastalık çıkışını önleyici korunma yöntemlerinin yetersiz kalması ve stres faktörlerinin artması ile ortaya çıkmaktadır. Bu noktada hastalığa uygun kemoterapötik maddelerin yeterli miktarlarda ve uygun yöntemlerle kullanılması gerekmektedir (Boesen ve diğ., 1999; Teuber ve diğ., 1999; Ash ve diğ., 2002; Armstrong ve diğ., 2005; Nakayama ve diğ., 2006; Colquhoun ve diğ., 2007; Mindlin ve diğ., 2008; Smith, 2008; Satyanarayana, 2009)

Vücudu istila eden mikroorganizma, parazit veya zararlı hücreleri konakçıya zarar vermeden öldüren veya üremesini ve çoğalmasını durduran kemoterapötikler bir tedavi şekli olarak kullanılmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar, genellikle etki yaptıkları mikroorganizmanın cinsine göre antibakteriyeller, antihelmintikler, antimalaryaller, antiamibikler, antivirütikler ve antineoplastikler olarak sınıflandırılırlar (Brooks ve diğ., 2010).

Antibiyotikler, bazı bakteri veya mantar türü mikroorganizmalar tarafından üreme ortamlarında oluşturulan ve başka mikroplar için mikrobiyostatik ya da mikrobisid etki gösteren ve tedavide kullanılan maddelerdir. Antibiyotiklerin bir çoğu bugün sentetik ya da yarı sentetik yöntemlerle elde edilmektedirler. Bugün klinikte antibiyotik deyimi tedavide kullanılan kemoteropötik ve antibiyotik niteliğindeki maddeler için genel bir ad olarak kullanılmaktadır. Antimikrobik deyimi de her ikisini de kapsar anlamda kullanılmaktadır (Brooks ve diğ., 2010).

Antimikrobiyal ilaçların kullanılması hayvan ve insanların tedavisinde önemli bir katkı sağlamaktadır. Bunun yanı sıra bu ajanların aşırı dozlarda kullanılması dirençli mikroorganizmaların meydana gelmesine yol açmaktadır. Bu da insan ve hayvanlara taşınarak enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılan standart antimikrobiyal maddelerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Balık hastalıklarının tedavisinde durum nispeten daha iyi bir konumdadır. Ancak ilaçlar balığın bulunduğu suya ya da yeme karıştırılarak uygulanmaktadır ve antibiyotikler ve antestezik maddeler gibi geleneksel ilaçların kullanımı giderek artmaktadır (Smith ve diğ., 1984; Schnick, 2001; Colquhoun ve diğ., 2007; Karataş ve Candan, 2007; Smith, 2008; Satyanarayana, 2009).

Kültür balıkçılığında antibiyotik kullanımı 50 yılı aşkın süredir devam etmektedir. Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere bakterilere karşı etkili olan listelenmiş antibiyotikler mevcuttur. β -laktam (amoksilin), makrolid (eritromisin), fenikoller (florfenikol), kinolonlar (oksolinik asit, piramidik asit, naladiksik asit, flumequin), florokinolon (sarafloksasin), sülfonamidler ve tetrasiklinler (oksitetrasiklin) kullanılan antibiyotikler olarak bildirilmiştir. Bu ilaçların tedavide kullanımı oral yolla ya da banyo yoluyla yapılmaktadır (Smith ve diğ., 1984; Colquhoun ve diğ., 2007; Karataş ve Candan, 2007; Smith, 2008; Satyanarayana, 2009).

Ülkemizde deniz kültür balıkçılığında kullanılan kimyasallar kemoterapötik ilaç olarak olan antibiyotikler, anestesizkler, ekto ve endoparazitisitler, aşılar, dezenfektanlar ve antifoulantlardan oluşmaktadır. Bunlardan antibakteriyel ilaçlar olarak bütün balık türleri için Gram negatif bakterilere karşı oksitetrasiklin, tüm bakteriyel hastalıklarda amoksilin, vibriosis ve flexibacteriosis için sülfametazin, trimetoprim-sülfadiazin, trimetoprim-sülfamerazin, pasteurellosis için ampisilin, bakteriyel böbrek hastalığı ve streptococcosis için eritromisin, bütün balık türleri için enrofloksasin, neomisin, vibriosis ve flexibacteriosis için tiamfenikol, florfenikol, frunkulosis ve yersiniosis için sarafloksasin kullanılabileceği bildirilmiştir (Smith ve diğ., 1994; Timur ve Timur, 2003; Karataş ve Candan, 2007; Satyanarayana, 2009).

Tetrasiklinler geniş spektrumlu bakteriyostatikler olarak bildirilmiştir. Doğal tetrasiklinlerin ikisi oksitetrasiklin (OTC) ve klortetrasiklin geniş spektrumlu diğer antibakteriyel ilaçlara göre daha ucuz ve ulaşılabilir olması nedeniyle yaygın bir şekilde

su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılmaktadır. Penisilinler geniş bir antibiyotik grubu olan β -laktamların içinde yer almaktadır. Aynı gruba dâhil olan yarı sentetik amoksisilin ve ampisilin bezer etki göstermesiyle su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotikler arasındadır. *Vibrio* spp., *Yersinia ruckeri* ve *Pasteurella* spp. gibi etkenlerin neden olduğu hastalıklara karşı kullanılmaktadır. Sülfanomidler trimetoprimler ile birlikte kullanılmaktadır (Timur ve Timur, 2003; Karataş ve Candan, 2007).

Ülkemizde su ürünlerinde kullanılmasına izin verilmiş ve kalıntı kontrolü yapılacak kemoterapötikler içerisinde yer alan sulfonamidler, trimetoprim ve diğer antibakteriyal maddeler amoksisilin, ampisilin, sefoperazon, kinolonlar (enrofloksasin, flumequin, oksolinik asit, sarafloksasin), eritromisin, tiamfenikol, florfenikol, tetrasiklinler, aminoglukozidler (neomisin, kanamisin, gentamisin, streptomisin), novabiyosin, kolistin 31.12.2003 tarihi itibarı ile su ürünleri yetiştiriciliğinde bakanlıktan ruhsat alınmasına ve reçeteye tabi antibiyotikler içerisinde de yer almaktadırlar (TKB, 2003). Amerika Birleşik Devletleri'nde ve ülkemizde 90/2377 sayılı AB yönetmeliğinin IV nolu ekinde su ürünleri de dahil gıda değeri olan hayvanlarda yasaklanmış maddeler grubunda yer aldıklarından, nitrofuranların (furazolidon, furaldaton, nitrofurazon) ve kloramfenikol, ronidazol, dapsonun kullanılması yasaklanmıştır (TKB, 2003).

Kemoteropötik maddelerin mikroplar üzerine iki türlü etkisi vardır. Birincisi üremelerini durdurucu (mikrobiyostatik), ikincisi de öldürücü (mikrobisit) etkilerdir. Bakteri hücrelerinin gelişmesinin ve üremesinin durdurulması bakteriyostatik etki olarak tanımlanmıştır. Gelişmesi ve üremesi durdurulan bakteriler, vücudun savunma sistemleri tarafından yok edilir. Bakteri hücrelerinin direkt olarak öldürülüp yok edilmesi ise bakterisid etki olarak tanımlanmıştır. Antibiyotikler etki güçlerine göre bakterisidler (penisilinler, sefalosporinler, aminoglukozidler, vankomisin, amfoterisin B, rifampisin, florokinolonlar, basitrasin, izoniazid, metronidazol, polimiksinler, teikoplanin, pirazinamid) ve bakteriyostatikler (tetrasiklinler, kloramfenikol, sulfonamidler, eritromisin, klindamisin, mikonazol, etambutol, novobiosin, nitrofurantoin) olarak ayrılmıştır. Bakterisid ve bakteriyostatik etkili ilaçlar kombine edilmemelidirler. Birbirlerinin etkilerini antagonize ederler (Brooks ve diğ., 2010).

Bugün bilinen başlıca bakterisid etki mekanizmalarından en önemlileri bakteri hücre duvar sentezini inhibe ve otolitik enzimlerini aktive etme (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, basitrasin, vankomisin, teikoplanin, ristosetin, sikloserin), sitoplazma membran permeabilitesini bozma (polimiksinler, amfoterisin B, gramisidin, nistatin, ketokonazol ve diğer imidazoller, flukonazol ve diğer triazoller), bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etme (aminoglukozidler, tetrasiklinler, eritromisin, klindamisin, kloramfenikol, DNA ve RNA sentezini bozma (kinolonlar, rifampisin, mitomisin, aktinomisin, doksorubisin, daunorubisin), intermedier metabolizmayı bozma (antimetabolit etki) (sülfonamidler, sulfonlar, izoniazid, PAS, etambutol, trimetoprim) olarak bildirilmiştir (Brooks ve diğ., 2010).

Son yıllarda ülkemizde deniz kültür balıkçılığında tedavi amaçlı kullanılan kemoterapötikler yetersiz kalmaktadır. Hastalık etkenine uygun tedavi aşamasına geçilmesi, hastalık etkeninin kısa sürede, doğru ve hassas bir şekilde teşhis edilmesi ile sağlanabilir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın antibiyotik kullanımı neticesinde oluşan antibiyotik dirençliliği taşıyan bakteriler, besinlerle tüketiciye ulaştığı zaman ciddi enfeksiyonlar yapabilmektedirler (Smith ve diğ., 1994; Teuber ve diğ., 1996). Ayrıca antibiyotikler tarım alanında da yaygın bir şekilde kullanılmakta ve dirençli bakterilerin göller ve nehirlerden denizlere ulaşmasına sebep olmaktadır (Ash Mauck ve Morgan, 2002).

Aşılar, kültür balıkçılığında bakteriyel patojenleri kontrol altında tutmak adına antibiyotiklerin yerini büyük ölçüde almıştır. Fakat antimikrobiyal ajanlar hem aşılamanın yapılamadığı ve yetersiz olduğu kuluçkahanelerde hem de gelişmiş stoklarda hastalıkları kontrol altına almak için kullanıldıkları bildirilmiştir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan belirli antibiyotiklere karşı dirençli bakteriyel suşlar, kültür balık stoklarının tedavisi tamamlandıktan sonra antibiyotiğin kesilmesi ile sedimentten izole edildikleri bildirilmiştir (Armstrong ve diğ., 2005).

Antibakteriyel duyarlılık testlerinde güvenilir sonuçların alınması için standart yöntemlerin uygulanması şarttır. Etkene göre antibiyotik seçimi, antibiyotiklerin kısıtlı bildirimi gibi konular da standardizasyonla birlikte ele alınmalıdır (Smith ve diğ., 1994; Schnick, 2001). Bu nedenle antimikrobiyal duyarlılığı etkileyen faktörlerin ve uygun

metodların belirlenmesi ve laboratuvara adapte edilmesi çok önemlidir. Ayrıca bakteriyel balık patojenlerinin tedavisinde kullanılan kemoterapötiklere karşı bakterilerde ortaya çıkan direncin düzeyi, tipi ve bu dirençten sorumlu genlerin bakteriler arasında değişimi ve yayılımının araştırılabilmesi için öncelikle direnç profillerinin belirlenmesi gerekmektedir (Alderman ve Smith, 2001).

Hong Kong'da su ürünleri ve denizden izole edilen *Vibrio* türlerinin çoğu suşu kloramfenikol and tetrasikline hassas fakat kültür gümüş çipura balıklarından izole edilen *Vibrio* türlerinin balık çiftliklerindeki gelişigüzel antibiyotik kullanımı nedeniyle kloramfenikol, tetrasiklin ve kanamisin gibi antibiyotiğe orta derece dirençli olduğu gösterilmiştir. *Vibrio* türleri eritromisin direnci gösterdiği bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2006).

Sazlıklardan izole edilen üç farklı *Kocuria* türünün teşhis edildiği çalışmada penisilin, sulbaktam/ampisilin, amoksilin, piperasilin, meropenem, sefalekssin, sefamandol, sefoperazon, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, netilmisin, vankomisin, trimetoprim'e karşı hassas, nitrofurantoine karşı dirençli oldukları bildirilmiştir (Kovaks ve diğ., 1999). *K. marina* türünün ampicillin, benzilpenisilin, karbenisilin, gentamisin, linkomisin, neomisin, oleandomisin, streptomisin ve tetrasikline hassas fakat kanamisin ya da polymiksin B'ye dirençli olduğu rapor edilmiştir (Kim ve diğ., 2004).

V. alginolyticus'un novobiyoisin, neomisin, nitrofrantoin, sulfisoksazol, kloramfenikol, tetrasiklin ve kanamisine hassas olduğu bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2004). *V. anguillarum*, *V. anguillarum*-related (VAR) ve *V. splendidus* türlerinden oluşan çalışma grubundaki çoğu suşun ampisilin ve streptomisine karşı dirençli ve değişken duyarlılıklarda oldukları, tetrasiklin, oksitetrasiklin, oxolinic asit, kloramfenikol, trimetoprim-sulfametoksazol ve nitrofurantoine karşı hassas ve değişken duyarlılıklarda oldukları bildirilmiştir (Pazos ve diğ., 1993). *Vibrio* türlerinin genel olarak oksitetrasiklin, nitrofuranlar, potansiyalize sülfanamidler ve oksolinik asite karşı hassas, fakat özellikle *V. anguillarum* ve *V. salmonicida* türlerinin bu ilaçlara direnç geliştirdikleri bildirilmiştir (Noga, 2010).

Çipura balıklarından izole edilen *Vibrio* türlerinin hiçbir suşunun nitrofurantoin ve trimethoprim- sülfametakzole karşı direnç göstermediği, % 80'den fazlasının streptomisin ve eritromisine dirençli oldukları, bütün *V. anguillarum* suşlarının penisilin, amikasin, streptomisin, kanamisin karşı dirençli, amoksilin, trimethoprim-sülfametakzole, nitrofurantoin, kloramfenikole karşı hassas oldukları; bütün *V. harveyi* suşlarının penisilin, ampisilin ve eritromisine dirençli oldukları, amoksilin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, streptomisin, trimethoprim- sülfametakzole ve kloramfenikole karşı hassas oldukları; bütün *V. campbelli* suşlarının penisilin, ampisilin, streptomisin ve eritromisine karşı dirençli ve bütün *V. aestuarianus* türlerinin streptomisin, gentamisin, tobramisin, amikasin, kanamisin ve eritromisine direnç gösterdikleri rapor edilmiştir (Balebona ve diğ., 1994).

V. anguillarum serotip O1 ve O2 suşları yüksek oranda antibiyotiklere karşı duyarlı bulunduğu, nitrofurazolidonun diğer antibakteriyel bileşiklerden daha az etkili olduğu, VAR suşlarının özellikle nitrofurazolidona yüksek direnç gösterdikleri ve oksitetrasiklin, flumequin ve trimetoprim-sulfadiazine karşı daha az direnç gösterdikleri rapor edilmiştir (Myhr ve diğ., 1991).

V. anguillarum O1 ve O2 serotiplerinin su ürünleri yetiştiriciliğinde tercih edilen kolistin, ampisilin, sefalotin gibi antibiyotiklere olan duyarlılıkları değişkenlik gösterdikleri bildirilmiştir. En sık tercih edilen antibiyotikler arasında oksilinin asit ve flumequin bulunduğu ancak oksilinin asite karşı dirençli suşların bulunduğu ve bunun büyümekte olan bir sorun olduğu bildirilmiştir (Colquhoun ve diğ., 2007; Gratacap, 2008)

Tablo. 2.4: *V. anguillarum* serotip O1 ve O2 için su ürünleri yetiştiriciliğinde tercih edilen antibiyotiklere olan duyarlılıkları (Gratacap, 2008)

Antibiyotik	Serotip O1	Serotip O2
Kolistin	Dirençli	Hassas
Ampisilin	Hassas	Dirençli
Sefalotin	Hassas	Dirençli

2.4. ANTİBAKYERİYEL MADDELERE DUYARLILIKLARIN BELİRLENMESİ

Patojen bakterilere karşı kullanılan kemoterapötik maddelerin etkilerinin belirlenmesi Rideal, Walker ve arkadaşları tarafından geçtiğimiz yüzyılda ortaya konmuştur. Bu dönemde antibiyotiklerin modifikasyonunun keşfi ile çok sayıdaki antibiyotik ile rutin olarak testlerin yapılması çok zahmetlidir. Alexander Fleming tarafından ilk olarak tasarlanmış ve daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilen disk difüzyon yöntemi ilk olarak Oksford’lu bir grup araştırmacı tarafından besiyerinin yüzeyine antibiyotiklerin yayılması ile kandaki antibiyotik içeriği teşhis edilmiştir. Antimikrobiyal maddelerin çeşitlerinin tanınmasıyla da rutin olarak antimikrobiyal duyarlılık testi uygulanmaya başlanmıştır. Buna göre belirli bir miktar antimikrobiyal madde içeren bir besiyerine test edilecek bakterinin yayılması ile gerçekleştirilen test günümüzde antimikrobiyal madde emdirilmiş kâğıt disklerin kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Günümüzde antimikrobiyal duyarlılık testi yöntemleri disk difüzyon, minimum inhibitör konsantrasyonu (agar/ broth/mikro dilüsyon) ve E-test olarak üç ana grup altında uygulanmaktadır (Lalitha, 2004; Bilgehan, 2004; Satyanarayana, 2009).

Duyarlılık testlerinde standart olarak Müeller Hinton agar ve broth (MHA, MHB) besiyerleri kullanılmaktadır. Ancak timidin, tuz, karbonhidrat ve minerallerin konsantrasyonları, pepton veya agarın içeriği ve pH değeri gibi belli başlı etkenler bu testlerin sonuçlarını etkileyebilmektedir. Bunun yanı sıra inkübasyon sıcaklığı da testlerin sonucunu etkileyen önemli bir değişken olarak bildirilmiştir. Besiyerinin ince dökülmesi, koyu inokulum kullanılması, inkübasyon süresinin kısa veya uzun tutulması sonuçların güvenilirliğini yok edeceği bildirilmiştir (Yılmaz 1985; Michel ve Balch, 2001; Karataş ve Candan, 2007; Smith ve diğ., 1994). Test yöntemlerinin bir standartta yürütülmesi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) antimikrobiyal duyarlılık testleri için uygulama standartları oluşturmuştur. Belirli aralıklara güncellenen standartlar doğrultusunda gerçekleştirilen testlerin güvenilirliği sağlanmış olur. Bunun yanı sıra her laboratuvarın bu test yöntemlerini kendi sistemlerine adapte etmeleri gerekmektedir (Smith ve diğ., 1994).

Duyarlılık testi yapan laboratuvar standardize edilmiş bir yöntemi uygulasa bile sonuçlarının kalitesini kontrol etmelidir. Gerek antimikrobiklerin etkilerinin araştırılmasında gerekse mikroorganizmaların dirençlerinin araştırılmasındaki çalışmalarda kalite kontrolü yapmak için antimikrobiklere karşı dirençlilik durumları bilinen standart mikroorganizmalardan yararlanarak karşılaştırmalı çalışılması gerekmektedir. Bu amaçla CLSI gibi belirli referans laboratuvarlarının kültür koleksiyonlarında bulunan standart mikroorganizmalardan faydalanılır. Genel olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 (β -laktamaz negatif), *Escherichia coli* ATCC 35218 (β -laktamaz pozitif), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (β -laktamaz negatif, oksasilin hassas), *Staphylococcus aureus* ATCC 38591 (β -laktamaz pozitif), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (aminoglukozidler için), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (MH agarda timidin veya timin seviyesini kontrol etmek için), *Haemophilus influenzae* ATCC 49766 (sefalosporinler), *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 (besiyeri kontrolü için), tercih edilen referans suşlar arasındadır (CLSI, 2012). Bu suşların her biriyle çeşitli antibiyotikler için kabul edilebilir zon çapları veya MİK değerleri tablolar halinde düzenlenmiştir. Kalite kontrol testlerini her gün yapan laboratuvarlar için zon okumalarının % 95 ve fazlası kabul edilebilir sınırlar içinde bulunmalıdır. Ancak CLSI'nin öngördüğü günlük kalite kontrol testleri oldukça zahmetli olduğundan bunun haftada bire indirilme eğilimi vardır. Haftada bir yapılan kalite kontrolünde bütün zonların kabul edilebilir sınırlar içinde kalması istenir. Bir standart yöntemin uygulanmasında dış kalite kontrolü de aranabilir. Ülkemizde bunu yapacak bir organizasyon bulunmasa da İngiltere'de Milli Dış Kalite Programı (National External Quality Assessment Scheme, NQAS) gibi diğer ülkelerde kar amacı gütmeyen özel organizasyonlar vardır.

Tüm testlerde gerek kullanılacak olan standart referans suş gerekse incelenmekte olan mikroorganizmalardan besiyerlerine ekilecek olan inokulum miktarının aynı sayılarda bakteri içermeleri ve üreme yaşının aynı, aktif üreme döneminde olması gerektiği (sporlular hariç) bildirilmiştir (Lalitha, 2004; Bilgehan, 2004; Satyanarayana, 2009).

2.4.1. Disk Difüzyon ve Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)

Disk difüzyon yöntemi yaygın olarak 1986 yılından itibaren Kirby ve Bauer tarafından bildirilen şekilde katı besiyerinde uygulanmaktadır. Temel prensip katı besiyerinde yayma plak yöntemiyle ekilen mikroorganizmaların üremeleri üzerine antimikrobiyal

madde emdirilmiş disklerin etkisinin araştırılması şeklindedir. Antimikrobiyal maddenin mikroorganizmaya olan etkisinin derecesi disklerin çevresinde gelişmenin olmadığı zonların ölçülmesi ile anlaşılır. Disk difüzyon yöntemi; hızlı üreyen aerob ve fakültatif anaerob bakteriler için önerilen, kolay, pratik, standartlara uygun yapılan halen tüm dünyada laboratuvarlar için tercih edilen rutin antibiyotiğin inhibisyon etkisini ölçen kalitatif bir testtir (Bilgehan, 2004; Lalitha, 2004; Whitman, 2004; Satyanarayana, 2009).

Diğer bir antimikrobiyal duyarlılık testi Minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesidir. MİK bakterilerin üremesi veya gelişmesini durduran (bakteriyostatik etki) kemoteröpötik maddelerinin etki gücünün göstergesidir (Treves Brown, 2000). MİK ölçümü, yeni antibiyotiklerin etkinlik araştırması, penisiline dirençli pnömokokların belirlenmesi gibi özel durumlarda da yapılmaktadır. Bu test inhibisyonu ölçen kantitatif bir testtir (Treves Brown, 2000)

Dilüsyon yöntemi rutin uygulamalar için elverişli değildir. Disk difüzyon yöntemi ise daha az duyarlı olduğu düşünülmeye rağmen rutin uygulamada pratik olduğu bildirilmiştir (Yılmaz, 1985).

Lai ve diğ. (2010) tarafından katater kullanımı ile ilişkili *Kocuria* türlerinin yirmi farklı antibiyotiğe olan duyarlılıkları MİK testi ile analiz edilmiştir. Savini ve diğ., (2010) tarafından klinik sekiz farklı *Kocuria* türünün çeşitli yöntemlerle teşhisi ve MİK testi ile kırk yedi farklı antibiyotiğe olan duyarlılıkları tespit edilmiştir.

Uma ve diğ. (2008) karides örneklerinden izole ettikleri *V.harveyi*, *V.alginolyticus* ve *V.campbellii* türlerinin baskın olarak izole edildiği çalışmada *V.alginolyticus* ve *V.campbellii* türlerinin antibiyogram testlerinin benzer sonuçları verdiğini *V.harveyi* suşlarının kuluçkahanelerde kullanılan yaygın antibiyotiklere karşı değişken sonuçlar verdiğini rapor edilmişlerdir. Bütün izolatların kloramfenikol ve gentamisine çok hassas, frozolidona dirençli oldukları bildirilmiştir. Ayrıca oksitetrasiklin, norflaksin ve siproflaksine hassas ve bunun yanı sıra bazı *V. harveyi* suşlarının kloramfenikol ve gentamisine dirençli olduğu rapor edilmiştir (Uma ve diğ., 2008).

Şili’de tatlı suda yetiştirilen Atlantik salmon çiftliğinde fingerlinglerden, pelet yemlerden ve sudan izole edilen aerobik bakterilerin *Psychrobacter* genusuna ait iki farklı türünün (*P. glacincola* ve *P. pacificens*) oksitetrasikline (OT) dirençli oldukları rapor edilmiştir (Armstrong ve diğ., 2005). Salmon çiftliğinden izole edilen bakterilerde yüksek OT direnci (2000 µg ml⁻¹) görülürken, çiftlikten 100 m uzaklıktaki Fundy koyu’nun sedimentinden izole edilen bakterilerde daha düşük MİK değeri (160 OT ml⁻¹) görüldüğü bildirilmiştir (Armstrong ve diğ., 2005).

Antibiyotiğin etkinliğini tespit ederken MİK ve MBK (minimum bakterisid konsantrasyonu) birlikte değerlendirilmesi gerektiği bilinmektedir. Bu değerler antibiyotiğin *in vivo* etkinliğini göstermez (Gür, 2010). Antibiyotiğin bakterilere karşı *in vivo* etkinliği, hedef mikroorganizmanın söz konusu antibiyotiğe duyarlılığına, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine bağlıdır. Antibiyotik mikroorganizma ile karşılaştığında onu öldürecek ya da üremesini engelleyecek konsantrasyonda olmalıdır ve etkisini gösterebilecek süre organizmada hedeflenen bölgede bulunmalıdır (Smith ve diğ., 1994; Carig, 1998; Çakır, 2007).

Test yöntemlerinin bir standartta yürütülmesi için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, 2012), Members of the SFM antibiogram committee (2003) tarafından bildirilen antimikrobiyal duyarlılık testleri uygulama standartlarında yer alan bazı antimikrobiyal maddelerin zon çapları ve MİK değerleri Tablo 2,5’de görülmektedir.

Tablo 2.5: Kültür balıkçılığında kullanılan bazı antimikrobiyal maddelere karşı hassaslık değerlerini yorumlama standardı (Members of the SFM antibiogram committee, 2003; Satyanarayana, 2009; CLSI, 2012)

Antimikrobiyal İlaç	Disk İçeriği	Zon Çapı Sınır Değerleri			MİK yorumlama standardı	
		(Yaklaşık mm)			(µg/ml)	
		D	OD	H	D	H
Ampisilin	10 µg	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8
Sefoperazon	75 µg	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16
Sefotaksim	30 µg	≤14	15-22	≥23	≥8	≤2
Seftazidim	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
Gentamisin	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	≤4
Kanamisin	30 µg	≤13	14-17	≥18	≥64	≤16
Tetrasiklin	30 µg	≤14	15-18	≥19	≥16	≤4
Siprofloksasin	5 µg	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
Nalidiksik Asit	30 µg	≤13	14-18	≥19	≥32	≤8
Trimetoprim - Sulfametoksazol	1.25/23.75 µg	≤10	11-15	≥16	≥4/76	≤2/38
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥18	≥64	≤16
Trimetoprim	5 µg	≤12	(11-15)	≥16	≥16	≤8
Eritromisin	15 µg	≤13	14-22	≥23	-	-
Streptomisin	10 µg	≤11	12-14	≥15	-	-
Oksitetrasiklin	30 µg	≤15	16-25	≥26	-	-
Flumequin	30 µg	≤20	21-24	≥25	≥9	≤4
Penisilin	10 µg	≤19	20-27	≥28	≥0,25	≤0.12
Rifampisin	5 µg	≤16	17-19	≥20	-	-

D: Dirençli, OD: Orta dirençli, H: Hassas

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer ve Örneklenen Balıklar

Bu çalışmada incelenen hasta balık örnekleri, 25 ve 26 Mart 2011 tarihlerinde Güllük Körfezi'nde (A) ve 3 Ağustos 2011 tarihinde İzmir Körfezi'nde (B) bulunan kafes balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerden gelen hasta balık ihbarları değerlendirilerek temin edilmiştir. Bu işletmeler açık denizde 20 m çaplı kafeslerde 5 kg/m³ ve 30 m çaplı kafeslerde 6 kg/m³ stok yoğunluğu ile levrek yetiştiriciliği yapmaktadırlar. Aynı işletmeler 20 m – 30 m çaplı kafeslerde 5 kg/m³ stok yoğunluğu ile çipura yetiştiriciliği yapmaktadır.

Örnekleme dış bakıda hastalık belirtileri gösteren balıklardan seçilerek yapılmıştır. (A) işletmesinden örnekleme yapıldığı dönemde hastalık belirtileri levrek balıklarında görülürken, çipura balıklarında hastalık belirtisine rastlanmamıştır. Levrek balıklarında yavaş yüzme hareketinin görüldüğü, gözlerde opaklaşmanın olduğu, craniumu ortaya çıkaran lezyonların varlığı, solungaçların solgun olduğu, nadiren pullarda kabarma ve dökülme görüldüğü, anüste, ağız çevresinde, ağız içinde ve gözlerde kızarıklık olduğu işletme sorumlusu tarafından anamnez bilgileri olarak alınmıştır. Örnekleme en belirgin hastalık bulgularını taşıyan 250-280 g ağırlığında yedi adet levrek balığı ile işletmenin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

(B) işletmesinden örnekleme yapıldığı dönemde hastalık belirtileri gösteren 300 g ağırlığındaki yedi adet çipura balıkları ile örnekleme gerçekleştirilmiştir. Bu dönemde levrek balıklarında hastalık belirtisi gözlenmemiştir. Çipura balıklarında karında şişkinlik olduğu, yavaş yüzme hareketinin yanı sıra ventra-dorsal olarak ters dönme şeklinde yüzme hareketi görüldüğü, ventralde lezyonların bulunduğu ve kuyrukta erimenin olduğu ve irinli dışkının görüldüğü işletme sorumlusu tarafından anamnez bilgileri olarak alınmıştır. Hasta balıklar aseptik koşullar altında örneklenmiştir.

3.1.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

Standart bakteriyolojik testler için kullanılan malzemeler: Trypticase Soy Agar (Merck, 1.05458), Trypticase Soy Broth (Merck, 1.05459), Nutrient Broth (Merck, 1.05443), Marine Agar (Difco, 212185), TCBS Agar (Merck, 1.10236), Triple Sugar Iron Agar (Merck, 1.03915), Müeller Hinton Agar (Merck, 1.05437), Müeller Hinton Broth (Difco, 275730), Brain Heart Infusion Agar (Fluka,70138), Agar Technical NO:3 (Oxoid, LP 0013), Meat Extract (Merck, 1.03979), MacConkey Agar (Merck 1.05465), Bile Esculin Azide Agar (Himedia, M493), Tripton (Oxoid LP0042), Peptone (Biolab, 171103023), Oxidation Fermentation Basal Medium (Merck, 110282), Simons Sitrat Agar (Merck, 102501), Urea Agar Base (Merck, 1.08492), Urea (Merck, 1.08486), Nitrat Broth (Merck, 1.10204), MR/VP Medium (Himedia, M070–5006), Gelatine (Merck, 104078), Yeast extract (Difco, 244020), Bile salts (Oxoid, 455), Casitone (Bacto,225930), Ampicillin sodium salt (Sigma, A9518), Pyridoxal–5-Phosphate (Doğa ilaç, 7049243), Starch (Merck, 1.01253), Glycerol (Himedia, RM081), Likit Parafin (Kimetsan, KIM-VL/01CP/110502) (NaCl MX. 0,00002 % aL (Riedel-de Haën 13423), L- Ornitine Monohydrochloride (Merck, 6906.0025), L- Lysine Monohydrochloride (Merck, 5700), L- Arginine Monohydrochloride (Merck, 1.015440), L-cysteine (Merck, 1.02839), D-Mannitol (Merck, 1.07657), D- Ksiloz (Merck, 8689), D(+) Glukose Anhydrous (Merck, 1.08337), Saccarose (Merck, 1.07651), L-Arabinoz (Merck,1.01492), Maltose (Merck, 1.05910), D+Mannitol (Merck, 5980), D+Mannose (Merck, 1.05984), İnositol (Merck, 1.04728), Galaktose (Merck, 1.04058), Lactose Monohydrate (Merck, 1.07657), Sorbitol (Doğa ilaç), D-Fructose (Merck, 1.05323), Cresol Red (Merck 1.05225), Bromothymol Blue sodium salt (Sigma, 32774), Phenol (Merck, 1.00201), Sea Salt (Kimya ofisi), NaOH (Riedel-de Haën, 06203), HCl (Riedel-de Haën, 07102), 2-phenoxyethanol (Fluka, 10835), sodium acetate (Riedel-de Haën, 32319), Koagülaz (Fluka 74226).

Kullanılan hazır ticari diskler: ONPG Discs (BD, 231248), DD15T O129 150 µg (Oxoid, X3494B), DD15T O129 10 µg (Oxoid, X3494B), Ampicillin disc (AMP10) (BD, 254727), Oxolinic acid disc (OA2) (BD,231566), Rifampin disc (RA25) (BD, 2315760), Oxytetracycline disc (OT30) (Oxoid, 5864), Erythromycin disc (E15) (Patan, E002), Flumequine disc (UB30) (Oxoid, 6915), Cefoperazone disc (CFP75) (Patan, C006), Penisilin; G benzathine disc (Patan, P002), Sulfamethazine disc (Oxoid,

5970), Streptomycin disc (Oxoid, 5925), Kanamycin disc (K30) (Oxoid, 5710), Neomycin (Himedia), Bacitracin (Himedia), Polymyxin – B (Himedia) ve Novabiocin (Bioanalyse, 090617)'dir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için kullanılan malzemeler: Glacial Acetic Acid (Merck, 1.01056), Na₂EDTA (Sigma, E-5134), Trizma base (Sigma T6066), Ethidium bromide (Sigma, I-3643), Agarose (Sigma, A5093), SDS (Sigma, L-4390), PBS tablet (Medicago, 09-2051-100), Isopropanol (Merck 159191), Proteinase K (AppliChem, A3830) şeklindedir.

3.1.3. Araştırmada Kullanılan Kitler, Primerler ve Referans Suş

Araştırmada Kullanılan Kitler, Primerler ve Referans Suş: API 20E (BioMerieux, Fransa), API Staph (BioMerieux, Fransa), Mono-Va antibodies (Bionor AS, Norway, DN220), High Pure PCR Template Preparation Kit for genomic DNA - 100 reactions (Roche, 11796828001), PCR Master Mix (2X) (Fermantas, K0171), Primer (A18) (BM, 11006X124H10 1/2), Primer (S20) (BM, 11006B3-961506 2/2), 100 bp-1kb DNA Ladder (BBI, M102-1), 6X Loading Dye Solution (Fermantas, R0611), VetMic Gram negatif mo. (version 4) (SVA, E 395103), *E.coli* ATCC 25922 (MicroSwabs).

3.1.4. Araştırmada Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar

0,5 M EDTA (pH 8) 1 lt Stok

186,1 g EDTA 700 ml distile su içerisinde çözdürülmüştür.

10 M NaOH kullanılarak pH'sı 8'e ayarlanmıştır.

Distile su kullanılarak hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Otoklav ile steril edilerek saklanır (Topal Sarıkaya, 2008).

50X TAE (Tris Asetik Asit EDTA) Tamponu 1 lt Stok

242 g Tris base

57,1 ml Glacial Acetic Acid

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

242 gram Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra Glacial Acetic Acid eklenmiştir. EDTA en son eklenerek hacim distile su kullanılarak 1 litreye tamamlanmıştır (Topal Sarıkaya, 2008).

Proteinase K

Proteinase K son konsantrasyonu AppliChem kullanım talimatına göre 100 µg/ml olacak şekilde steril distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 200 µl'lik küçük hacimlerde saklanmıştır.

3.1.5. Araştırmada Kullanılan Cihazlar

Laboratuvarımızda mevcut olan aletler; HIRAYAMA marka HV 85L model otoklav, KOTTERMANN marka 2771 model inkübatör, BARNSTEAD marka SHKE 400-8 model çalkalamalı inkübatör, HETTICH marka D-78532 model santrifüj, ARÇELİK marka 5006 HF model buzdolabı, SANYO marka MDF-U5411 model derin dondurucu, TKA marka Pacific model saf su cihazı, OLYMPUS marka CX 21FS1 model ışık mikroskobu, EPENDORF marka mini santrifüj, THERMO SCIENTIFIC marka EC 120 Mini model düşey elektroforez cihazı, yatay elektroforez cihazı, THERMO SCIENTIFIC marka EC250-90 model elektroforez güç kaynağı ünitesi, THERMO SCIENTIFIC HERAEUS marka HERAsafe KS-12 Class II model çalışma kabini, Spektrofotometre (BIO-T), ve PCR (Biometra) cihazı yer almaktadır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bakteri İzolasyonu

Hastalık belirtilerini en çok gösteren on dört adet balık numuneleri örnekleme yapıldığı işletmelerin kafeslerinden seçilerek içi deniz suyu dolu plastik tanklara alınmışlardır. Çiftlik sahiplerinden anamnez bilgileri alındıktan sonra laboratuvara getirilen numuneler bistüri yardımıyla cranial insizyon yöntemi ile otopsileri yapılmıştır. Öncelikle dışı muayene yapılarak lezyon, hemoraji, eksoftalmi gibi klinik bulgular not edilmiştir. Balıklar uygun şartlar sağlandıktan sonra postkraniyal insizyon ile öldürülerek nekropsileri gerçekleştirilmiştir (Furones, 2001; Timur ve Timur, 2003; Noga, 2010; Candan ve Karataş, 2010; Whitman, 2004). İç bakıda organların klinik durumları hakkında yapılan tespitler not edilerek, karaciğer, böbrek ve dalaktan çeşitli besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Bakteriyolojik ekim için kullanılan besiyerleri, % 50'si % 36'luk deniz tuzuyla hazırlanmış Trypticase Soy Agar (TSA), Brain Heart Infusion (BHI) agar ve L-cysteine ilaveli Müeller Hinton (MH) agar, Thiosulfate-

citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar, Marine Agar (MA), % 70'i deniz tuzuyla hazırlanmış %36'lık deniz suyu içeren Ctophage Agar (CA) ve Flexibacter Maritimus Medium (FMM)'dur. Gerekli olduğunda histolojik çalışmalarda kullanılmak üzere % 10'luk formaldehit içinde doku örnekleri saklanmıştır.

Hastalık bulgusu taşıyan balık örneklerinden yapılan ekimler, çalışmanın yürütüleceği İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Balık Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilmiş ve 21°C'de inkübe edilmişlerdir. Besiyerleri 3 gün süre ile 24 saatlik periyotlarda kontrol edilmiştir. Gelişen kolonilerden saf koloniler elde edilmiştir.

3.2.2. Rutin Bakteriyolojik Yöntemler

Bakterilerin tanımlanmasında yardımcı olan rutin bakteriyolojik testler, İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Balık Hastalıkları Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış izolatlar Gram boyama ve paralel olarak %3'lük KOH solüsyonu ile Gram karakteristiği tayini (Buck 1982), asılı damla ile hareket muayenesi, sitokrom oksidaz ve katalaz, oksidasyon/fermentasyon (O/F), O/129'a duyarlılık, ONPG (β -galactosidase), TCBS'de üreme, *Vibro anguillarum* medium (VAM) indol, üre, MR, VP, jelatin, sitrat, nitrat, Tiple Sugar Iron (TSI) agarda üreme ve gaz oluşumu, amilaz, eskülin, McConkey agarda üreme, kanlı agarda üreme ve hemoliz, flexirubin pigment oluşumu, arjinin dihidrolaz, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukoz, arabinoz, mannitol, mannoz, maltoz, sakkaroz, inositol, sorbitol, galaktoz, laktoz, ksiloz, fruktoz, 4, 37, 40 ve 44°C'de üreme, %0, %3, %5 %8, %10 ve %15 tuzluluktaki nutrient brothda üreme testleri sonuçlarına göre temel gruplandırmaları yapılmıştır. Cins düzeyinde tanımlanan bakteriler uzun süreli saklama yöntemleri kullanılarak -20°C'de muhafaza edilmişlerdir (Çotuk, 2003; Buller, 2004).

Kok olduğu tespit edilen izolat için tüp kuagülaz testi, ticari EDTA'lı tavşan plazması kullanılarak yapılmıştır. Üreticinin önerileri doğrultusunda liyofilize haldeki 3 ml plazma üzerine 3 ml distile su eklenmesiyle kullanıma hazır çözelti haline getirilmiştir. Test için bu çözeltiden 0,3 ml alınarak steril bir tüpe aktarılmış ve bu tüpe daha önce BHI broth besiyerinde 21°C sıcaklıkta 24 saat süresince inkübe edilmiş kültürlerden alınan 0,1 ml örnek eklenmiştir. Daha sonra tüp 21°C sıcaklığındaki inkübatöre konmuş

ve saatte bir kez olmak üzere 6 saat boyunca pıhtı oluşumu kontrol edilmiştir. Bu süre sonunda negatif sonuç veren suşlar için son karar verilmeden önce 24 saatlik inkübasyon süresi beklenmiştir. Tüp içeriğinin % 75 veya daha fazlasının yapışık kitleler halinde pıhtı oluşturduğu testler pozitif kabul edilmiştir. Negatif kontonrol için ekim yapılmamış, BHI broth besiyeri içeren tüp kullanılmıştır (Whitman, 2004). T

3.2.3. API Hızlı Tanı Kitlerinin Kullanımı

Klasik mikrobiyolojik yöntemler ile 13 saf izolata API 20E, farklı 2 saf izolata ise API Staph hızlı tanı kitleri uygulanmış ve tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu kitler üretici firma Biomereix'un talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. İnkübasyon sıcaklığı 21°C ve inkübasyon süresi 48 saat olarak tercih edilmiştir. Kitlerin okunması için kullanılan araçlar inkübasyon süresi sonunda kullanım kılavuzunda belirtildiği sıra ile ve gerekli miktarlarda damlatılmışlardır.

3.2.4. Aglütinasyon Yöntemi

Biyokimyasal testler ve API hızlı tanı kitlerinin sonuçlarına göre *Vibrio* olarak teşhis edilen suşların aglütinasyon testleri ticari olarak satılan BIONIOR Mono-Va Aglütinasyon Kiti (BIONOR, Norveç) ile gerçekleştirilmiştir. Kit üretici firmanın kullanım talimatına uygun olarak kullanılmıştır. Kontrol ve test serumları ilgili yerlere damlatılarak bakteri örneklerinin de ilave edilmesiyle antikor-antijen birleşmesi gözlenmiştir.

3.2.5. Moleküler Yöntemler

3.2.5.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen toplam 15 suş'un genomik DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit for genomic DNA (Roche, 10737300) kullanılmıştır. Ürün içerisinde bulunan Proteinaz K yeterli miktarda olmadığından Proteinaz K solusyonu kitin üretici firmasının kullanım talimatına uygun miktarda kullanılmak üzere AppliChem kullanım talimatında belirtilen konsantrasyonda hazırlanarak kullanılmıştır. 100 µg/ml konsantrasyonda Proteinaz K solusyonu için pro K toz'dan 0,4 mg alınarak 4 ml steril suda çözündürülmüştür ve 20 adet steril mikrotüpe 200'er µl'lik küçük hacimlere bölerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Bakterilerin saf kültürlerinden tuzlu nutrient brothda 21°C'de 24 saatte üretilmiş taze suşlar hazırlanmıştır. İşleme başlamadan önce Elution buffer 70°C'ye ısıtılmıştır. Sıvı besiyerinde üretilmiş bakteri kültüründen 1,5 ml'lik nükleaz-free mikrotüplere 200 µl kadar alınarak 6700 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülüp dipteki bakteri peletleri üzerine 200 µl PBS ilave edilerek çözümleri sağlanmıştır. 200 µl Bindig Buffer ekleyip 40µl Proteinaz K ilave edip karıştırıp hemen 70°C'ye alınarak 10 dk bekletilmiştir. Sonrasında 100 µl isopropanol ekleyerek iyice karıştırılmıştır. Koleksiyon tüpüne filtreli tüpü koyarak sıvı örneğini kolona aktarılmıştır. 1dk 11000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Filtre çıkartılarak yeni koleksiyon tüpüne konulmuştur. Üzerine 500 µl inhibitör Removal Buffer eklenerek 1dk 11000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Filtre çıkartılarak yeni koleksiyon tüpüne konulmuş ve 500 µl Wash buffer eklenerek 1dk 11000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi tekrarlanarak üst sıvı atılmıştır ve 10sn daha santrifüj edilmiştir. Filtre alınarak temiz 1,5 ml'lik tüpe konulmuştur. 200 µl ısınmış Elution Buffer ekleyerek 1dk 11000 rpm'de santrifüj edilmiştir ve -20°C'de saklanmıştır. Elde edilen DNA ürünleri % 0,6 lık 40 ml'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Topal Sarıkaya, 2008).

İzole edildiğinden emin olunan DNA ürünlerinin miktarının ölçülmesi ve hesaplanması gerçekleştirilmiştir. İzole edilmiş mevcut 200 µl DNA'dan 20 µl alınarak ayrı bir mikrotüpte 980µl distile su ile 50 kat sulandırılmıştır. 1ml'lik quartz küvete alınan sulandırılmış DNA'nın 260nm ve 282 nm'de absorbans değerleri ölçülerek birbirine olan oranlarına bakılmıştır. 1,7–2,8 arası yaklaşık 2 gibi bir oran bulunması beklenmiştir (Topal Sarıkaya, 2008). Absorbansın '1' değeri 1ml'lik küvette 50 µg/ml miktarında çift zincirli DNA'yı temsil ettiği bilinmektedir (Topal Sarıkaya, 2008). DNA konsantrasyonu (µg/ml) = OD260 x Seyreltme katsayısı x 50 µg/ml formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda PCR Master Mix (2X) (Fermantas, K0171), kiti tercih edilmiş ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Reaksiyonda 16S genine ait 519 bp'lik kısmı çoğaltmaya yarayan A18 isimli 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3' ve S20 isimli 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3' primerleri (Suau ve diğ., 1999) üretici firmanın talimatları doğrultusunda sulandırılarak kullanılmıştır. Reaksiyon için örnek başına kullanılan maddeler ve miktarları; primer

A18 (10 pmol) 2 µl, primer S20 (10 pmol) 2 µl, kalıp DNA (0,1 – 1 µg) 2 µl, PCR Master Mix (2X) 25 µl ve nuclease-free su 19 µl. Kalıp DNA dışında tüm reaksiyon bileşenleri sırasıyla su, PCR Master Mix (2X) ve primerler bir tüp içerisinde hazırlanarak 0,5 ml'lik mikrotüplere her DNA için 48 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. En son kalıp DNA'lar da tüplere ilave edilerek reaksiyonun gerçekleşeceği cihaza yerleştirilmiştir. Program 95°C'de 3 dk sıcaklığı sağladıktan sonra 95°C'de 1 dk, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk olacak şekilde 30 döngü ve son olarak 72°C'de 4 dk olacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örnekler 4°C'de tutulmuştur (Suau ve diğ., 1999).

3.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi izole edilen kalıp DNA'ların ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için yapılmıştır.

Kalıp DNA'ların görüntülenmesi için kullanılacak olan agaroz jel % 0,6'lık konsantrasyonda 40 ml kadar hazırlanmıştır (Topal Sarıkaya, 2008). Öncelikle 50X TAE stoğundan 400 ml 1X TAE hazırlanmıştır. 40 ml 1X TAE ile 0,24 g agaroz karıştırılarak mikrodalgada 3 dk kaynatılmıştır. İyice berraklaştığı görülen karışım 50°C'ye soğutulurak 1 µl etidyum bromür ilave edilerek karıştırılmıştır. Elektroforez cihazının tablasına dökülen jele örnek miktarına uygun tarak yerleştirilerek donmaya bırakılmıştır. Agaroz jel donduktan sonra kalan 1X TAE cihazın işaretli yerine kadar doldurularak örnekler kuyucuklara yerleştirilmiştir. Her bir DNA örneği 10µl alınarak 2µl Loading dye ile birleştirilerek kuyucuklara yerleştirilmiştir. 100-1000bp'lik Ladder 12 µl olarak kullanılmıştır.

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için kullanılacak olan agaroz jel %1,5'luk konsantrasyonda hazırlanmıştır. 1X TAE stoğu ile hazırlanan 40 ml 1X TAE ile 0,6 g agaroz karıştırılarak mikrodalgada 3 dk kaynatılmıştır. İyice berraklaştığı görülen karışım 50°C'ye soğutulurak 1 µl etidyum bromür ilave edilerek karıştırılmıştır. Elektroforez cihazının tablasına dökülen jele örnek miktarına uygun tarak yerleştirilerek donmaya bırakılmıştır. Agaroz jel donduktan sonra kalan 1X TAE cihazın işaretli yerine kadar doldurularak örnekler kuyucuklara yerleştirilmiştir. Her bir PCR ürünü örneği 10 µl alınarak 2 µl Loading dye ile birleştirilerek kuyucuklara yerleştirilmiştir. 100–1000 bp'lik Ladder 12 µl olarak kullanılmıştır.

Örneklerin kuyucuklara yüklenmesinden sonra 90 V'da 40 dk yürütülmüşlerdir. Süre sonunda agaroz jelde yürüyen örnekler UV ışığı altında incelenmiş ve ürün bantları gözlemlenmiştir.

3.2.5.4. 16S ve DNA Dizi Analizi

Elde edilen PCR ürünleri 50 ng/μl yoğunluğunda ve minimum 25 μl olacak şekilde hazırlanıp dizi analizini yapacak olan IONTEK laboratuvarına gönderilmiştir. Analiz için gerekli olan primerler ise 5 pmol/μl yoğunluğunda ve her bir örnek için 10μl olacak şekilde hazırlanarak laboratuvara teslim edilmiştir. Her ürün için çift yönlü okuma ve saflaştırma işlemi yaptırılmıştır. Ham dizi verileri Bioedit Sequence Alignment Editor programı ile tek bir dizi haline getirilmiştir. Gen Bankası nükleotid blast işlemi ile en yakın türler ve benzerlik oranları her suş için tespit edilmiştir (BLAST, 2012).

3.2.6. Antibakteriyel Maddelere Duyarlılıkların Belirlenmesi

3.2.6.1. Disk Difüzyon Testi

İzole edilen bakterilerin kemoterapötiklere duyarlılıkları CLSI M100-S22 protokolünde tarif edilen disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir (Miranda & Zemelman, 2002; Llitha, 2010; CLSI, 2012). Bu amaçla uygun besiyerlerinde üretilmiş olan en fazla 24 saatlik taze bakteri kültüründen 3–4 bakteri kolonisi seçilerek CLSI M42-A Akuatik hayvanlardan izole edilen bakteriler için disk difüzyon yöntemi standardında belirtilen yöntemler dikkate alınarak %1,5 deniz tuzu içeren MH broth besiyerine ekim yapılmıştır (CLSI, 2006). Uygun sıcaklık ve gerekli süre sonunda 0,5 McFarland değerine ulaşan kültürlerden %1,5 deniz tuzu içeren Müeller Hinton agara eküvyon çubuğu ile yayılarak ekim yapılmıştır. Agarın inokulum sıvısını emmesi için maksimum 15 dk beklenmiştir. Oxoid marka ticari diskler Kirby-Bauer yöntemine göre her disk arasında 24 mm olacak şekilde yerleştirilmiştir. 10 dk içinde gerekli inkübasyon sıcaklığı olan 21°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (CLSI, 2012).

Ticari olarak üretilmiş sulfametazin disk 25 μg, eritromisin disk 15 μg, kanamisin disk 30 μg, streptomisin disk 10 μg, oksitetrasiklin disk 30μg, flumekuın disk 30 μg, sefoperazon disk 75 μg, ampisilin disk 10μg, penisilin; G benzatin disk 10 μg, rifampisin disk 25 μg, oksolinik asit gibi diskler bu amaçla kullanılmıştır (FAO, 2005; Bilgehan, 2004).

3.2.6.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) Testi

MİK belirlemek için VetMIC test kitleri üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle bakteriler % 1,5 deniz tuzu içeren Mueller- Hinton (MH) broth besiyerinde üretilerek, 0,5 McFarland yoğunlukta hazırlanmıştır. 0,5 McFarland yoğunluğundaki bakteri kültüründen 10 µl alınarak 10 ml % 1,5 deniz tuzu içeren Müeller Hinton (MH) broth besiyerine ilave edilmiştir. Hazırlanan bu solüsyondan 50 µl alınarak VetMIC test plaklarındaki her kuyucuğa ilave edilmiştir. Kontrol olarak *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanılmıştır.

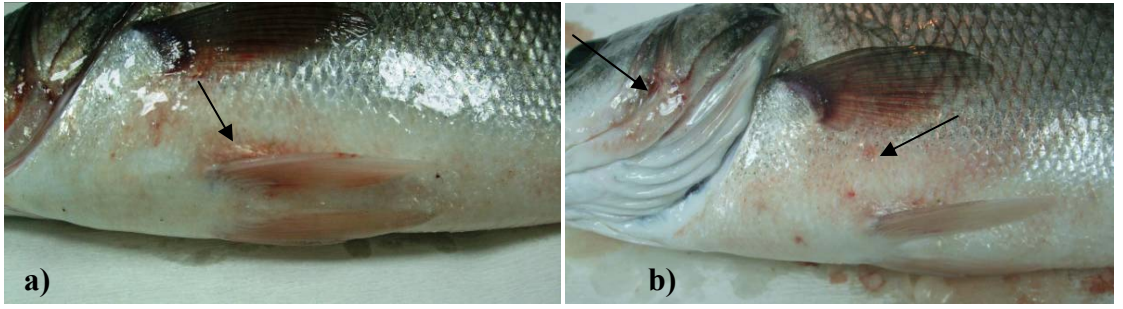
Ticari *E. coli* suşunun çoğaltılması ve saklanması; *E. coli* ATCC 25922 (MECCONTI-Microswap)' suşunun içinde bulunduğu eküvyon çubuğu sıvı kısmın olduğu yerden 45 derecelik açıyla nazik bir şekilde kırılmıştır. Sıvı peletin olduğu yere tamamen akana kadar sıkılmıştır. Sıvı ile pelet çözülerek ıslanmış olan eküvyon çubuğu çıkartılarak TSA'ya 4 pasaj alınmıştır. Kalan sıvı TSB bulunan dört tüpe paylaştırılmıştır ve 37°C'de bütün gece inkübe edilmiştir. 4 pasajdan 1 tanesi yeni pasaj almak için kullanılmıştır. Kalan 3 tanesi 4°C'de saklanmıştır. Tüplerde ve ependorflarda yatık olarak hazırlanmış TSA'lara pasaj alıp 37°C'de inkübe edilerek 4°C'de saklanmıştır. TSB'de gelişen bakteri kültürleri, % 75 bakteri kültürü % 15 steril gliserol olacak şekilde süspanse ederek mikrotüplerde uzun süreli olarak saklanmıştır.

Bakteri kültürlerinden 3–4 bakteri kolonisi seçilerek 5ml MHB'a ekilmiştir. Her bakteri 21°C'de gerekli sürede inkübe edilerek 595 nm'de 0,2 absorbans değerine ulaşmaları sağlanmıştır. 0,5 McFarland değerine ulaşmış kültürü vorteksleyip hücre yoğunlu 10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (Lalitha, 2004). Temiz bir petriye son karışım dökülerek 96 kuyucuklu VetMIC test plaklarına 8'li otomatik pipet yardımıyla her kuyucuğa 50 µl ekim yapılmıştır. Stiker ile plak kapatılarak *E. coli* için 37°C'de diğer suşlar için 21°C'de 16–18 saat inkübasyon sonunda okunmuştur. Berrak olarak kalmış, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonun olduğu kuyucuk işaretlenmiştir.

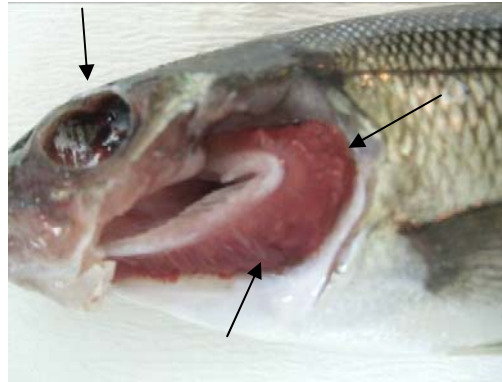
4. BULGULAR

4.1. KLİNİK VE OTOPSİ BULGULARI

Ege bölgesinde bulunan iki farklı deniz balığı işletmesinden örneklenen hasta levrek ve çipura balıklarına ait bulgular Şekil 4.1 – 4.10’da verilmiştir. A işletmesinden alınan 250-280 g ağırlığındaki 7 adet levrek balığında vücutta ventral yüzgeç (Şekil 4.1) ve solgun solungaç lamellalarında hemorajiler dışında herhangi bir dış bulgu görülmemiştir.

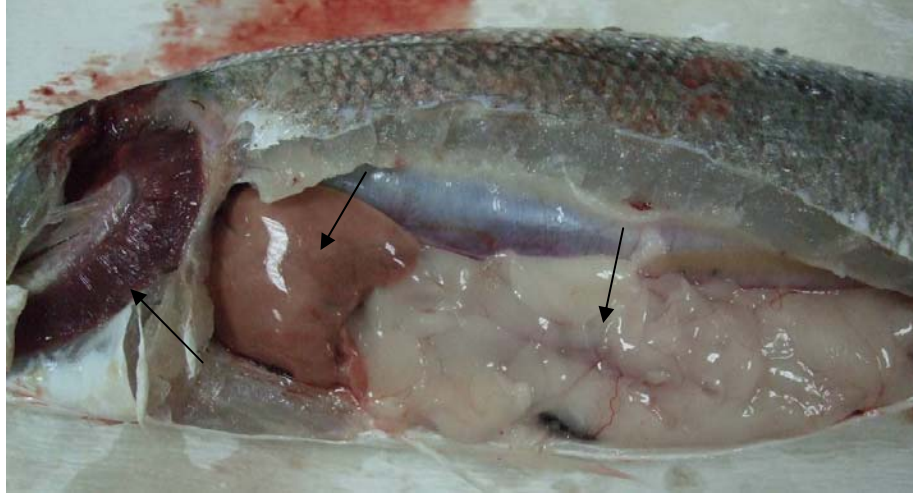


Şekil 4.1: Levrek balığında ventral ve pektoral yüzgeçte hemoraji



Şekil 4.2: Tek gözünü yitirmiş 6 numaralı levrek balığının ve solgun solungaç lamellalarında görülen hemoraji

Bunlara ek olarak 6 numaralı levrek balığının tek gözünü yitirmiş olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.2). İnternal olarak karın boşluğunda aşırı yağlanma ve karaciğerin solgun olduğu örneklenen bütün balıklarda tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Levrek balığında solungaçta hemoraji, karaciğerde anemi ve iç organlarda yağlanma

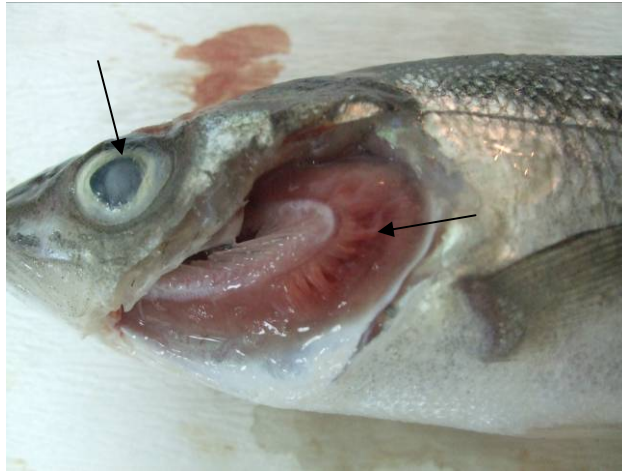


Şekil 4.4: Normalden daha büyük olan dalağın görüntüsü

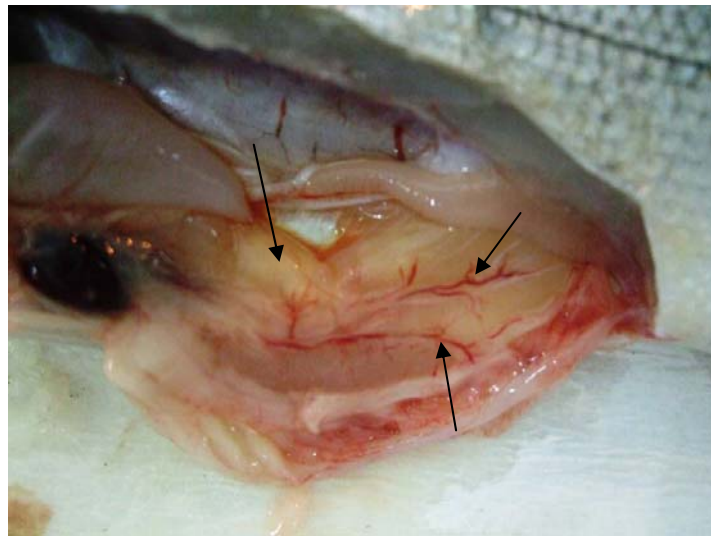
Ayrıca dalağın normalden biraz daha büyük olduğu dikkati çeken bulgular arasındadır (Şekil 4.4). Örneklenen diğer balıklarda görülen benzer bulgulara ek olarak 7 numaralı balıkta baş üzerinde craniumu ortaya çıkaran ülseratif lezyonun varlığı (Şekil 4.5), gözün opaklaştığı ve solungaç lamellalarının eriyerek birbirine yapıştığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.6). İnternal olarak bağırsak içi beyaz – opak, şeritler halinde mukoid madde varlığı ve bağırsağın sarı şeffaf bir sıvı ile dolu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.5: 7 numaralı levrek balığında görülen cranium'u ortaya çıkaran ülseratif lezyon



Şekil 4.6: Gözde opaklaşma ve solungaç lamellalarında yapışma



Şekil 4.7: 7 numaralı levrek balığında beyaz – opak, şeritler halinde mukoid sarı şeffaf bir sıvı ile dolu hiperemik bağırsak

B işletmesinden örneklenen ~ 300g ağırlığındaki bütün çipura balıklarında internal olarak karın boşluğunda aşırı yağlanma, karaciğerin aşırı solgun ve hemorajik olduğu tespit edilmiştir. Diğer balıklardaki bulgulara ek olarak 1 numaralı çipura balığında eksternal olarak karnın oldukça şişkin olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Dalağın normalden küçük, abdominal boşlukta ve bağırsakta kanlı sıvı biriktiği, bağırsak duvarının hemorajik olduğu internal bulgular olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.8: 1 numaralı çipura balığının oldukça şişkin olan karın görüntüsü

2 ve 3 numaralı balıkta kuyruk yüzgecinde erime (Şekil 4.9) dışında herhangi bir dış bulgu gözlenmezken, operkulumun iç kısmında sıvı birikimi, peteşiyal hemoraji ve solungaçların solgun olduğu dikkati çekmiştir.



Şekil 4.9: 2 numaralı çipura balıklarında kuyruk yüzgecinde erime

4 numaralı çipura balığının solungaçlarının hiperemik, karaciğerinin solgun ve peteşiyal hemorajik olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). Safra kesesi zarının inceldiği ve safra ile dolu olduğu, böbreğin erimiş olduğu gözlemlenmiştir.

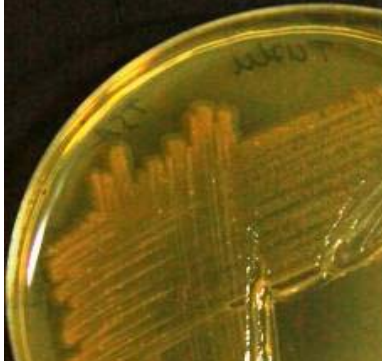
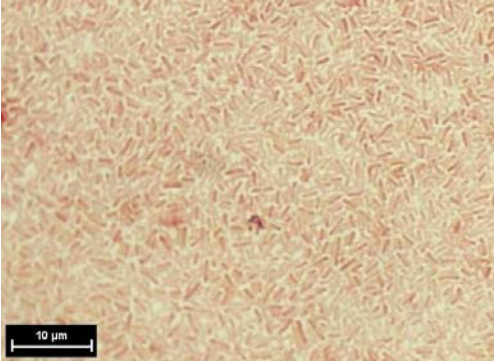
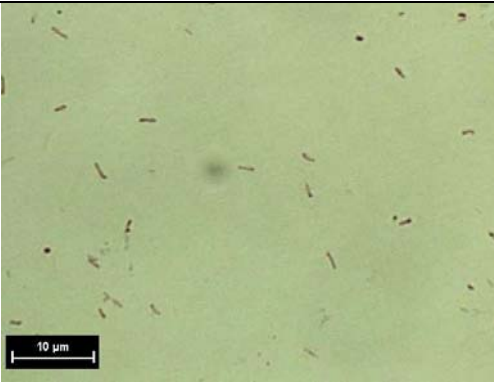
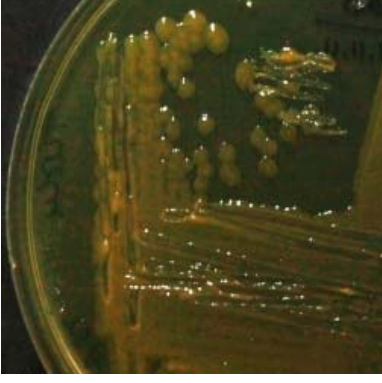
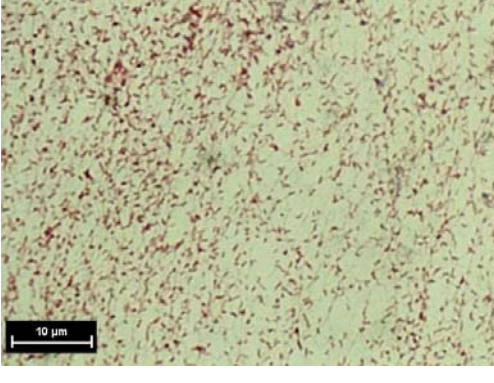


Şekil 4.10: 4 numaralı çipura balığında hiperemik solungaçlar, solgun ve peteşiyal hemorajik karaciğer

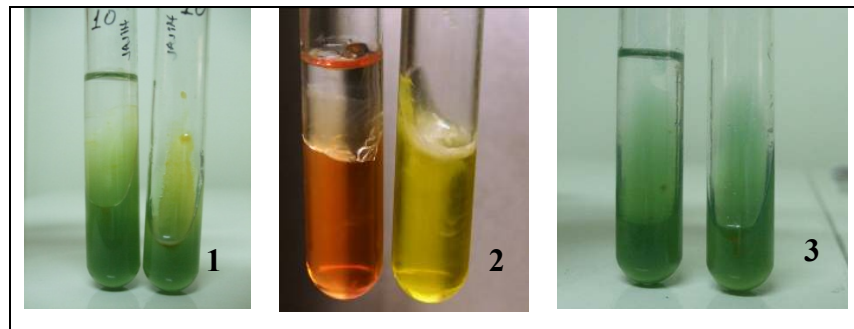
4.2. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR

Hasta çipura ve levrek balıklarının örneklenmesi sonucunda tuzlu TSA, MA, FMM, BHI besiyerlerinde izole edilen 14 adet izolat koloni morfolojisi, Gram boyama, hareket, sitokrom oksidaz, katalaz ve O/F özellikleri açısından incelenerek gruplara ayrılmıştır. İzolatların biyokimyasal özellikleri hem standart tüp yöntemiyle hem de çeşitli API hızlı tanı kitleriyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm saf izolatlarla ait fenotipik özellikler Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de verilmiştir.

1 ve 2 numaralı izolatlar 7 numaralı levrek balığının dalağından sırasıyla tuzlu TSA ve MA besiyerlerinde, 3 numaralı 1 izolat ise 1 numaralı levrek balığının dalağından FMM besiyerinde izole edilmiştir. İzole edilen üç izolatın da TSA besiyerinde krem renkli, parlak, konveks, yuvarlak düzgün kenarlı koloniler oluşturdukları, yoğun kıvamlı ve viskoz bir yapıya sahip oldukları görülmüştür. 24 saatten yaşlı kültürlerde kolonilerin üzerinde siyah renkli pigmentlerin olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Bu izolatlarla ait bakterilerin 1 – 6 µm uzunluğunda ve 0,5 – 1 µm genişliğinde, genel olarak çomak şeklinde pleomorfik, Gram negatif (Şekil 4.11), hareketli, sitokrom oksidaz, MR, jelatin ve fruktoz pozitif, ONPG, indol, VP, nitrat, amilaz, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu, arabinoz, maltoz, inositol, sorbitol, galaktoz, laktoz, ksiloz ve ramnoz testlerine negatif sonuç verdikleri, TCBS agarda ve VAM besiyerinde gelişme göstermedikleri, McConkey agarda sarı koloniler oluşturdukları tespit edilmiştir.

İN	Koloni morfolojileri (TSA)	Gram profilleri
1		
2		
3		

Şekil 4.11: 1, 2, 3 numaralı izolatların TSA'daki koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000)



Şekil 4.12: 1, 2, 3 numaralı izolatların O/F profilleri

% 3-15 NaCl arası tuzlulukta ve 37°C’de üreyebilen 1, 2 ve 3 numaralı izolatların diğer bazı özellikleri değişkenlik göstermiştir. 1, 2 ve 3 numaralı izolatların pembe OF’de oksidatif sonuç verdikleri ancak 1 numaralı izolatın yeşil OF’de zayıf oksidatif reaksiyon verdiği 3 numaralı izolatın ise yeşil OF’de üremediği gözlenmiştir (Şekil 4.12). 2 ve 3 numaralı izolatlar katalaz testine pozitif sonuç verirken, 1 numaralı izolat katalaz testine negatif reaksiyon göstermiştir. 1 ve 3 numaralı izolatların O/129 (10 µg ve 150 µg)’a hassas oldukları, 2 numaralı izolatın yalnızca 150 µg etken madde içeren O/129’a hassas olduğu görülmüştür.

1 ve 3 numaralı izolatların üre testine negatif, 2 numaralı izolatın ise pozitif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. 2 ve 3 numaralı izolatların sitrat testine pozitif, 1 numaralı izolatın negatif, eskülin testine yalnızca 1 numaralı izolatın pozitif sonuç verdiği görülmüştür (Şekil 4.13). Arjinin dihidrolaz testine yalnızca 3 ve glukoz testine 1 numaralı izolat pozitif sonuç vermiştir. Mannitol ve sakkaroz testine ise yalnızca 3 numaralı izolat negatif sonuç vermiştir. Mannoz testine negatif sonuç veren yalnızca 2 numaralı izolat olmuştur (Şekil 4.12). Bütün özellikleri incelendiğinde üç bakteri izolatının da (1, 2 ve 3 numaralı izolatlar) *Pseudoalteromonas* sp. olduğu teşhis edilmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4.13: 1 numaralı izolata ait eskülin testi pozitif sonucun görüntüsü

Tablo 4.1: 1, 2 ve 3 numaralı izolatlara ait fenotipik özellikler

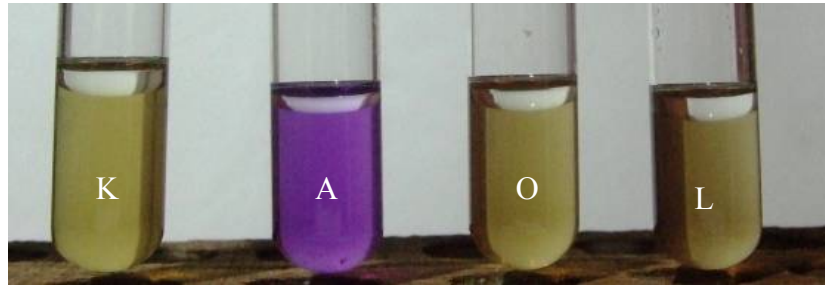
İN		1	2	3
BN		7. Levrek	7. Levrek	1. Levrek
Organ		Dalak	Dalak	Dalak
İzolasyon besiyeri		TSA	MA	FMM
Koloni morfolojisi		Krem renkli, parlak, konveks, yuvarlak, düzgün kenarlı, viskoz, siyah renkli pigmentler içeriyor.		
Gram		-	-	-
Hücre morfolojisi		Uzun basil	Pleimorfik	Kıvrık basil
Hareket		+	+	+
Sitokrom oksidaz		+	+	+
Katalaz		-	+	+
O/F		O	O	O
O/129	10 µg	H	D	H
	150 µg	H	H	H
TCBS		-	-	-
VAM		-	-	-
ONPG		-	-	-
İndol		-	-	-
Üre		-	+	-
MR		+	+	+
VP		-	-	-
Sitrat		-	+	+
Nitrat		-	-	-
Jelatin		+	+	+
TSI		-	K/K	K/K
Amilaz		-	-	-
Eskülin		+	-	-
McConkey		Sarı	Sarı	Sarı

Tablo 4.1'in devamı

İN	1	2	3
Arginin dihidrolaz	-	-	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	-	-
Glukoz	+	-	-
G. gaz oluşumu	-	-	-
Arabinoz	-	-	-
Maltoz	-	-	-
Mannitol	+	+	-
Sakkaroz	+	+	-
Mannoz	+	-	+
İnositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Galaktoz	-	-	-
Laktoz	-	-	-
Ksiloz	-	-	-
Fruktoz	+	+	+
Ramnoz	-	-	-
4°C' de üreme	-	-	-
37°C' de üreme	+	+	+
40°C' de üreme	+	-	+
44°C' de üreme	+	-	-
NaCl' de üreme	0%	-	-
	3%	+	+
	5%	+	+
	8%	+	+
	10%	+	+
	15%	+	+
API 20E profili	000212461	021212463	220200441
Teşhis	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.

İN= İzolat numarası, BN= Balık numarası, O= Oksidatif, F= Fermentatif, Z=Zayıf, D=Dirençli, H=Hassas, G= Glukoz, A=Asit (Sarı) K=Alkalın (Pembemsi kırmızı), H₂S=Hidrojen sülfid üretimi

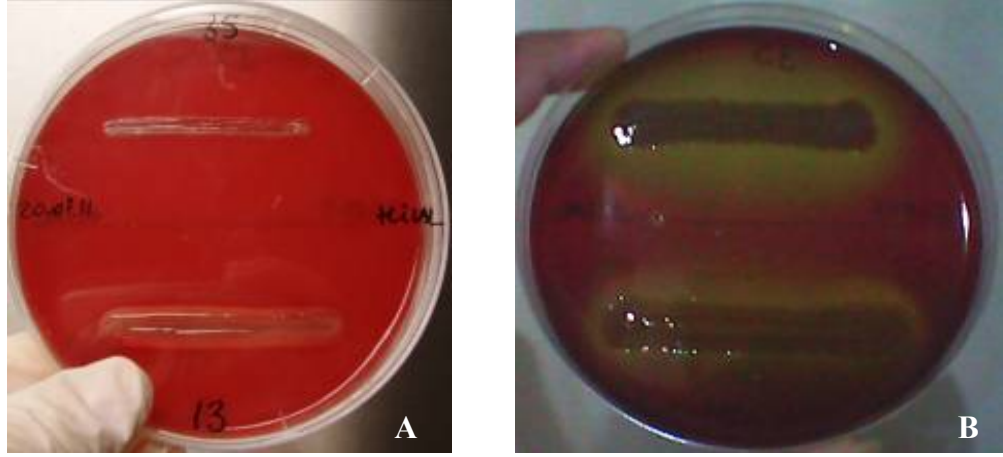
7 numaralı izolat 7 numaralı levrek balığının böbreğinden sırasıyla FMM besiyerlerinde izole edilmiştir. 5, 6 ve 8 numaralı izolatlar ise 6 numaralı levrek balığının karaciğer ve böbreğinden BHI, MA ve FMM besiyerleri ile izole edilmişlerdir. İzole edilen beş izolatın da tuzlu TSA’da krem renkli, parlak, konveks, yuvarlak düzgün kenarlı yumuşak (Şekil 4.16), TCBS agar ve McConkey agarda ise sarı koloniler oluşturdıkları görülmüştür. Bu bakterilerin 1 – 5 µm uzunluğunda ve 0,5 – 1 µm genişliğinde, Gram negatif, kıvrık çomak şekilli ve hareketli oldukları, fermentatif, sitokrom oksidaz, katalaz, ONPG, indol, nitrat, jelatin testlerinde pozitif sonuç verdikleri, üre, eskülin negatif oldukları tespit edilmiştir. İzole edilen dört izolatın (5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatlar) arjinin dihidrolaz testine pozitif, ornitin ve lizin dekarboksilaz testlerine negatif sonuç verdiği görülmüştür (Şekil 4.14). Şekerlerden maltoz, manniol, negatif, mannoz, sorbitol, galaktoz ve fruktozdan asit oluşumuna pozitif sonuç, laktoz, ksiloz ve ramnozdan asit oluşumuna ise negatif sonuç verdikleri tespit edilmiştir. (Tablo.4.2)



K: Kontrol, A: arjinin dihidrolaz, O: Ornitin dekarboksilaz, L: Lizin dekarboksilaz

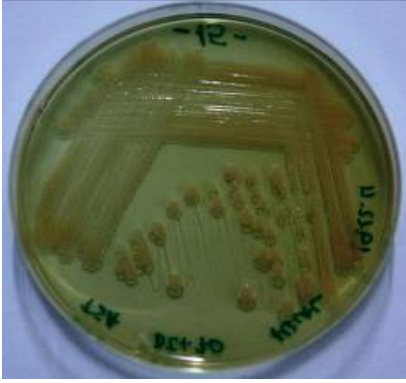
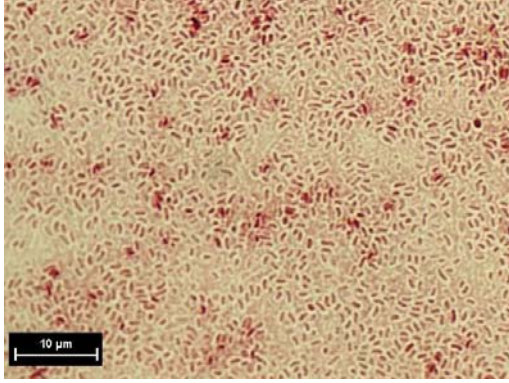
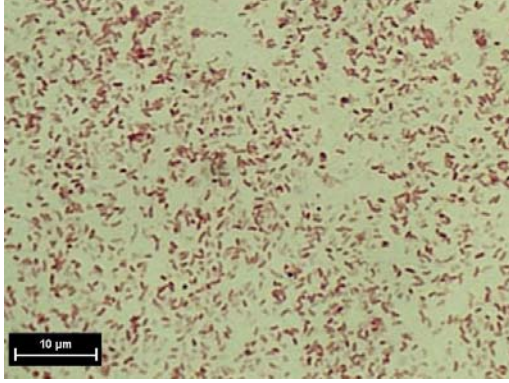
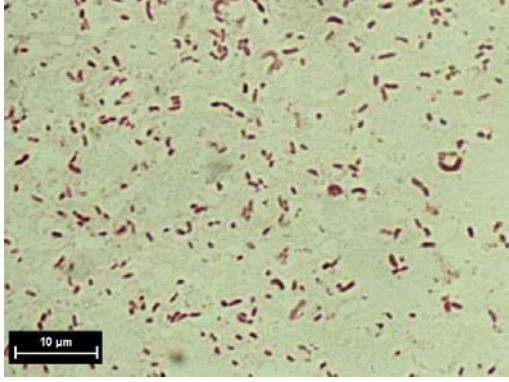
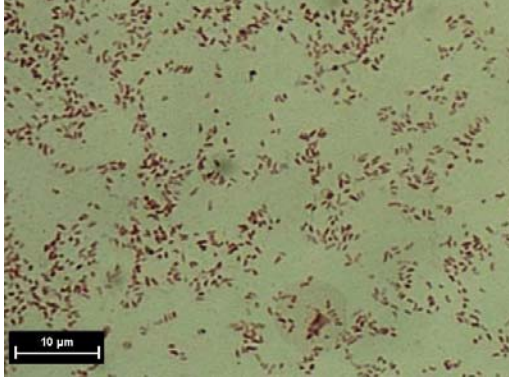
Şekil 4.14: Arjinin dihidrolaz testine pozitif, ornitin ve lizin dekarboksilaz testlerinin negatif sonuçları

5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların 10 µg ve 150 µg etken madde içeren O/129’a hassas oldukları görülmüştür. TCBS agarda sarı koloniler oluşturdıkları (Şekil 4.17) ve 72 saat sonunda β-hemoliz gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

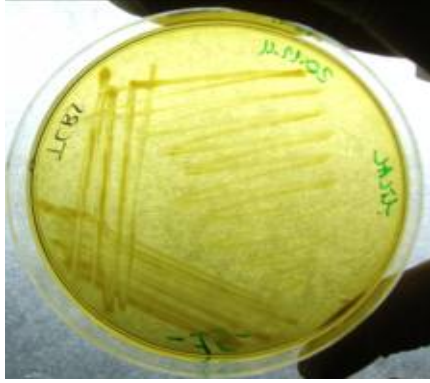
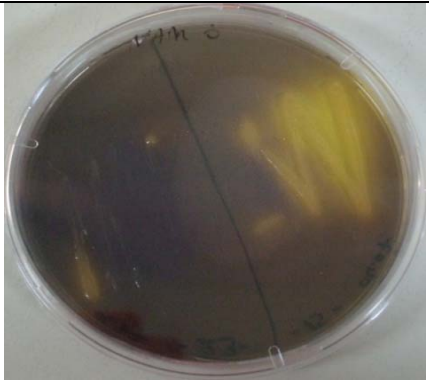
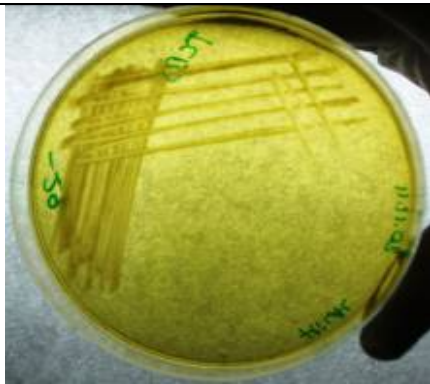
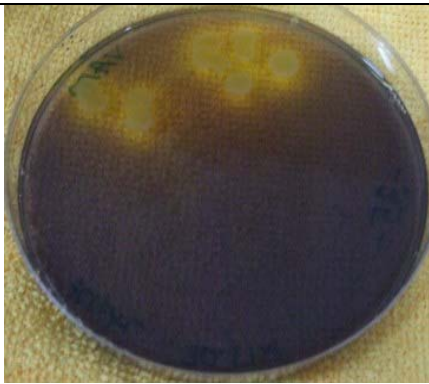
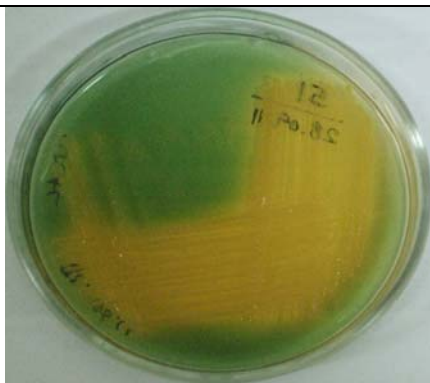


Şekil 4.15: Kanlı agarda 4 ve 8 numaralı izolatların A) 24 saat ve B) 72 saat sonunda β -hemolizi

8 numaralı izolat TSI agarda her üç şekeri de kullanıp asit oluşturmuş ve besiyerinin rengini sarıya çevirmiştir. 6 ve 7 numaralı izolatlar ise şekerleri kullanmamış yalnızca demiri kullanarak alkalın bir ortam oluşturmuştur. Besiyerinin rengini pembemsi kırmızı rene çevirmiştir. 5 numaralı izolat ise üç şekerden ikisini kullanmış ve besiyerinin eğik kısmı kırmızı kalmıştır. 8 numaralı izolat glukozdan gaz oluştururken 5, 6 ve 7 numaralı izolatlar gaz oluşumu göstermemiştir. 6 ve 7 numaralı suşlar arabinoz testine negatif sonuç verirken, 5 ve 8 numaralı suşlar pozitif sonuç vermiştir. 5, 6 ve 7 numaralı suşlar inositol testine negatif sonuç verirken 8 numaralı suş pozitif sonuç vermiştir. 40°C’ de ve 44°C’ de 5 numaralı suş gelişme göstermemişken, 6, 7 ve 8 numaralı suşlar bu sıcaklık aralıklarında da gelişme göstermişlerdir. 5, 7 ve 8 numaralı suşlar MR testine negatif, VP ve sitrat testine pozitif, 6 numaralı suş ise MR testine pozitif, VP ve sitrat testine negatif sonuç vermiştir. Uygulanan biyokimyasal test sonuçlarına göre 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatlar *V. anguillarum* olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

İN	Koloni morfolojileri	Gram profilleri
5		
6		
7		
8		

Şekil 4.16: 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000)

Üreme özelliği	TCBS'de	VAM'da
5		
6		
7		
8		

Şekil 4.17: 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların VAM' da ve TCBS agarda üreme özelliği

Tablo 4.2: 5, 6, 7 ve 8 numaralı izolatların fenotipik özellikleri

İN		5	6	7	8
BN		6. Levrek	6. Levrek	7. Levrek	6. Levrek
Organ		Karaciğer	Böbrek	Böbrek	Böbrek
İzolasyon besiyeri		BHI	MA	FMM	FMM
Koloni morfolojisi		Krem renkli, parlak, konveks, yuvarlak düzgün kenarlı, yumuşak			
Gram		-	-	-	-
Hücre morfolojisi		Kıvrık basil	Kıvrık basil	Kıvrık basil	Kıvrık basil
Hareket		+	+	+	+
Sitokrom oksidaz		+	+	+	+
Katalaz		+	+	+	+
β-hemoliz		+	+	+	+
O/F		F	F	F	F
O/129	10 µg	H	H	H	H
	150 µg	H	H	H	H
TCBS		Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
WAM		Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
ONPG		+	+	+	+
İndol		+	+	+	+
Üre		-	-	-	-
MR		-	+	-	-
VP		+	-	+	+
Sitrat		+	-	+	+
Nitrat		+	+	+	+
Jelatin		+	+	+	+
TSI		K/A	K/K	K/K	A/A
Amilaz		-	-	-	+
Eskülin		-	-	-	-
McConkey		Sarı	Sarı	Sarı	Sarı

Tablo 4.2'nin devamı

İN	5	6	7	8
Arjinin dihidrolaz	+	+	+	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-
Glukoz	+	+	+	+
G. gaz oluşumu	-	-	-	+
Arabinoz	+	-	-	+
Maltoz	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Sakkaroz	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	+
Galaktoz	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-
Ksiloz	-	-	-	-
Fruktoz	+	+	+	+
Ramnoz	-	-	-	-
4°C' de üreme	-	-	-	-
37°C' de üreme	+	+	+	+
40°C' de üreme	-	+	+	+
44°C' de üreme	-	+	+	+
NaCl' de üreme	0%	-	-	-
	3%	+	+	+
	5%	+	+	+
	8%	+	+	+
API 20E profili	324752677	304652477	324752477	324772677
Teşhis	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>

İN= İzolat numarası, BN= Balık numarası, O= Oksidatif, F= Fermentatif, Z=Zayıf, D=Dirençli, H=Hassas, G= Glukoz, A=Asit (Sarı) K=Alkalın (Pembemsi kırmızı), H₂S=Hidrojen sülfid üretimi

4 numaralı izolat 7 numaralı levrek balığının dalağından BHI besiyerinde izole edilmiştir. Tuzlu TSA'da gelişen ve krem renkli parlak, opak koloniler oluşturan 0,8 – 4 µm uzunluğunda 0,5 – 0,8 µm genişliğinde hafif kıvrık basil şekilli hareketli Gram negatif (Şekil 4.18), sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, fermentatif, O/129'a (10 µg ve 150 µg) dirençli izolatın TCBS ve McConkey agarda üreme gösterdiği, TSI agarda üç şekeri de kullanarak asit oluşturduğu, ONPG, üre, VP, sitrat, amilaz, eskülin, arjinin dihidrolaz, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu, inositol, sorbitol, laktoz, ksiloz, ramnoz, melibioz ve amigladin negatif, indol, nitrat, jelatin, glukoz, arabinoz, maltoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, glaktoz, fruktoz testlerine pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Biyokimyasal testlerde göstermiş olduğu özellikler sonucunda *Vibrio* sp. olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.3).

9 numaralı izolat ise 6 numaralı levrek balığının dalağından FMM'de izole edilmiştir. TSA'da 9 numaralı izolatın krem renkli, parlak, konveks, yumuşak, ortası opak kenarları şeffaf koloniler oluşturan, hareketli, Gram negatif, 0,5 – 2 µm uzunluğa ve 0,5 – 1 µm genişliğe sahip, kısa basiller oldukları (Şekil 4.18), sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, fermentatif, O/129'a hassas, TCBS agarda yeşil, McConkey agarda pembe koloniler oluşturan, TSI agarda üç şekeri de kullanarak asit oluşturan, indol, nitrat, jelatin, glukoz, maltoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, fruktoz, glukozdan gaz oluşumu testleri pozitif, ONPG, üre, MR, VP, sitrat, amilaz, eskülin, arjinin dihidrolaz, ornitin ve lizin dekarboksilaz, arabinoz, inositol, sorbitol, galaktoz, laktoz, ksiloz, ramnoz, melibioz ve amigdalinden asit oluşumu testlerinin negatif olduğu tespit edilmiştir. 4°C'de gelişme göstermezken, 37°C–44°C sıcaklık aralığında yapılan ölçümlerde gelişebilmiştir. % 3 – 10 NaCl içeren NB'da üreyebildiği görülmüştür. Biyokimyasal testlerde göstermiş olduğu özellikler sonucunda *V. splendidus* olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.3).

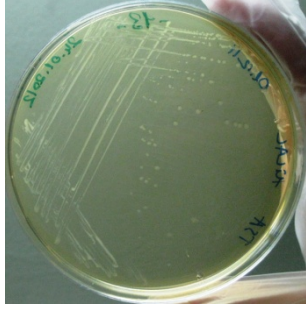
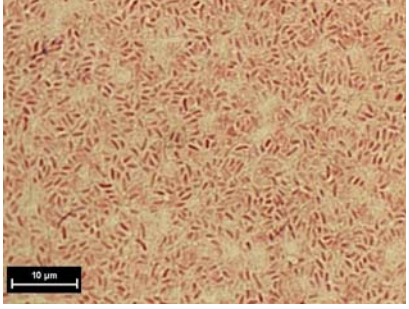
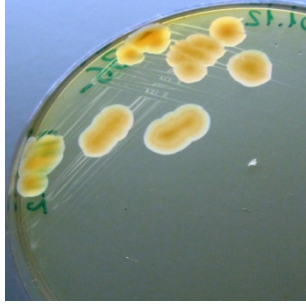
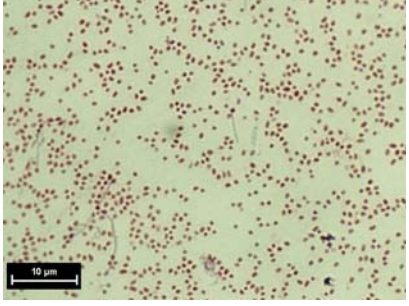
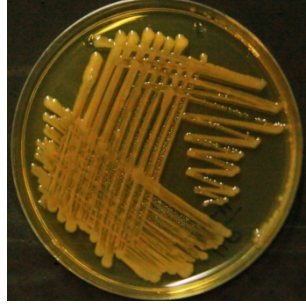
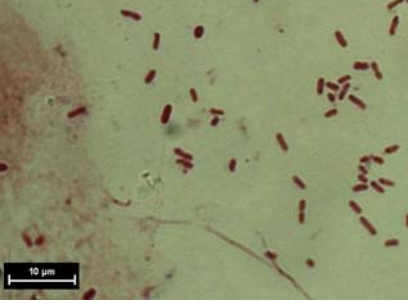
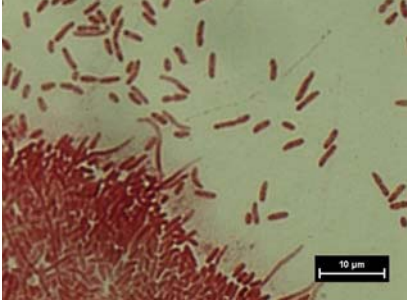
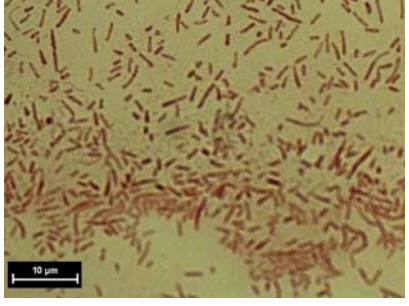
10 numaralı izolat 1 numaralı çipura balığının karaciğerinden TSA ile izole edilmiştir. Bu izolatın krem renkli, şeffaf, parlak, konveks, yumuşak özellikte bir koloni oluşturduğu ve özeye alındığında kahverengi oldukları tespit edilmiştir. Bakterilerin mikroskopik incelenmesinde ise zayıf hareketli, Gram negatif, 1 – 3 µm uzunluğa ve 1 – 2 µm genişliğe sahip basiller şeklinde görüldüğü tespit edilmişlerdir (Şekil 4.18).

Sitokrom oksidaz pozitif, katalaz zayıf pozitif, fermentatif, O/129'a hassas, TCBS agarda sarı koloniler oluşturan izolatın ONPG, eskülin, ornitin dekarboksilaz, arabinoz, inositol, sorbitol, laktoz, ramnoz ve ksilozdan asit oluşumu negatif, indol, üre, MR, VP, sitrat, nitrat, jelatin, amilaz, lizin dekarboksilaz, glukoz, glukozdan gaz oluşumu maltoz, mannitol, sakkaroz, mannoz, galaktoz, fruktozdan, melibioz ve amigdalin testlerine pozitif sonuç vermiştir. McConkey agarda pembe, VAM'da mavi koloniler oluştururken, TSI agarda üç şekeri de kullanarak asit oluşturmuştur. 4°C' de gelişme göstermezken, 37°C - 44°C sıcaklık aralığında yapılan ölçümlerde gelişebilmiştir. % 3 – 5 NaCl içeren NB'de üreyebildiği görülmüştür. Biyokimyasal testlerde göstermiş olduğu özellikler sonucunda *V. harveyi* olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.3).

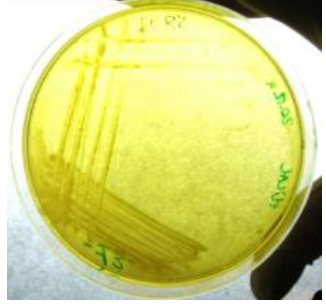
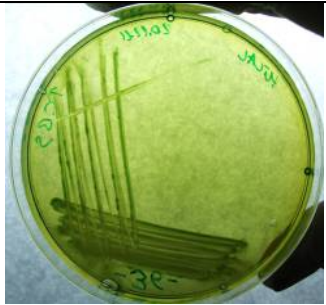
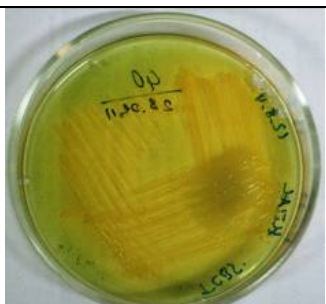
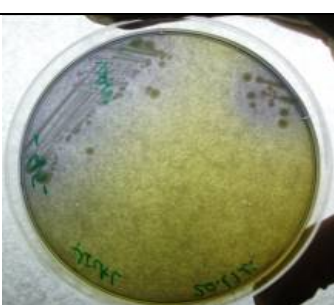
11 numaralı izolat 4 numaralı çipura balığının böbreğinden tuzlu TSA'da izole edilmiştir. Koloniler koyu krem renkli konveks, pürüzlü üst yüzeye sahip, sert (Şekil 4.18) ve sıvı besiyerinde homojen olmayan bir yapı göstermiştir. Mikroskopta hareketli, Gram negatif, 1 – 13 µm uzunluğa ve 1 – 2 µm genişliğe sahip uzun saç gibi birbirine geçmiş gruplar halinde basiller şeklinde tespit edilmişlerdir. Sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, fermentatif, O/129'a dirençli, TCBS agarda yeşil koloniler oluşturan, indol, MR, nitrat, amilaz, lizin dekarboksilaz, glukoz, maltoz, mannitol, fruktozdan, sakkroz, amigladin pozitif, ONPG, üre, VP, jelatin, sitrat, eskülin, arjinin dihidrolaz, ornitin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu, galaktoz, arabinoz, inositol, sorbitol, laktoz, ramnoz, melibioz ve ksilozdan asit oluşumuna da negatif sonuç vermiştir. McConkey agarda pembe koloniler oluştururken, TSI agarda üç şekeri de kullanarak asit oluşturmuştur. 4°C' de gelişme göstermezken, 37°C - 44°C sıcaklık aralığında yapılan ölçümlerde gelişebilmiştir. % 3 – 5 NaCl içeren NB'de üreyebildiği görülmüştür. . Biyokimyasal test sonuçlarına göre *V. harveyi* olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.3).

12 numaralı izolat 1 numaralı çipura balığının karaciğerinden L-cysteine ilaveli MH agarda izole edilmiştir. Tuzlu TSA'da koloniler koyu krem renkli, pürüzlü üst yüzeye sahip (Şekil 4.18), konveks ve sıvı besiyerinde homojen olmayan bir yapı göstermiştir. Hareketli, Gram negatif, 1 – 13 µm uzunluğa ve 1 – 2 µm genişliğe sahip uzun saç gibi birbirine geçmiş gruplar halinde görünen basiller olarak tespit edilmişlerdir. Sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif, fermentatif, 10 µg etken madde içeren O/129'a dirençli, 150

μg etken madde içeren O/129'a hassas, TCBS agarda yeşil koloniler oluşturmuştur. İndol, MR, nitrat ve amilaz pozitif sonuç verirken, ONPG, üre, VP, sitrat, jelatin, eskülin testlerine negatif sonuç vermiştir. McConkey agarda pembe koloniler oluştururken, TSI agarda üç şekeri de kullanarak asit oluşturmuştur. Arjinin dihidrolaz ve ornitin dekarboksilaz testlerine negatif sonuç verirken lizin dekarboksilaz testine pozitif sonuç vermiştir. Şekerlerden glukoz, maltoz, mannitol sakkaroz, mannoz, sorbitol, galaktoz, fruktozdan ve amigladin asit oluşumuna pozitif sonuç verirken, glukozdan gaz oluşturmamış, arabinoz, inositol, laktoz, ksiloz, ramnoz ve melibiozdan asit oluşumuna negatif sonuç vermiştir. Sıcaklık ve tuzluluk hariç diğer test sonuçları 11 numaralı izolat ile aynı olduğu görülmüştür. Buna göre 4°C'de ve 40°C - 44°C aralıklarda gelişemezken 37°C'de gelişme özelliği göstermiştir. % 0 – 5 NaCl içeren NB'de üreyebildiği görülmüştür. . Biyokimyasal testlerde göstermiş olduğu özellikler sonucunda *V. harveyi* olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.3).

İN	Koloni morfolojileri	Gram profilleri
4		
9		
10		
11		
12		

Şekil 4.18: 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı izolatların koloni morfolojileri ve Gram profilleri
(x1000)

Üreme özelliği	VAM' da üreme özellikleri	TCBS agarda üreme özelliği
4		
9		
10		
11		
12		

Şekil 4.19: 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı izolatların VAM' da ve TCBS agarda üreme özelliği

Tablo 4.3: 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı izolatların fenotipik özellikleri

İN		4	9	10	11	12
BN		7. Levrek	6. Levrek	1. Çipura	4. Çipura	1. Çipura
Organ		Dalak	Dalak	Karaciğer	Böbrek	Karaciğer
İzolasyon besiyeri		BHI	FMM	TSA	TSA	MH
Koloni morfolojisi		Krem renkli, parlak, konveks, yumuşak, ortası opak kenarları şeffaf		Krem renkli, şeffaf pürüzlü, konveks, sert		
Gram		-	-	-	-	-
Hücre morfolojisi		Kıvrık basil	Kıvrık basil	Uzun basill	Uzun basil	Uzun basil
Hareket		+	+	+Z	+	+
Sitokrom oksidaz		+	+	+	+	+
Katalaz		+	+	+Z	+	+
O/F		F	F	F	F	F
O/129	10 µg	D	H	H	D	D
	150 µg	D	H	H	D	H
TCBS		Sarı	Yeşil	Sarı	Yeşil	Yeşil
WAM		Mavi	Mavi	Mavi	Sarı	Sarı
ONPG		-	-	-	-	-
İndol		+	+	+	+	+
Üre		-	-	+	-	-
MR		+	-	+	+	+
VP		-	-	+	-	-
Sitrat		-	-	+	-	-
Nütrat		+	+	+	+	+
Jelatin		+	+	+	-	-
TSI		A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
Amilaz		-	-	+	+	+
Eskülin		-	-	-	-	-
McConkey		Sarı	Pembe	Pembe	Pembe	Pembe

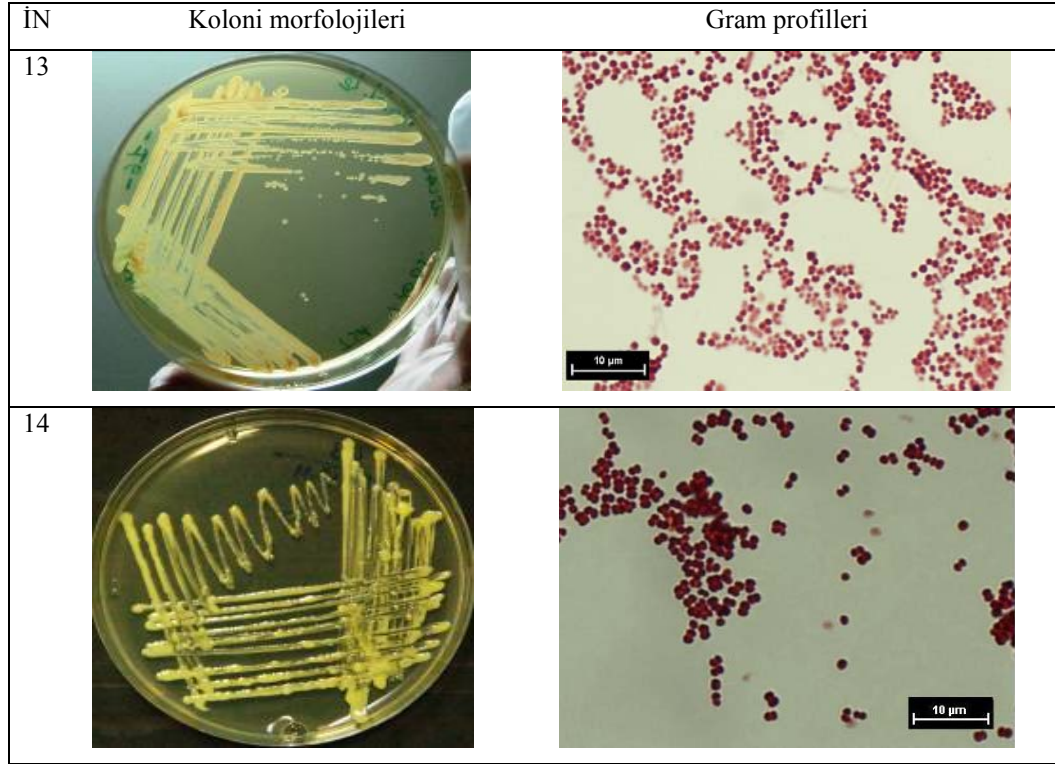
Tablo 4.3'ün devamı

İN	4	9	10	11	12
Arjinin dihidrolaz	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	-	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+
G. gaz oluşumu	-	+	+	-	-
Arabinoz	+	-	-	-	-
Maltoz	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Sakkaroz	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	-	+
İnositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+
Galaktoz	+	-	+	-	+
Laktoz	-	-	-	-	-
Ksiloz	-	-	-	-	-
Fruktoz	+	+	+	+	+
Ramnoz	-	-	-	-	-
Melibioz	-	-	+	-	-
Amigdalın	-	-	+	+	+
4°C' de üreme	-	-	-	-	-
37°C' de üreme	+	+	+	+	+
40°C' de üreme	+	+	+	+	-
44°C' de üreme	-	+	+	+	-
NaCl'de üreme	0%	-	-	-	+
	3%	+	+	+	+
	5%	+	+	+	+
API 20E profili	004612677	004612477	665716677	404412577	404452557
Teşhis	<i>Vibrio</i> sp.	<i>V. splendidus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. harveyi</i>

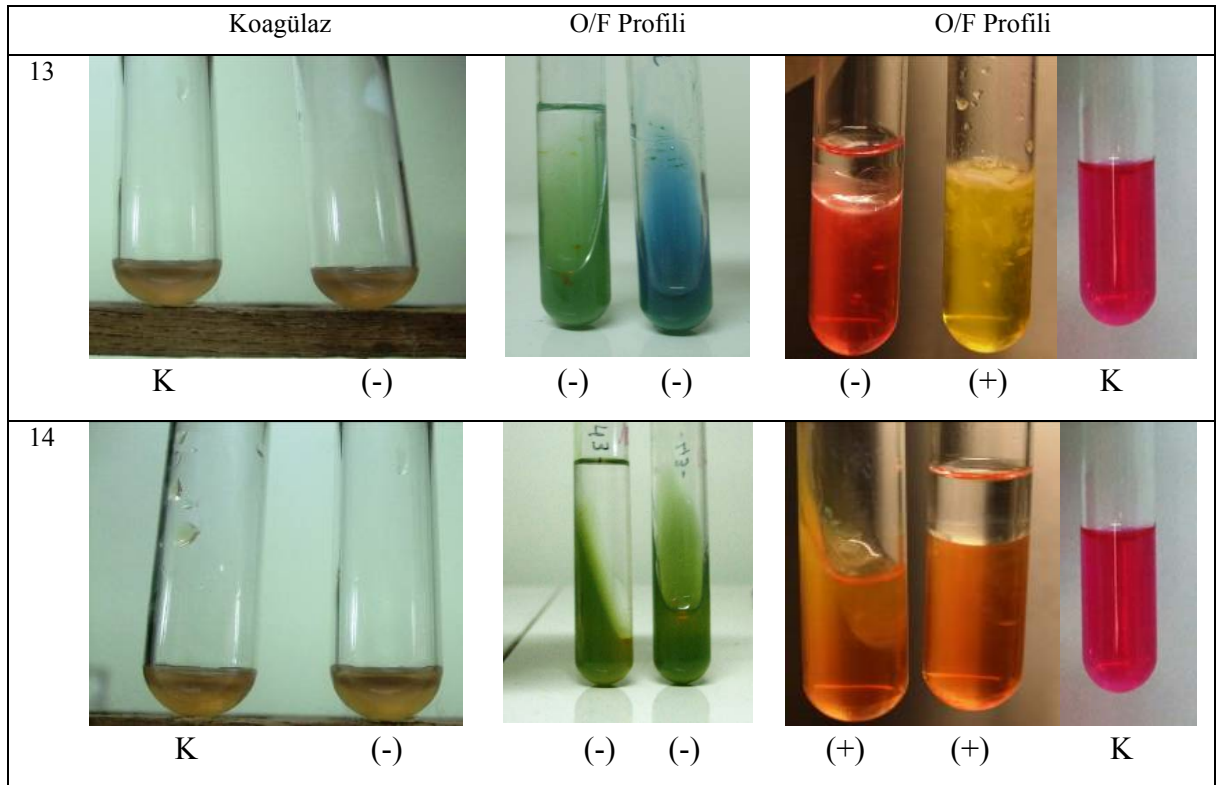
İN= İzolat numarası, BN= Balık numarası, O= Oksidatif, F= Fermentatif, Z=Zayıf, D=Dirençli, H=Hassas, G= Glukoz, A=Asit
(Sarı) K=Alkalın (Pembemsi kırmızı), H₂S=Hidrojen sülfid üretimi

MA besiyerinde izole edilen 13 numaralı izolat, TSA'da krem renkli, konveks, pürüzlü, küçük koloniler oluşturmuştur. Yapılan incelemeler sonucunda hareketsiz, Gram negatif, kokobasil olduğu tespit edilen bakterinin sitokrom oksidaz, katalaz pozitif, koagülaz negatif ve oksidatif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). O/129 (10 µg ve 150 µg)'a dirençli, ONPG negatif, TCBS ve McConkey agarda gelişme göstermedikleri görülmüştür. TSI agarda alkalın reaksiyon ile birlikte H₂S oluşumu gözlenmiştir. Tüpte yapılan indol, üre, VP, jelatin, sitrat, nitrat ve şekerlerden asit oluşumu testlerine negatif, MR, amilaz, eskülin, ornitin ve lizin dekarboksilaz testlerine pozitif sonuç vermiştir. API 20E'ye göre VP ve sitrat pozitif, ornitin ve lizin negatif olarak sonuçlanmıştır. 4°C'de herhangi bir üreme görülmezken, 37°C - 44°C aralıklarında üreme ve gelişme göstermiştir. % 3 – 15 NaCl içeren NB'de üreyebildiği görülmüştür. Biyokimyasal testlerde göstermiş olduğu özellikler sonucunda 13 numaralı izolat *Psychrobacter* sp. olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.4).

14 numaralı izolat TSA besiyerinde parlak sarı, düzgün kenarlı konveks koloniler oluşturmuştur. Hareketsiz, Gram pozitif, tetrad ve diplokok şeklinde olduğu tespit edilen bakterinin sitokrom oksidaz, koagülaz negatif, katalaz kuvvetli pozitif ve fermentatif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). O/129'a hassas olan bu bakteriler TCBS'de zayıf bir şekilde gelişerek yeşil koloniler oluşturmuş ve ONPG negatif reaksiyon vermiştir. İndol, VP, jelatin, amilaz ve eskülin testlerine negatif, üre MR, sitrat ve nitrat testlerine pozitif sonuç vermiştir. McConkey agarda gelişme göstermemiştir. TSI agarda asit oluşturmadıkları görülmüştür. Arjinin dihidrolaz, ornitin ve lizin dekarboksilaz testlerine negatif sonuç vermiştir. Şekerlerden glukoz, maltoz, sakkaroz ve fruktozdan asit oluşumuna pozitif sonuç verirken, glukozdan gaz oluşturmamış, arabinoz, mannitol, mannoz, galaktoz, inositol, sorbitol, laktoz ve ksilozdan asit oluşumuna da negatif sonuç vermiştir. 4°C'de herhangi bir üreme görülmezken, 37°C - 44°C aralıklarında üreme ve gelişme göstermiştir. % 0 – 15 NaCl içeren NB'de üreyebildiği görülmüştür. Novabiyosin, neomisin, basitrasin, polimiksin B' ye hassas oldukları görülmüştür. Biyokimyasal testlerde göstermiş olduğu özellikler sonucunda *Kocuria* sp. olarak teşhis edilmiştir (Tablo.4.4).



Şekil 4.20: 13 ve 14 numaralı izolatların koloni morfolojileri ve Gram profilleri (x1000)



K: Kontrol, (-): Negatif, (+): Pozitif

Şekil 4.21: 13 ve 14 numaralı izolatların koagülasyon ve O/F profili

Tablo 4.4: 13 ve 14 numaralı izolatların fenotipik özellikleri

İN		13	14
BN		3. Levrek	2. Çipura
Organ		Dalak	Dalak
İzolasyon besiyeri		MA	TSA
Koloni morfolojisi		Krem renkli, düzgün, konveks, pürüzlü, opak	Sarı, düzgün, konveks, parlak
Gram		-	+
Hücre morfolojisi		Kokobasil	Tetrat ve diplokok
Hareket		-	-
Sitokrom oksidaz		+	+
Katalaz		+	+
Koagülaz		-	-
O/F		O	F
O/129	10 µg	D	H
	150 µg	D	H
TCBS		-	Yeşil
WAM		-	-
ONPG		-	-
İndol		-	-
Üre		-	+
MR		+	+
VP		+	-
Sitrat		+	+
Nitrat		-	+
Jelatin		-	-
TSI		K/ K	K/K
Amilaz		+	-
Eskülin		+	-
McConkey		-	-

Tablo 4.4'ün devamı

SN		13	14
Arjinin dihidrolaz		-	-
Ornitin dekarboksilaz		+	-
Lizin dekarboksilaz		+	-
Glukoz		+	+
G. gaz oluşumu		-	-
Arabinoz		-	-
Maltoz		-	+
Mannitol		-	-
Sakkaroz		-	+
Mannoz		-	-
İnositol		-	-
Sorbitol		-	-
Galaktoz		-	-
Laktoz		-	-
Ksiloz		-	-
Fruktoz		-	+
4°C' de üreme		-	-
37°C' de üreme		+	+
40°C' de üreme		+	+
44°C' de üreme		+	+
NaCl' de üreme	0%	-	+
	3%	+	+
	5%	+	+
	8%	+	+
	10%	+	+
	15%	+	+
API 20E profili		022100422	-
APIStaph profili		-	6356012
Teşhis		<i>Psychrobacter</i> sp.	<i>Kocuria</i> sp.

İN= İzolat numarası, BN= Balık numarası, O= Oksidatif, F= Fermentatif, Z=Zayıf, D=Dirençli, H=Hassas, G= Glukoz, A=Asit (Sarı) K=Alkalın (Pembemsi kırmızı), H₂S=Hidrojen sülfid üretimi

4.3.API HIZLI TANI KİTİ BULGULARI

Çalışma sonucunda izole edilen 14 bakteri izolatu standart bakteriyolojik yöntemlere paralel olarak API hızlı tanı kitleri ile de teşhis edilmiştir. Yöntem üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda uygun API çeşiti kullanılarak uygulanmıştır. Gram negatif, sitokrom oksidaz pozitif, fermentatif basiller (14 numaralı izolat hariç 1–13 arası izolatlara) için API 20E uygulanmıştır. Gram pozitif kok olduğu tespit edilen 14 numaralı izolata API Staph uygulanmıştır.

24 saatlik taze kültürlerden hazırlanan inokulumlar kullanılarak gerçekleştirilen API testleri 24 saat sonunda ayraçları damlatılmadan kontrol edilmiştir. En az 3 testin pozitif olmadığı durumlarda süre 48 saat uzatılmıştır ve ayraçlar damlatılarak sonuçlar kayıt edilmiştir. Tüm bakterilerin API profilleri Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de verilmiştir. 6 numaralı ve 11 numaralı izolatlara ait API 20E profilleri Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de gösterilmiştir.



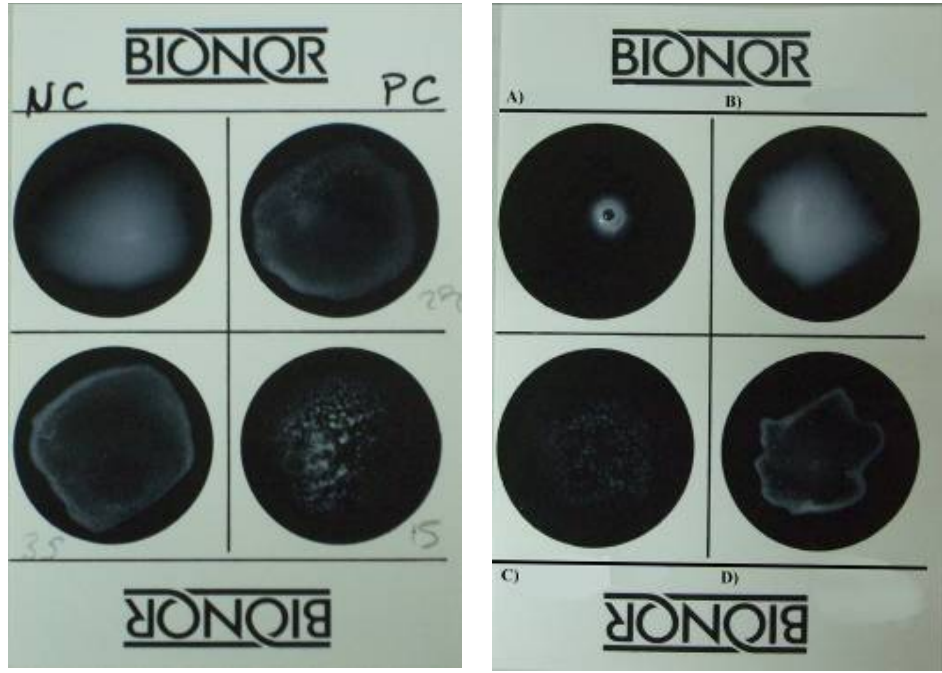
Şekil 4.22: 6 numaralı izolata ait API 20E profili



Şekil 4.23: 11 numaralı izolata ait API 20E profili

4.4.AGLÜTİNASYON TESTİ BULGULARI

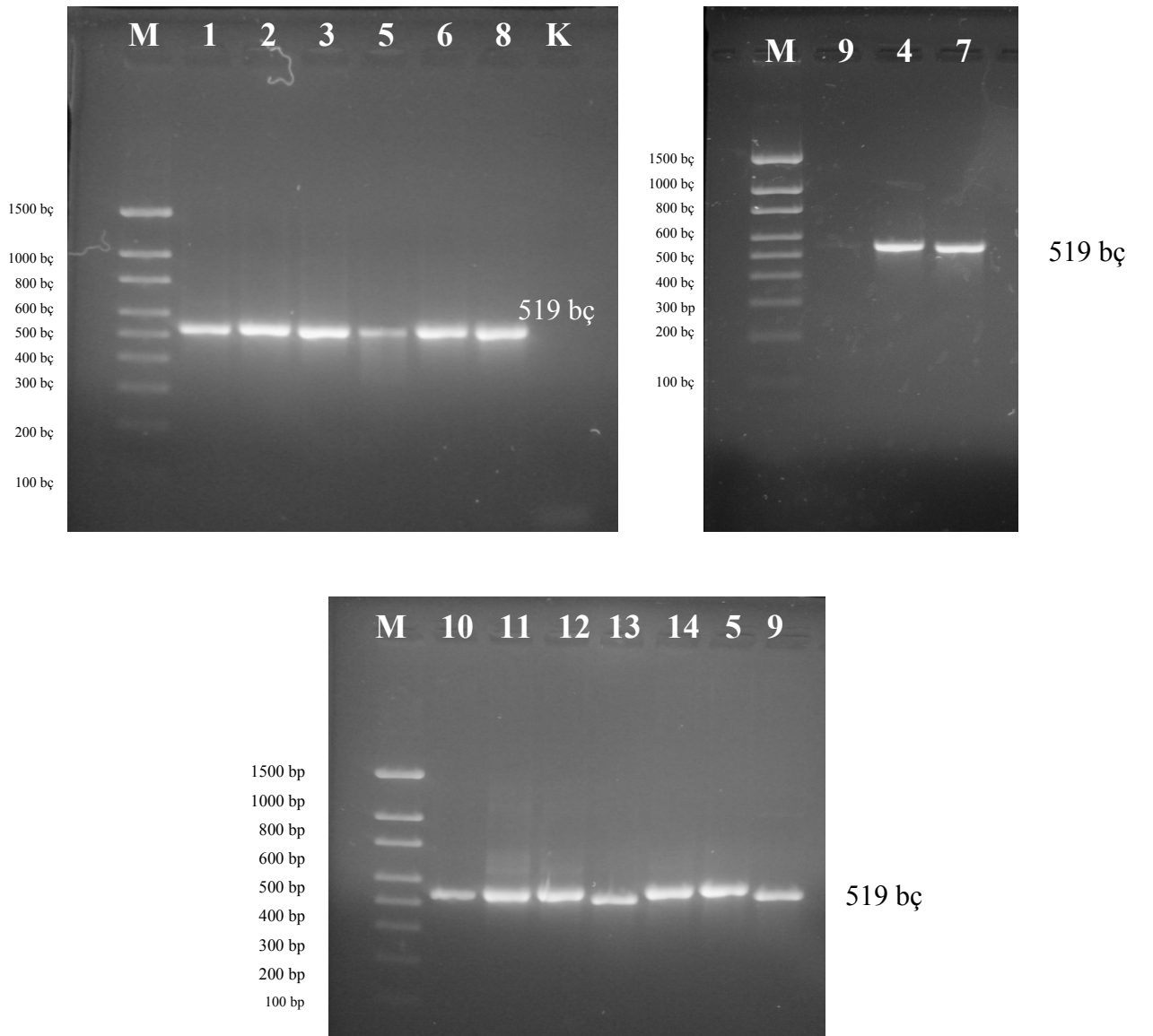
Bakteriyolojik yöntemler ve hızlı tanı kiti sonuçlarına göre *V. anguillarum* olarak teşhis edilen tüm izolatlara BIONOR Mono-Va kiti ile aglütinasyon testi yapılmıştır. Kontrol serumunda değişim oluşturmamış, test serumunda ise antikor – atijen birleşmesinin sonucu olarak çökelme reaksiyonu meydana gelmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: BIONOR Mono-Va kiti ile aglütinasyon kitinde çökelme oluşumu

4.5. MOLEKÜLER BULGULAR

Biyokimyasal olarak tanısı yapılan tüm izolatlar ve DNA izolasyonu yapılarak PCR ve DNA dizileme yönetimi ile de tanımlanmaya çalışılmıştır. A18 ve S20 primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri “100 bç–1 kb DNA Ladder” marker ile agaroz jelde 90 V, 40 dakika boyunca yürütülmüştür. Jelin UV ışığında incelenmesi sonucunda izole edilen 14 izolatın da 519 bazlık gen parçası çoğaltımı yaptığı görülmüştür. (Şekil 4.25).



M: Marker, K: Negatif kontrol

Şekil 4.25: A18 ve S20 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görüntüsü

Ham dizi verileri Bioedit Sequence Alignment Editor programı ile tek bir dizi haline getirilmiştir. Gen bankası nükleotid blast işlemi ile en yakın türler ve benzerlik oranları her izolat için tespit edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: İzolatların Gen Bankası nükleotid blast işlemi ile tespit edilen en yakın türler ve benzerlik oranları

İzolat no	Yakın gen akrabası	Dizi benzerliği
1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	%100
2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	%99
3	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	%100
4	<i>Vibrio</i> sp.	%100
5	<i>V. anguillarum</i>	%99
6	<i>V. anguillarum</i>	%100
7	<i>V. anguillarum</i>	%100
8	<i>V. anguillarum</i>	%100
9	<i>V. splendidus</i>	%100
10	<i>V. harveyi</i>	%100
11	<i>V. harveyi</i>	%99
12	<i>V. harveyi</i>	%99
13	<i>Psychrobacter</i> sp.	%100
14	<i>Kocuria</i> sp.	%100

4.6. ANTİBAKTERİYEL MADDELERE DUYARLILIK TESTİ BULGULARI

4.6.1. Disk Difüzyon Test Bulguları

Disk difüzyon yöntemi uygulanan 14 adet suşun sulfametazin, eritromisin, kanamisin, streptomisin, oksitetrasiklin, flumekuın, sefoperazon, ampisilin, penisilin; G benzatin, rifampisin, oksolinik asit etken maddelere sahip ticari hazır disklerle verdikleri sonuçlar Tablo 4.6’da verilmiştir. Referans suş olarak kullanılan *E.coli* ATCC 25922 disk difüzyon çapları aynı tabloda bulunmaktadır. 14 numaralı suşun tabloda yer almayan diğer disklerden novabiyosin, neomisin, basitrasin, polymiksin B’ ye hassas oldukları görülmüştür.

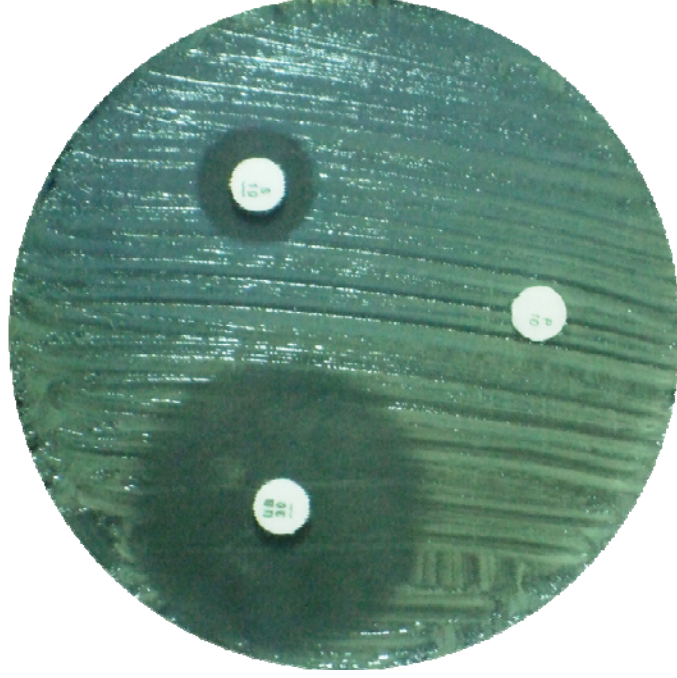
Tablo 4.6: 1-14 numaralı suşların disk difüzyon çapları (mm)

SN	SXT(25)	E (15)	K (30)	S (10)	OT (30)	UB (30)	CFP(75)	AM(10)	P(10)	RA(25)	OA(2)
1	(H)	(OD)	(H)	(D)	(H)	(H)	(D)	(H)	(D)	(H)	(H)
2	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(D)	(H)	(H)
3	(H)	(H)	(OD)	(D)	(H)	(H)	(D)	(H)	(D)	(H)	(H)
4	(H)	(OD)	(OD)	(D)	(H)	(H)	*(OD)	(D)	(D)	(H)	(H)
5	(H)	(OD)	(H)	(D)	(H)	(H)	(D)	(D)	(D)	(H)	(H)
6	(H)	(OD)	(OD)	(D)	(H)	(H)	(D)	(D)	(D)	(H)	(H)
7	(H)	(OD)	(H)	(D)	(H)	(H)	(OD)	(D)	(D)	(H)	(H)
8	(H)	(OD)	(OD)	(D)	(H)	(H)	(D)	(D)	(D)	(H)	(H)
9	(H)	(OD)	(H)	(D)	(H)	(H)	* (D)	(D)	(D)	(H)	(H)
10	(H)	(OD)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(D)	(D)	(H)	(H)
11	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(D)	(D)	(D)	(H)	(H)
12	(H)	(OD)	(H)	(OD)	(H)	(H)	(D)	(D)	(D)	(H)	(OD)
13	(H)	(OD)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(D)	(H)	(H)
14	(H)	(OD)	(OD)	(D)	(OD)	(H)	(H)	(H)	(OD)	(H)	(D)
Ref	(H)	(OD)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(H)	(D)	(H)	(H)

SXT (25): Sulfametazin disk 25 µg, E (15): Eritromisin disk 15 µg, K (30): Kanamisin disk 30 µg, S (10): Streptomisin disk 10 µg, OT (30): Oksitetrasiklin disk 30µg, UB (30): Flumekuın disk 30 µg, CFP (75): Sefoperazon disk 75 µg, AM (10): Ampisilin disk 10µg, P (10): Penisilin; G benzatin disk 10 µg, RA (25): Rifampisin disk 25 µg, OA (2): Oksolinik asit disk 2 µg, Ref: Referans suş *E.coli* ATCC 25922, *: belirsiz zon, H: Hassas, OD: Orta Dirençli, D: Dirençli.

Cetvel yardımıyla ölçülerek not edilen zon çapları net bir biçimde görüntülenmiştir. Disklerde bulunan etken maddeye karşı direnç, orta direnç ve hassaslık gösteren suşlar CLSI M100 S22 standardına göre değerlendirilmiştir. Dirençli suşların disk sınırına kadar gelişme gösterdikleri görülmüştür. Hassas ve orta dirençli suşlar ise disk çevresinde belirli bir zon oluşturmuştur. 4 ve 9 numaralı suşların sefoperazon diskine

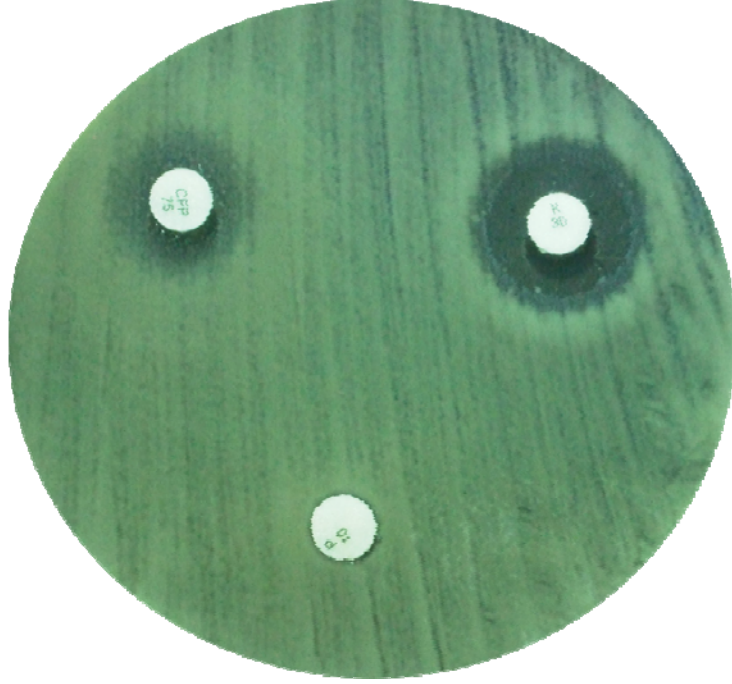
karşı önce belirli bir zon oluşturmuş daha sonra ise disk sınırına kadar gelişme gösterdikleri görülmüştür (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28).



Şekil 4.26: Disk difüzyonda farklı zon çaplarının görünüşü (10 numaralı suş)



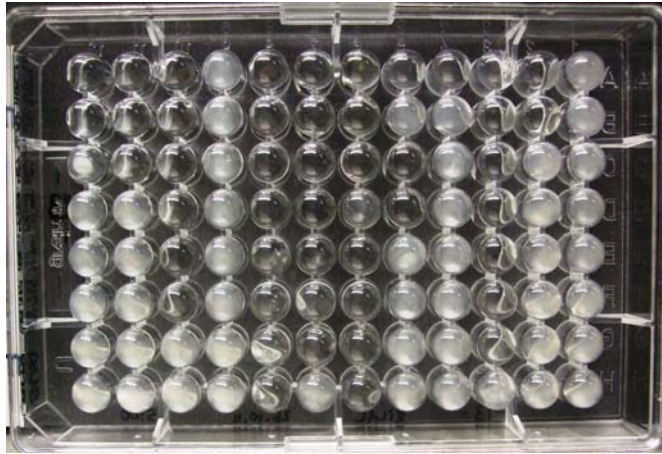
Şekil 4.27: Disk difüzyonda dirençli, hassas ve belirsiz zon görünüşü (9 numaralı suş)



Şekil 4.28: Disk difüzyonda dirençli, hassas ve belirsiz zon görünüşü (4 numaralı suş)

4.6.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi Bulguları

14 adet suşun ampisilin, siprofloksasin, nalidiksik asit, gentamisin, streptomisin, tetrasiklin, florfenikol, kolistin, sulfametoksazol, trimetoprim, kloramfenikol, kanamisin, sefotaksim, seftazidim, etken maddeleri içeren VetMIC GN-mo (Version 4) No:395103 ile gerçekleştirilen MİK testi bulguları Tablo 4.7’de verilmiştir. Referans suş olarak kullanılan *E.coli* ATCC 25922 MİK değerleri aynı tabloda gösterilmiştir.



Şekil 4.29: 96 kuyucuklu Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) test plağında 4 numaralı suşun MİK profili görüntüsü

Şekil 4.29’da gösterilen VetMIC test plağında duyarlılık sonuçlarının okunması görsel olarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre bakteri gelişiminin olmadığı en son kuyucuktaki dilüsyon miktarı MİK değeri olarak not edilmiştir. Bir antibakteriyel maddenin bütün dilüsyonlarında gelişme gösteren suşlar dirençli, hiç bir dilüsyonda gelişme göstermeyen suşlar ise hassas olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.7: 1-14 numaralı suşların MİK testi bulguları

SN	Am	Ci	Nal	Gm	Sm	Tc	Ff	Cs	Su	Tm	Cm	Km	Ctx	Caz
1	≥ 32	≥ 0.12	(H)	≥ 4	≥ 32	(H)	(H)	(H)	(D)	≥ 2	(H)	(D)	≥ 0.5	≥ 2
2	≥ 32	≥ 0.12	(H)	≥ 4	≥ 32	(H)	(H)	(H)	(D)	≥ 2	(H)	(D)	≥ 0.5	≥ 2
3	≥ 32	≥ 0.12	(H)	≥ 4	≥ 32	(H)	(H)	(H)	(D)	≥ 2	(H)	(D)	≥ 0.5	≥ 2
4	(D)	≥ 0.5	≥ 2	≥ 8	≥ 32	(H)	(H)	≥ 1	(H)	(D)	(H)	(D)	≥ 0.5	≥ 8
5	≥ 64	≥ 0.06	(H)	≥ 16	≥ 64	(H)	(H)	(D)	(D)	≥ 0.5	(H)	(D)	(D)	(D)
6	(D)	≥ 0.03	(H)	≥ 16	≥ 4	(H)	(H)	(D)	(D)	≥ 0.5	(H)	(D)	(D)	(D)
7	≥ 64	≥ 0.06	(H)	≥ 16	≥ 64	(H)	(H)	(D)	(D)	≥ 0.5	(H)	(D)	(D)	(D)
8	≥ 64	≥ 0.03	(H)	≥ 8	≥ 64	(H)	(H)	(D)	(H)	≥ 0.25	(H)	(D)	(D)	(D)
9	(D)	≥ 0.25	≥ 2	≥ 16	≥ 64	(H)	(H)	(H)	(H)	≥ 1	(H)	(D)	≥ 0.03	≥ 4
10	(D)	≥ 1	≥ 4	≥ 8	≥ 32	(H)	(H)	(D)	≥ 32	≥ 2	(H)	(D)	(D)	≥ 2
11	(D)	≥ 1	≥ 4	≥ 8	≥ 32	(H)	(H)	(D)	(D)	≥ 1	(H)	≥ 16	≥ 0.25	≥ 2
12	(D)	≥ 1	≥ 8	≥ 8	≥ 64	(H)	(H)	(D)	(D)	≥ 2	≥ 8	(D)	≥ 0.5	≥ 2
13	(H)	≥ 0.03	(H)	≥ 1	≥ 8	(H)	(H)	≥ 1	(D)	(D)	(H)	(H)	≥ 2	≥ 16
14	(H)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)	(D)
Ref	≥ 8	≥ 0,016	≥ 8	≥ 0.5	≥ 4	≥ 2	(H)	(H)	≥ 1024	≥ 4	≥ 4	(D)	≥ 0.12	≥ 0.5

Am: Ampisilin, Ci: Siprofloksasin, Nal: Nalidiksik Asit Gm: Gentamisin Sm: Streptomisin, Tc: Tetrasiklin, Ff: Florfenikol, Cs: Kolistin, Su: Sulfametoksazol, Tm: Trimetoprim, Cm: Kloramfenikol, Km: Kanamisin, Ctx: Sefotaksim, Caz: Seftazidim, Ref: Referans suş *E.coli* ATCC 25922, (H): Bütün Dilüsyonlara Hassas, (D): Bütün Dilüsyonlara Dirençli.

1, 2 ve 3 numaralı suşların sulfametoksazol, ampisilin ve kanamisin dışında diğer antimikrobiyal maddelere duyarlı oldukları tespit edilmiştir. *V. anguillarum* olarak teşhis edilen dört suşun (5, 6, 7, 8 numaralı suşlar) benzer bulgular gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak 6 numaralı suşun ampisilinin tüm dilüsyonlarına dirençli olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm *V. anguillarum* suşlarının ampisilin, kolistin, kanamisin, sefotaksim, seftazidime dirençli oldukları tespit edilmiştir. 8 numaralı suşun sulfametoksazole hassas olduğu ve diğer *V. anguillarum* suşlarının dirençli olduğu görülmüştür. İzole edilen 9 numaralı *V. splendidus* suşunun ampisilin ve kanamisine dirençli olduğu, 4 numaralı *Vibrio* sp. suşunun ampisilin, trimetoprim ve kanamisine dirençli olduğu görülmüştür. 10, 11 ve 12 numaralı *V. harveyi* suşları kullanılan antimikrobiyal maddelere farklı hassasiyet göstermişlerdir. Üç suşun da ampisilin ve

kolistine dirençli, 11 ve 12 numaralı suşların sulfametoksazole dirençli, 10 ve 12 numaralı suşların kanamisine dirençli, 10 numaralı suşun da sefotaksime dirençli olduğu tespit edilmiştir. 13 numaralı suşun yalnızca sulfametoksazol ve trimetoprima dirençli olduğu görülmüştür. 14 numaralı suşun ampisilin hariç diğer antibiyotiklere direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

MİK değerleri tespit edilen tüm suşların CLSI (2012) standart tablosuna göre duyarlılık değerlendirilmesi yapılmıştır. MİK değeri “32” ve üzeri olarak tespit edilen suşların (1, 2, 3, 5, 7 ve 8) ampisiline dirençli oldukları görülmüştür. 14 numaralı suş hariç tüm suşlar MİK değerleri “1” ve altında olması nedeniyle siprofloksasine hassas olarak değerlendirilmiştir. 10, 11 ve 12 numaralı suşlar ise “1” ve üzeri olarak bildirilen direnç değerine sahip olmaları nedeniyle siprofloksasine dirençli oldukları görülmüştür. 14 numaralı suş hariç tüm suşların MİK değerleri “16” ve altında olması nedeniyle nalidiksik asite hassas oldukları tespit edilmiştir. Gentamisin için verilen hassaslık sınır değeri olan “4” ve altındaki değerlere sahip 1, 2, 3 ve 13 numaralı suşların hassas oldukları görülmüştür. MİK değerleri “2” ve altında olan 4 ve 13 numaralı suşların kolistine hassas oldukları tespit edilmiştir. Sulfametoksazol için MİK değeri “38” ve altında olan 10 numaralı suşun hassas olduğu görülmüştür. 4, 13 ve 14 numaralı suşlar hariç tüm suşlar MİK değerleri “8” ve altında olması nedeniyle hassas olarak değerlendirilmiştir. Kloramfenikol için verilen MİK değeri “8” ve altında olan 12 numaralı suş diğer tüm suşlar gibi hassas olarak değerlendirilmiştir. Mik değeri “16” ve altı olması nedeniyle 11 numaralı suş kanamisine dirençli olarak görülmüştür. MİK değeri “2” ve altı olan 1, 2, 3, 4, 9, 10, 11 ve 12 numaralı suşlar seftazidime hassas olarak değerlendirilmişlerdir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Güllük (İşletme A) ve İzmir (İşletme B) körfezinde deniz balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerden gelen hastalık ihbarları değerlendirilerek yapılan örneklemeler sonucunda dört farklı genusa ait (*Vibrio* genusuna ait dokuz, *Pseudoalteromonas* genusuna ait üç, *Psychrobacter* genusuna ait bir, *Kocuria* genusuna ait bir adet) toplam 14 bakteri türü izole edilerek teşhis edilmiştir.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 13 numaralı suşlar A işletmesinden örneklenen levrek balıklarından izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler sırasıyla *Pseudoalteromonas* sp. (1, 2, 3 numaralı suşlar), *Vibrio* sp. (4 numaralı suş), *V. anguillarum* (5, 6, 7, 8 numaralı suşlar), *V. splendidus* (9 numaralı suş) ve *Psychrobacter* sp. (13 numaralı suş) olarak teşhis edilmiştir.

A işletmesinden alınan levrek balıklarında vücutta ventral yüzgeç ve solungaçların solgun ve hemorajik, karın boşluğunun aşırı yağlı, karaciğerin solgun, dalağın normalden biraz daha büyük, baş üzerinde cranium'u ortaya çıkaran ülseratif lezyonun varlığı, gözde opaklaşma, solungaçlarda erime ve birbirine yapışma, bağırsak içi beyaz – opak, şeritler halinde mukoid madde varlığı ve bağırsağın sarı şeffaf bir sıvı ile dolu olduğu gözlemlenen klinik ve otopsi bulgular arasındadır. Bu klinik tablo pek çok araştırmacı tarafından bildirilen vibriosis bulgularıyla benzerlik göstermektedir (Inglis, 1993; Çağırgan ve Yürekli, 1996; Akan ve diğ., 1996; Actis ve diğ., 2011, Timur ve Timur, 2003, Buller, 2004; Korun, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008)

A işletmesinden izole edilen 5, 6, 7, 8 numaralı suşlar, O/129'a hassasiyet, TCBS'de sarı koloni oluşumu, oksidaz, katalaz, ONPG, mikroskop altında kıvrık şekilli bakterilerin görülmesi gibi fenotipik özelliklerine göre *V. anguillarum* olarak teşhis edilmiştir (Holt ve diğ., 1994; Cerda-Cuellar ve diğ., 1997; Whitman, 2004; Buller, 2004; Lunder ve diğ., 2000; Austin ve Austin, 2007).

Teşhis edilen dört adet *V. anguillarum* suşu bazı biyokimyasal özellikleri bakımından (MR, VP, sitrat, amilaz, gaz oluşumu, arabinoz, inositol) birbirlerinden farklılıklar göstermiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular diğer araştırmacıların bulguları ile uyum göstermektedir. (Myhr ve diğ., 1991; Holt ve diğ., 1994; Cerda-Cuellar ve diğ., 1997; Whitman, 2004; Buller, 2004; Lunder ve diğ., 2000; Austin ve Austin, 2007). *V. anguillarum*'un bazı suşlarının API 20E ve konvansiyonel sitrat testinde negatif sonuç verdiği, tüpte yapılan MR testinde zayıf gelişme gösterdiği hatta 48 saat inkübasyon sonunda negatif sonuçlandığı bildirilmiştir. TCBS'de gelişme eğiliminin zayıf olduğu ve BA besiyerlerinde gelişmesinin iyi olduğu denizden izole edilen suşların optimal % 2–3 NaCl'de ve tuzlu jelatinde geliştikleri rapor edilmiştir. NCIMB 2129 numaralı suşun sorbitolü fermente etmediği ancak çoğu *V. anguillarum* suşunun sorbitol fermentasyonunun pozitif olduğu rapor edilmiştir (Myhr ve diğ., 1991; Holt ve diğ., 1994; Cerda-Cuellar ve diğ., 1997; Whitman, 2004; Buller, 2004; Lunder ve diğ., 2000; Austin ve Austin, 2007).

Bazı araştırmacılar tarafından bildirildiği gibi dört adet *V. anguillarum* suşunun tanısı API 20E hızlı tanı kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Buller, 2004). Tüm suşlar API 20E testlerinde farklı profil göstermiştir. Bu farklı profiller Buller (2004) tarafından bildirilen değişken *V. anguillarum* API profilleri içerisinde yer almaktadır. Ayrıca BIONOR Mono-Va ve 16S rDNA dizi analizleri sonucunda bu dört suşun *V. anguillarum* olduğu doğrulanmıştır.

Gauthier ve arkadaşları (1995) tarafından bildirildiği gibi Gram negatif, zorunlu aerobik ya da nonsakkarolitik, kıvrık çomak şekilli, hareketli, pigment oluşturan, oksidaz pozitif, katalaz aktivitesi ve arjinin dihidrolaz özelliklerine göre değişken özellik gösteren üç adet suş A işletmesinden izole edilerek *Pseudoalteromonas* sp. olarak teşhis edilmiştir (Gauthier ve diğ., 1995; Bowman, 2007). İzole edilen suşlar pigment, gaz oluşumu, nişasta, sitrat kullanımı, 4 ve 35°C'de gelişme, arjinin dihidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz, glukoz, mannoz, fruktoz, sukroz, maltoz, laktoz, ramnoz testleri değişken özellik göstermiştir. Bu bulgular Ivanova ve arkadaşları (1998) tarafından rapor edilen bulgular ile benzerdir. Bu suşların 16S rDNA dizi analizleri yapılarak *Pseudoalteromonas* sp. olduğu doğrulanmıştır.

Hareketli, fermentatif, Gram negatif, çomak şekilli, TCBS’de yeşil, tuzlu TSA’da beyaz, gri, opak koloniler oluşturan katalaz ve oksidaz pozitif özellik gösteren 9 numaralı izolat yapılan incelemeler sonucunda Holt ve diğ., (1994), Buller, (2004), Austin ve Austin, (2007) tarafından bildirildiği şekilde ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *V. splendidus* olarak teşhis edilmiştir.

Gram negatif, basil şekilli, fermentatif, hareketli, O/129’a dirençli 4 numaralı suş API 20E profiline göre hareketli *Aeromonas* olarak teşhis edilmiştir. Ancak yapılan 16S rDNA dizi analizi sonucunda bu suşun *Vibrio* sp. olduğu tespit edilmiştir. Bergey’s Manual of Determination Bacteriology (Boone ve diğ., 2005) kitabında ve Buller (2004) tarafından O/129’a direnç gösterdiği bildirilen diğer *Vibrio* türlerinden (*V. cholerae*, , *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissi*, *V. campbellii*, *V. pomeroyi*, *V. natriegens*, *V. cincinnatiensis*, *V. aerogenes*, *V. diazotrophicus*, *V. lentus*, *V. mytili*, *V. neresis*, *V. hollisae*, *V. harveyi*) biyokimyasal testlerle ayrımı yapılamamış ve *Vibrio* sp. olarak teşhis edilmiştir.

A işletmesinden izole edilen 13 numaralı suş Gram negatif, kokobasil, hareketsiz, oksidatif, sitokrom oksidaz, katalaz pozitif özellik göstermesi ve 16S rDNA dizi analizi sonuçlarına göre *Psycrobacter* sp. olarak teşhis edilmiştir. Bu bulgular Holt ve diğ. (1994), Bowman ve diğ. (1996), Ayala-del-Río ve diğ. (2010), Bozal ve diğ. (2003) tarafından bildirilen bulgular ile benzerlik göstermektedir.

A işletmesinde *V. anguillarum* enfeksiyonu, *Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio* sp., *V. splendidus*, *Psycrobacter* sp. gibi diğer bakterilerle birlikte karma enfeksiyon oluşturarak balık ölümlerine neden olduğu anlaşılmıştır. Benzer şekilde Nelson ve Ghiorse (1999) tarafından balıklardan *Pseudoalteromonas piscicida* ile birlikte *V. parahaemolyticus* ve *V. anguillarum* izole edildiği ayrıca *A. clarkii* ve *A. curacao* yumurtalarının mortalite artışının *Pseudoalteromonas piscicida* ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Örnekleme yapılan B işletmesinde üç adet *V. harveyi* ve bir adet *Kocuria* sp. suşu izole edilerek teşhis edilmiştir. Örneklenen çipura balıklarında karında şişlik, visceral

organların arasında aşırı yağlanma, solgun ve hemorajik karaciğer, böbreklerde erime, abdominal boşlukta ve bağırsakta kanlı sıvı birikimi, solungaçların solgun, safra kesesi zarının incelmış, safra ile dolu ve dalağın normalden küçük olduğu Kraxberger-Beatty ve McGarey (1990), Alvarez ve diğ. (1998), Company ve diğ. (1999), Le Breton (1999), Soffiento ve diğ. (1999), Tendencia (2002) Liu diğ. (2004), Lopez ve diğ. (2009) tarafından gözlemlenen klinik ve patolojik bulgularla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

İzole edilen üç *V. harveyi* suşu, düzgün çomak şeklinde, sitokrom oksidaz, katalaz, indol, MR, nitrat, amilaz, lizin dekarboksilaz, maltoz, sakkaroz, amigladin testlerine pozitif; ONPG, ornitin dekarboksilaz, eskülin, inositol, ramnoz, laktoz, ksiloz, arabinoz testlerine negatif; üre, VP, sitrat, jelatin, mannoz, sorbitol, galaktoz, arjinin dihidrolaz, glukozdan gaz oluşumu, melibioz testlerine değişken sonuç vermiştir. Bu sonuçlar Biosca ve diğ., (1991), Holt ve diğ., (1994) Buller, (2004) Lopez ve diğ., (2009) tarafından bildirilen bulgularla benzerlik göstermektedir. İzole edilen 10 numaralı suşun TCBS agarda sarı ve VAM besiyerinde mavi koloniler oluşturduğu, 11 ve 12 numaralı suşların ise TCBS agarda yeşil, VAM besiyerinde sarı koloniler oluşturduğu görülmüştür. *V. harveyi* suşlarının TCBS agar besiyerinde sarı veya yeşil gelişebildiği, VAM seçici besiyerinde sarı veya mavi gelişme gösterdiği Holt ve diğ., (1994) ve Buller (2004) tarafından rapor edilmiştir.

İzole edilen üç *V. harveyi* suşunun O/129'a hassasiyetleri değişkenlik göstermiştir. Bu bulgular diğer araştırmacılar tarafından bildirilen bulgularla benzerlik göstermektedir (Baumann ve Schubert, 1984; Kraxberger-Beatty ve McGarey, 1990; Alsina ve Blanch, 1994; Karunasagar ve diğ., 1994; Balebona diğ., 1998; Liu diğ., 2004; Tendencia, 2002; Gomez-Gil ve diğ., 2004; López ve diğ., 2009; Haldar ve diğ., 2010; Zhou diğ., 2012). Zhou ve arkadaşları (2012), Kraxberger-Beatty ve McGarey (1990), Liu ve arkadaşları (2004), Tendencia (2002) tarafından *V. harveyi* suşlarının O/129'a hassas olduğu rapor edilmiştir. Ancak 10 µg etken madde içeren O/129'a dirençli suşların da olabileceği Baumann ve Schubert (1984), Balebona ve arkadaşları (1998), Gomez-Gil ve diğ. (2004) ve Haldar ve diğ. (2010) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca 10 ve 150 µg etken madde içeren O/129'a dirençli *V. harveyi* suşları Karunasagar ve diğ. (1994), Alsina ve Blanch (1994), Lopez ve diğ. (2009) tarafından rapor edilmiştir.

Stakebrandt ve diğ. (1995), Sharifuzzaman ve diğ. (2011), Savini ve diğ. (2010), Reddy ve diğ. (2003), Lai ve diğ. (2010), Kovacs ve diğ. (1999), Kim ve diğ. (2004), Ben-Ami ve diğ. (2005) tarafından bildirilen bulgulara benzer olarak Gram pozitif, koagülaz negatif, kokoid, tetrat ve diplokok şekilli TSA besiyerinde parlak sarı, düzgün kenarlı konveks koloniler oluşturan 14 numaralı suş standart biyokimyasal testlere vermiş olduğu sonuçlara ve 16S rDNA dizi benzerliğine göre *Kocuria* sp. olarak tespit edilmiştir.

Disk difüzyon ve MİK testlerinin sonuçlarına göre çalışmada referans suş olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922 suşunun CLSI (2012) tarafından belirtilen hassaslık değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada izole ve teşhis edilen tüm suşların disk difüzyon ve MİK testi bulgularının uyumlu oldukları görülmüştür.

Pseudoalteromonas sp. olarak teşhis edilen 1, 2 ve 3 numaralı suşların ampisilin, sulfametoksazol, kanamisin, penisilin, streptomisin ve sefoperazona duyarlı oldukları ancak 2 numaralı suşun streptomisin ve sefoperazona hassas olduğu tespit edilmiştir. Üç *Pseudoalteromonas* sp. suşunun diğer araştırmacılar tarafından bildirilen bulgularla uyumlu olduğu görülmüştür (Ivanova ve diğ., 1998; Ivanova ve diğ., 2004). Ivanova ve diğ., (1998) tarafından *Pseudoalteromonas* sp. türlerinin rifampisin, eritromisin, gentomisine hassas, kanamisine değişken duyarlılık ve ampisiline dirençli oldukları bildirilmiştir. Ivanova ve diğ., (2004) tarafından ampisilin, gentamisin, kanamisin ve streptomisine değişken duyarlılık profilleri gösteren *Pseudoalteromonas* sp. suşları olduğu rapor edilmiştir.

V. anguillarum olarak teşhis edilen dört suşun (5, 6, 7, 8 numaralı suşlar) birbirlerine benzer hassasiyet özellikleri gösterdikleri tespit edilmiştir. Tüm *V. anguillarum* suşlarının ampisilin, kolistin, kanamisin, sefotaksim, seftazidim, streptomisin ve penisiline dirençli oldukları tespit edilmiştir. Diğer *V. anguillarum* suşlarından farklı olarak 8 numaralı suşun sulfametoksazole hassas ve gentamisine orta dirençli olduğu görülmüştür. Eritromisine karşı tüm *V. anguillarum* suşlarının orta dirençli olduğu, 6 ve 8 numaralı suşların kanamisine orta dirençli olduğu, 5 ve 7 numaralı suşların hassas olduğu görülmüştür. Tüm suşların nalidiksik asit, tetrasiklin, oksitetrasiklin ve

sulfametazine karşı hassas oldukları tespit edilmiştir. Dört *V. anguillarum* suşunun diğer araştırmacılar tarafından bildirilen *V. anguillarum* suşlarının benzer antibakteriyel maddelerle olan hassasiyet ve direnç profilleri ile uyum gösterdiği görülmüştür (Myhr ve diğ., 1991; Pazos ve diğ., 1993; Balebona ve diğ., 1998; Colquhoun ve diğ., 2007; Gratacap, 2008). *V. anguillarum* O1 ve O2 serotiplerinin su ürünleri yetiştiriciliğinde tercih edilen kolistin, ampisilin, sefalotin gibi antibiyotiklere olan duyarlılıkları değişkenlik gösterdikleri bildirilmiştir. Kültür balıkçılığında en çok tercih edilen antibiyotikler oksilininik asit ve flumekuindir. Ancak oksilininik asite karşı dirençli suşların bulunduğu ve bunun giderek artan bir sorun olduğu bildirilmiştir (Colquhoun ve diğ., 2007; Gratacap, 2008). Çipura balıklarından izole edilen bütün *V. anguillarum* suşlarının penisilin, amikasin, streptomisin, kanamisinine karşı dirençli, amoksilin, trimetoprim-sülfametaksazole, nitrofurantoin, kloramfenikole karşı hassas oldukları rapor edilmiştir (Balebona ve diğ., 1994). *V. anguillarum* suşlarının yüksek oranda antibiyotiklere karşı duyarlı bulunduğu, nitrofrazolidonun diğer antibakteriyel bileşiklerden daha az etkili olduğu, VAR suşlarının özellikle nitrofrazolidona yüksek direnç gösterdikleri ve oksitetrasiklin, flumekuin ve trimetoprim-sulfadiazine karşı daha az direnç gösterdikleri rapor edilmiştir (Myhr ve diğ., 1991).

V. splendidus olarak teşhis edilen 9 numaralı suşun ampisilin, gentamisin, streptomisin, sefoperazona dirençli, eritromisine orta dirençli ve diğer antibiyotiklere karşı hassas olduğu ve Pazos ve diğ. (1993), Balebona ve diğ., (1998) gibi araştırmacılar tarafından bildirilen bulgular ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *V. splendidus* türlerinden oluşan çalışma grubundaki çoğu suşun ampisilin ve streptomisine karşı dirençli ve değişken duyarlılıklarda oldukları, tetrasiklin, oksitetrasiklin, oksilininik asit, kloramfenikol, trimetoprim-sulfametoksazol ve nitrofurantoina karşı hassas ve değişken duyarlılıklarda oldukları bildirilmiştir (Pazos ve diğ., 1993). Balebona ve diğ., (1998) *V. splendidus* suşlarının ampisilin, penisilin, gentamisin, streptomisin ve sefoperazona dirençli ve eritromisine orta düzeyde duyarlı ve diğer antibiyotiklere hassas olduğunu bildirmiştir.

V. harveyi olarak teşhis edilen 10, 11 ve 12 numaralı suşların ampisilin, penisilin ve kolistine dirençli oldukları, 11 ve 12 numaralı suşların sefoperazon ve sulfametoksazole dirençli oldukları, 10 ve 12 numaralı suşun kanamisinine dirençli olduğu ve sefotaksime

yalnızca 10 numaralı suşun dirençli olduğu tespit edilmiştir. Gentamisin, eritromisin, streptomisin ve oksolinik asite orta direnç gösterebildikleri görülmüştür. Bulguların diğer araştırmacılar tarafından bildirilen bulgular ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Balebona ve diğ., 1998; Uma ve diğ., 2008). Bütün *V. harveyi* suşlarının penisilin, ampisilin ve eritromisine dirençli oldukları, amoksisilin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, streptomisin, trimethoprim- sülfametazole ve kloramfenikole karşı hassas oldukları rapor edilmiştir (Balebona ve diğ., 1998). Uma ve diğ. (2008) *V. harveyi* suşlarının kuluçkahanelerde kullanılan yaygın antibiyotiklere karşı değişken sonuçlar verdiğini rapor edilmişlerdir. Bütün izolatların kloramfenikol ve gentamisine çok hassas, frozolidona dirençli oldukları bildirilmiştir. Ayrıca oksitetrasiklin, norflaksin ve siproflaksine hassas ve bazı *V. harveyi* suşlarının kloramfenikol ve gentamisine dirençli olduğu rapor edilmiştir.

İzole edilen 13 adet Gram negatif, çomak şekilli bakterilerin ülkemizde su ürünlerinde kullanılmasına izin verilmiş ve kalıntı kontrolü yapılacak antibiyotikler listesi içerisinde yer alan sülfonamid, tetrasiklin, flumequin, oksolinik asit gibi antibiyotiklere karşı hassas oldukları tespit edilmiştir. Ancak izole edilen *Vibrio* genusuna ait 9 adet suşun (5, 6, 7 ve 8 numaralı *V. anguillarum*, 10, 11 ve 12 numaralı *V. harveyi*, 9 numaralı *V. splendidus*, 4 numaralı *Vibrio* sp. suşları) ampisiline dirençli olduğu görülmüştür.

Oksitetrasiklin, sülfanamid ve kinolon grubu (nalidik asit, oksolinik asit, flumequin gibi) antibiyotikler Vibriosis hastalığının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak kinolon ve çoklu antibiyotik direncinin *V. anguillarum* ve *V. harveyi* suşları arasında geliştiği araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Aoki, 1999; Pedersen ve diğ., 1995; WHO, 1999; Nakayama ve diğ., 2006; Okuda ve diğ., 2006; Colquhoun ve diğ., 2007). İzole edilen dört adet *V. anguillarum* ve üç adet *V. harveyi* suşunun bu antibiyotiklere hassas olduğu tespit edilmiştir.

Psychrobacter sp. olarak izole edilen 13 numaralı suşun penisilin, sulfametoksazol ve trimetoprim dirençli, eritromisin ve seftazidime orta dirençli ve diğer kullanılan antibiyotiklere karşı hassas oldukları tespit edilmiştir. Bu bulguların araştırmacılar tarafından bildirilen bulgulara ile uyumlu olduğu görülmüştür (Ponder ve diğ., 2005; Jung ve diğ., 2005). Armstrong ve diğ., 2005 tarafından bildirilen oksitetrasiklin direnci

bu çalışmada izole edilen *Psychrobacter* sp. suşunda görülmemiştir. Şili’de tatlı suda yetiştirilen Atlantik salmon çiftliğinde fingerlinglerden, pelet yemlerden ve sudan izole edilen aerobik bakterilerin *Psychrobacter* genusuna ait iki farklı türünün (*P. glacincola* ve *P. pacificens*) oksitetrasikline (OT) dirençli oldukları rapor edilmiştir (Armstrong ve diğ., 2005). Ponder ve diğ. (2005) tarafından bildirilen ampisilin, kloramfenikol, streptomisin ve tetrasiklin hassasiyeti bu çalışmada izole edilen *Psychrobacter* sp. suşunda görülmesine karşın eritromisine orta direnç tespit edilmiştir. Jung ve diğ. (2005) tarafından bildirilen streptomisin hassasiyeti ile ampisilin, penisilin ve tetrasikline karşı değişken duyarlılık gösteren suşların bulunabileceği bildirilmiştir. Mindlin ve diğ. (2008) tarafından bildirilen streptomisin ve tetrasiklin direnci bu çalışmada elde edilen *Psychrobacter* sp. suşunda görülmemiştir.

Kocuria genusuna ait türlerin ampisilin, gentamisin, streptomisin ve tetrasikline hassas fakat kanamisine dirençli olabileceği rapor edilmiştir (Kim ve diğ. 2004). Sazlıklardan izole edilen üç farklı *Kocuria* türünün teşhis edildiği çalışmada penisilin, sulbaktam/ampisilin, sefoperazon, kloramfenikol, eritromisin ve trimetoprim karşı hassas oldukları bildirilmiştir (Kovaks ve diğ., 1999). Çeşitli *Kocuria* türlerinin antibakteriyal duyarlılıklarının ölçüldüğü çalışmada kanamisin, plimiksin B, kolitsin, penisilin, siprofloksasin ve nalidiksik asite dirençli türlerin bulunduğu bildirilmiştir (Savini ve diğ., 2010). *Kocuria* sp. olarak izole edilen 14 numaralı suşun Kim ve arkadaşları (2004) tarafından bildirildiği gibi ampisiline hassas olduğu ancak gentamisin, streptomisin, tetrasikline ve kanamisine dirençli olduğu, Kovaks ve diğ., (1999) tarafından bildirildiği şekilde ampisiline ve sefoperazona hassas olduğu ancak eritromisine ve penisiline orta direnç, trimetoprim dirençli olduğu, Savini ve diğ. (2010) tarafından bildirildiği şekilde kanamisin, kolitsin, penisilin, siprofloksasin, nalidiksik asite dirençli olduğu ancak plimiksin B’ye karşı hassas olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda izole edilen dört adet *V. anguillarum* suşu diğer araştırmacılar tarafından bildirilen benzer API profilleri göstermiştir. Ancak izole edilen diğer on adet suş gerek API veri tabanı gerekse diğer araştırmacılar tarafından bildirilen API profillerinden farklılık göstererek herhangi bir sonuca ulaşılmamasına neden olmuştur. Gram pozitif, hareketsiz, koagülaz negatif tetrat ve diplokok şekilli 14 numaralı suşa

API staph uygulanmış ve API veri tabanında *Staphylococcus xylosus* olarak yanlış teşhis edilmiştir. Kloos ve Schleifer, (1975), Bannerman ve Peacock, (2007) tarafından bildirildiği şekilde koagülaz, arabinoz mannitol, ornitin dekarboksilaz negatif, sakkaroz, trehaloz, maltoz, hemoliz, üre pozitif özellikleri göz önünde bulundurularak standart tüp yöntemi ile *Staphylococcus warneri* olduğu tespit edilmiştir. Kovacs ve diğ., (1999), Kim ve diğ., (2004), Lai ve diğ., (2010) tarafından bildirildiği şekilde 16S rDNA gen dizi analizi yöntemi ile bu çalışmada izole edilen 14 numaralı suşun *Kocuria* sp. olduğu tespit edilmiştir. Önceleri *Micrococcus* genusuna ait olduğu bildirilen *Kocuria* türleri Stackebrandt ve arkadaşları (1995) tarafından kemotaksonomik ve filogenetik analizler sonucunda *Kocuria* genusu olarak sınıflandırılması gerektiği bildirilmiştir. *Staphylococcus* ve *Micrococcus* genusuna ait türlerin Vitek (bioMe'rieux), Vitek 2 (bioMe'rieux), API (bioMe'rieux), BD Phoenix gibi teşhis yöntemleri ile yanlış teşhisler yapılabildiği kadar doğru sonuçlar da alınabildiği bildirilmiştir (Ben-Ami ve diğ., 2005; Savini ve diğ., 2010). Savini ve diğ. (2010) tarafından bildirdiği gibi yapılan bu çalışma sonucunda da fenotipik testlerle yapılan bir ön tanımlama sonucunda genoma dayalı tiplendirmelerin kesin sonuçlar almak için uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- ABOWEI, J.F.N., BRIYAI, O.F., 2011, A Review of Some Bacteria Diseases in Africa Culture Fisheries, *Asian Journal of Medical Sciences*, 3(5), 206-217.
- ACTIS, L.A., TOLMASKY, M.E., CROSA, J.H., 2011, Vibriosis. In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, 1845935543, 9781845935542.
- AKARSU, G.A., GÜNGÖR, Ç., ALTINTAŞ, K., YERGÖK, B., 2000, Lateks aglütinasyon testiyle serumda özgül anti-toksoplazma antikorlarının araştırılması, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 53(2), 87-89.
- AKAYLI, T., 2001, *Kültür Çipura balıklarında (Sparus auratus, L .1758) Vibriosis'in ELISA ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- AKAYLI, T., TİMUR G., 2004, Yavru Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) *Pseudomonad Septisemisi* Üzerinde Bir Çalışma, *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Uni.*, 30(1), 121-131.
- AKAYLI, T., TİMUR, G., 2004, A Diagnostic Study on Vibriosis Cultured Gilt-head Sea Bream in the Aegean Sea Coast of Turkey, *Istanbul University Journal of Aquatic Sciences*. 18, 43-54.
- ALDERMAN, D.J., SMITH, P., 2001, Development of draft protocols of Standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases, *Aquaculture*, 196, 211-243.
- ALSINA, M., BLANCH, A.R., 1994, A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species, *Journal of Applied Microbiology*, 76(1), 76-85.
- ALTINOK, İ., GRIZZLE, J.M., LIU, Z., 2001, Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 44, 29-34.
- ALTINOK, İ., KURT, İ., 2003, Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3, 131-138.
- ALVAREZ, J.D., AUSTIN, B., ALVAREZ, A.M., REYES, H., 1998, *Vibrio harveyi*: a pathogen of penaeid shrimps and fish in Venezuela, *Journal of Fish Diseases*, 21, 313-316.

- ANGULO, L., LOPEZ, J.E., VICENTE, J.A., SABORIDO, A. M., 1994, Haemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), *Journal of Fish Diseases*, 17(2), 163-169.
- ANDERSON, D.P., 1974, *Fish Immunology*, T.F.H. Publications Inc. Ltd., 0-87666-036-7.
- AOKI, T., 1999, Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, 0851991947.
- ARGENTON, F., DE MAS, S., MALOCCO, C., DALLA VALLE, L., GIORGETTI, G., COLOMBO, L., 1996, Use of random DNA amplification to generate specific molecular probes for hybridization tests and PCR-based diagnosis of *Yersinia ruckeri*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24, 121-127.
- ARMSTRONG, S.M., HARGRAVE, B.T., HAYA, K., 2005, Antibiotic Use in Finfish Aquaculture: Modes of Action, Environmental Fate, and Microbial Resistance, *Hdb Env Chem*, 5, 341-357.
- ASH, R.J., MAUCK, B., MORGAN, M., 2002, Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, U.S. *Emerging Infectious Diseases* 8, 713-716.
- AUSTIN, B., STOBIE, M., ROBERTSON, P. A. W., GLASS, H. G., STARK, J. R., MUDARRIS, M., 1993, *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., in a Scottish aquarium, *Journal of Fish Diseases*, 16(3), 277-280.
- AUSTIN, B., AUSTIN, D., 2007, *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish Seventh (Revised) Edition*. Springer-Praxis Publishing, Chichester.
- AYALA-DEL-RÍO, H.L., CHAIN, P.S., GRZYMSKI, J.J., PONDER, M.A., IVANOVA, N., BERGHOLZ, P.W., BARTOLO, G.D., HAUSER, L., LAND, M., BAKERMANS, C., RODRÍGUES, D., KLAPPENBACH, J., ZARKA, D., LARIMER, F., RICHARDSON, P., MURRAY, A., THOMASHOW, M., TIEDJE, J.M., 2010, The Genome Sequence of *Psychrobacter arcticus* 273-4, a Psychroactive Siberian Permafrost Bacterium, Reveals Mechanisms for Adaptation to Low Temperature Growth, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2304-2312.
- AVCI, H., TANRIKUL, T.T., AYDOĞAN, A., BİRİNCİOĞLU, S.S., 2010, Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae*, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-B), S313-S318.
- BADER, J.A., SHOTTS, E.B., 1998, Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene, *J Aquat Anim Health*, 10, 311-319.

- BALEBONA, M.C., ZORILLA, I., MORINIGO, M. A., BORREGO, J.J., 1998, Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996, *Aquaculture*, 166(1-2), 19-35.
- BAŞÇINAR, N., OKUMUŞ, İ., 2004, The early development of brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill): Survival and growth rates of alevins. *Türk. J. Vet. Anim. Sci.*, 28, 297-301.
- BAUMANN, P., SHUBERT R.H.W., 1984, Family II. Vibrionaceae. In: Krieg N.R., Holt J.G., eds, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, The Williams and Wilkins*, Baltimore, 516-550.
- BAYRAKTAR, B., YILDIZ, D., BULUT, E., ÖCALMAZ, F., SEBER, E., 2004, *Staphylococcus aureus*'un İdentifikasyonunda Kullanılan Üç Metodun Değerlendirilmesi, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34, 211-214.
- BEIN, S.J., 1954, A study of certain chromogenic bacteria isolated from 'red tide' water with a description of a new species, *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*, 4, 110-119.
- BEKKER, J.H., 1946, Studies on Staphylococci I. The Plasma Coagulation Reaction, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 13(1), 63-66.
- BEN-AMI, R., NAVON-VENEZIA S., SCHWARTZ, D., SCHLEZINGER Y., MEKUZAS, Y., CARMELI, Y., 2005, Erroneous Reporting of Coagulase-Negative Staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 System, *Journal of Clinical Mikrobiology*, 43 (3), 1448-1450.
- BERTOLINI, J.M., CIPRIANO, R.C., PYLE, S.W., MCLAUGHLIN, J.J.A., 1990, Serological investigation of the fish pathogen *Edwardsiella ictaluri*, cause of enteric septicemia of catfish, *Journal of Wildlife Diseases*, 26(2), 246-252.
- BİLGEHAN, H., 2004, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları.
- BIOMERIEUX, 2012, API Identification, [Online], http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_PRD_CPL_G_PRD_CLN_11 [Ziyaret Tarihi: 18 Şubat 2012].
- BIONOR, 2012, BIONOR™ AQUA TEST SYSTEMS FOR DETECTION OF FISH DISEASES [Online], <http://www.bionor.no/bioaqua.pdf> [Ziyaret Tarihi: 18 Şubat 2012].
- BIOSCA, E. G., AMARO, C., ESTEVE, C., ALCAIDE, E., GARAY., E., 1991, First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla*, L. J. Fish Dis. 14:103–109.

- BLAST, 2012, Basic Local Alignment Search Tool, [online] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [Ziyaret Tarihi: 20 Nisan 2012]
- BOESEN, H. T., PEDERSEN, K., LARSEN, J. L., KOCH, C., ELLIS, A. E., 1999, *Vibrio anguillarum* Resistance to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Serum: Role of O Antigen Structure of Lipopolysaccharide, *Infection and Immunity*, 67 (1), 294.
- BOONE, D.R., CASTENHOLZ, R.W., GARRITY, G. M., BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., STALEY, J.T., 2005, *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology*, Springer, 0387241450, 9780387241456.
- BORDAS, M.A., BALEBONA, M.C., ZORRILLA, I., BORREGO, J.J., MORINIGO, M.A., 1996, Kinetics of Adhesion of Selected Fish-Pathogenic *Vibrio* Strains to Skin Mucus of Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.), *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3650.
- BOWMAN, J.P., CAVANAGH, J., AUSTIN, J.J., SANDERSON, K., 1996, Novel *Psychrobacter* Species from Antarctic Ornithogenic Soils, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4), 841-848.
- BOWMAN, J.P., 2007, Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas*, *Mar. Drugs*, 5, 220-241.
- BOYACIOĞLU, M., 2007, *Gökkuşluğu alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) RTFS'ye (Rainbow Trout Fry Syndrome) neden olan Flavobacterium psychrophilum etkeninin izolasyonu ve antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi*, Doktora tezi, Farmakoloji ve Toksikoloji, Veteriner Fakültesi, Adnan Menderes Üniversitesi.
- BOZAL, N., TUDELA, E., ROSSELLO-MORA R., LALUCAT J., GUINEA, J., 1997, *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., Isolated from an Antarctic Coastal Environment, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 345-351.
- BOZAL, N.R., MONTES, M.J., TUDELA, E., GUINEA, J., 2003, Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1093–1100.
- BROCKLEBANK, J.R., EVELYN, T.P.T., SPEARE, D.J., ARMSTRONG, R.D., 1993, Rickettsial septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon in British Columbia: Clinical presentation and experimental transmission, *Can. Vet. J.* 34, 745–748.
- BROCKLEBANK, J., RAVERTY, S., ROBINSON, J., 2003, Mycobacteriosis in Atlantic salmon farmed in British Columbia, *The Canadian Veterinary Journal*, 44(6), 486-489.

- BROOKS, G.F., CARROLL, K.C., BUTEL, J.S., MORSE, S.A., MIETZNER, T.A., 2010, *Chapter 28 Antimicrobial Chemotherapy* in Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology, McGraw Hill Medical, 0071624961, 9780071624961.
- BUCK, J.D., 1982, Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (4), 922–933.
- BULLER, N. B., 2004, *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*. London: CABI Publishing, ISBN 0 85199 738.
- BULLOCK, G.L., 1978, *Pasteurellosis OF Fishes*, University of Nebraska – Lincoln, U.S. Government Printing Office, 779-091, 27.
- CANDAN, A, 1991, Lymphocystis Disease of Sparus aurata in Marine Culture at Aegean and Mediterranean Coast of Turkey. *MEDRAP II, Mediterranean Regional Aquaculture Project. Basic Level Training Course on Disease, Diagnosis and Prevention for Aquatic Species*. Turkey.
- CANDAN, A., KARATAŞ, S., 2010, *Balık Sağlığı*. İstanbul: Kalmak Ofset, 978–605-88665-0-8.
- CANDAN, A., KÜÇÜKER, A.M., KARATAŞ, S., 1995, Motile Aeromonad Septicemia in *Salmo salar* Cultured in The Black Sea in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15(6), 195.
- CANDAN, A., KÜÇÜKER-ANÇ, M., KARATAŞ, S., 1996, Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bull. Ass. Fish Pathol.*, 16(5): 195-196.
- CANDAN, A., 2000, First Records of Vibriosis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Cultured in Turkey, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 31, 1.
- CARIG, W. A., 1998, Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clinical Infectious Diseases* (26), 1-12.
- CHEN, S-C., WANG, P-C., TUNGL, M-C., THOMPSON, K.D., ADAMS, A., 2000, A Piscirickettsia salmonis-like organism in grouper, Epinephelus melanostigma, in Taiwan, *Journal of Fish Diseases*, 23, 415–418.
- CHINABUT, S., 1999, Mycobacteriosis and Nocardiosis In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, 0851991947.
- CLSI, 2012, M100-S22 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement.
- CLSI, 2006, M42-A Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Approved Guideline.

- COLORNIA, A., AVTALIONB, R., KNİBBA, W., BERGERA, E., COLORNIA, B., TIMANB, B., 1998, Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract, *Aquaculture*, 160(1-2), 1-17.
- COLQUHOUN, D.J., AARFLOT, L., MELVOLD, C.F., 2007, gyrA and parC Mutations and Associated Quinolone Resistance in *Vibrio anguillarum* Serotype O2b Strains Isolated from Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in Norway, *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, 51(7), 2597–2599.
- COLWELL, R.R., GRIMES, D.J., 1984, *Vibrio* diseases of marine fish populations, *Helgoland Marine Research*, 37(1-4), 265-287.
- COMPS, BY M., RAYMOND, J.C., PLASSIART G.N., 1996, Rickettsia-like Organism Infecting Juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax*, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16(1),30.
- ÇAĞIRGAN, H., 1993, The First Isolation of *Pasteurella piscicida* From Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3(2), 17-19.
- ÇAĞIRGAN, H., 2004, Levrek Yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) *Vibriozise Karşı Aşı Geliştirilmesi*, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 21, 271-274.
- ÇAĞIRGAN, H., YÜREKLİTÜRK, O., 1991, First isolation of *Yersinia ruckeri* from a rainbow trout farm in Turkey. Fifth International Conference “Disease of Fish and Shellfish”, *Book of Abstracts*, 131.
- ÇAĞIRGAN, H., YÜREKLİTÜRK, O., 1996, A Research on the Diagnosis and Treatment of Cultured Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bas (*Dicentrarchus labrax*), *The Journal of Centre of Veterinary Control and Research Institute*, 21(35),113-122.
- ÇAĞIRGAN, H., TANRIKUL, T., BALTA, F., 1997, *Characteristic yellow pigmented bacteria isolated from diseased Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Eighth International Conference “Diseases of Fish and Shellfish” 14 – 19 Sep.*, Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists.
- ÇAĞIRGAN, H., TANRIKUL, T., 1998, Testing the effectiveness of a *Yersinia* vaccine in infected and chemically treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *J. Appl. Ichthyol.* 14, 239-243.
- ÇAKIR, N., 2007, Antibiyotiklerin Farmakokinetik ve Farmakodinamiği. *Klinik 2007 XIII. Türk Linik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, 153-155.
- ÇELİKKALE, M.S., DÜZGÜNEŞ, E., OKUMUŞ, İ., 1999, Fisheries Sector in Turkey: Potential, Current State, Constraints and Recommendations (in Turkish), İstanbul Ticaret Odası Yayınları (İTO), No. 1999-2, Lebib A.S., İstanbul. 414 s.

- COMPANY, R., SITJO-BOBADILLA, A., PUJALTE, M.J., GARAY, E., ALVAREZPELLITERO, P., PÉREZ-SÁNCHEZ, J., 1999, Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex*, *Journal of Fish Diseases*, 22, 299-309.
- ÇOLAK, H.S., 1999, *Deniz Levreklerinde (Dicentrarchus labrax L.) Deneysel Olarak Oluşturulan Pasteurellosis Hastalığının Patogenezisi ve Kemoterapatiklere Olan Duyarlılığı*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ÇOTUK, A., 2003, *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- DALSGAARD, I., HOI, L., SIEBELING, R.J., DALSGAARD, A., 1999, Indole-positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm, *Diseases of Aquatic Organisms*, 35(3), 187-94.
- DEMİRCAN, M. D., CANDAN, A., 2006, Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 305-310.
- DIAMANT, A., BANET, A., UCKO, M., COLORNI, A., KNIBB, W., KVITT, H., 2000, Mycobacteriosis in wild rabbitfish *Siganus rivulatus* associated with cage farming in the Gulf of Eilat, Red Sea, *Diseases of Aquatic Organisms*, 39, 211-219.
- DIGGLES, B.K., CARSONB, J., HINEA, P.M., HICKMANA, R.W., TAITA, M.J., 2000, *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand, *Aquaculture*, 183(1-2), 1-12.
- DİLER, Ö., ALTUN, S., ADİLOĞLU, A.K., KUBİLAY, A., İŞIKLI, B., 2002, First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(1), 21-26.
- DİLER, Ö., ALTUN, S., İŞIKLI, B.I., 2003, Kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri, *S. D. Ü. Fen Bil. Enst. Derg.*, 7, 1 – 8,.
- DOUKAS, V., ATHANASSOPOULOU, F., KARAGOUNI, E., DOTSIKA, E., 1998, Short communication *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea, *Journal of Fish Diseases*, 21(4), 317-320.
- DURMAZ, Y., ONUK, E.E., ÇİFTÇİ, A., 2012, Investigation of the presence and antibiotic susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout farms (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) in The Middle and Eastern Black Sea Regions of Turkey, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 141-146.

- FAO Fisheries and Aquaculture Department, 2010, *The State of World Fisheries and Aquaculture 2010* (Cilt 978-92-5-106675-1). Rome: Food and Agriculture Organization of The United Nations.
- FOUZ, B., AMARO, C., 2003, Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms, *Aquaculture*, 217, 1–4, 677–682.
- FOUZ, B., LARSEN, J.L., NIELSEN, B., BARJA, J.L., TORANZO, A.E., 1992, Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain, *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 155–166.
- FRYER, J.L., HEDRICK, R.P., 2003, *Piscirickettsia salmonis*: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish, *Journal of Fish Diseases*, 26, 251–262.
- FURONES, M.D., 2001, Sampling for antimicrobial sensitivity testing: a practical consideration, *Aquaculture*, 196, 303–309.
- GAUTHIER, G., GAUTHIER M., CHRISTEN, R., 1995, Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations, *International journal of Systemic Bacteriology*, 45(4), 755–761.
- GKGM, G.V., 2012, İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları [online]. http://www.gkgm.gov.tr/birim/hayvan_sagligi_karantina/faaliyet/ihbari_mecburi_hast.html, [Ziyaret Tarihi: 18 Mart 2012].
- GOMEZ-GIL, B., SOTO-RODRIGUEZ, S., GARCÍA-GASCA, A., ROQUE, A., VAZQUEZ-JUAREZ, R., THOMPSON, F.L., SWINGS, J., 2004, Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms, *Microbiology*, 150, 1769–1777.
- GRATACAP, R.M.L., 2008, Characterisation of *Vibrio anguillarum* for the development of vaccine in cod (*Gadus morhua*), Doctora thesis, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.
- GRISEZ, L., REYNIERSA, J., VERDONCKB, L., SWINGSB, J., OLLEVIERA, F., 1997, Dominant intestinal microflora of sea bream and seabass larvae, from two hatcheries, during larval development, *Aquaculture*, 155(1-4), 387–399.
- GÜR, D., 2010, Antibiyotikler ve *In-vitro* Parametreler. *Ankem Dergisi* 24(Ek 2), 155–158.
- HADA, H.S., WEST, P.A., LEE, J.V., STEMMER, J., COLWELL R.R., 1984, *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 1–4.

- HALAIHEL, N., VENDRELL, D., RUIZ-ZARZUELA, I., BLAS, I., ALONSO J.L., GIRONÉS, O., PÉREZ T., MUZQUIZ, J.L., 2009, A new real time PCR-based assay for diagnosing *Renibacterium salmoninarum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and comparison with other techniques, *Journal of Microbiological Methods*, 76(1), 75-80.
- HAWKE, J. P., PLAKAS, S. M., MINTON, R.V., MCPHEARSON, R. M. SNIDER, T.G., GUARINO, A.M, 1987, Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama, *Aquaculture*, 65(3-4), 193-204.
- HENDLINGER, J., CARSON, J., DONACHIE, L., GABOR, L., TAYLOR, D., 2005, Bacterial Infection in Tasmanian Farmed Abalone: Causes, Pathology, Farm Factors and Control Options, *Diseases in Asian Aquaculture*, V, 289-299.
- HINEY, M., OLIVER., G., 1999, Frunculosis (*Aeromonas salmonicida*) In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, 0851991947.
- HİSAR, O., YANİK, T., HİSAR, S.A., 2002, Clinical and Pathological Investigation of *Psycrobacter immobilis* infection in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbourn), *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 54(4), 189-196.
- HOLMSTROM, C., KJELLEBERG S., 1999, Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents, *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 285-293.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T., 1994, *Bergey's manual of determinative bacteriology Ninth Edition*. Lippincott Williams & Wilkins Company.
- HØIE, S., DALSGAARD, I., AASE, I.L., HEUM, M., THORNTON, J.M., POWELL, R. 1999, Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*, *Syst. Appl. Microbiol.*, 22, 403–411.
- IVANOVA, E.P., KIPRIANOVA E.A., MIKHAILOV, V.V., LEVANOVA, G.F., GARAGULYA, A.D., GORSHKOVA, N.M., VYSOTSKII, M.V., NICOLAU, D.V., YUMOTO, N., TAGUCHI, T., YOSHIKAWA S., 1998, Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 247-256.
- IVANOVA, E.P., GORSHKOVA, N.M., ZHUKOVA, N.V., LYSENKO, A.M., ZELEPUGA, E.A., PROKOF'EVA, N.G., MIKHAÏLOV, V.V., NICOLAU, D.V. CHRISTEN, R., 2004, Characterization of *Pseudoalteromonas distincta*-like sea-water isolates and description of *Pseudoalteromonas aliena* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1431–1437.

- IZUMI, S., FUJII, H., ARANISHI, F., 2005, Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis, *J. Fish Dis.*, 28, 559–564.
- İSPİR, Ü., ŞEKER, E., SAĞLAM, N., DÖRÜCÜ, M., 2004, Doğu Anadolu Bölgesinde Bazı Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde Görülen *Flavobacterium psychrophilum* Enfeksiyonunun Araştırılması, *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(4), 718-724.
- JAYASANKAR, P. 1998, Application of DNA Fingerprinting in Genome Analysis of Fishes, *Proc. First Natl. Semi. Mar. Biotech.*, 151-159.
- JUNG, S.Y., LEE, M.H., OH, T.-K., PARK, Y.H., YOON, J.H., 2005, *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 577–582.
- JUNI, E., HEYM, G.A., 1986, *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli, *Int J Syst Bacteriol*, 36, 388-391.
- KAISER, M., STEAD S.M., 2002, Uncertainties and values in European aquaculture: communication, management and policy issues in times of “changing public perceptions”, *Aquac Int.*, 10, 469–490.
- KARATAŞ DÜĞENCİ, S., CANDAN, A., 1997, *Marmara bölgesindeki bir gökkuşığı alabalığı (O. mykiss) işletmesinde yersiniozis vakası*. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu. (17 – 19 Eylül 1997). Eğirdir/Isparta. 641 – 648.
- KARATAŞ DÜĞENCİ, S., CANDAN, A., DEMİRCAN, D., 2004, Enteric Red Mouth Disease in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the Black Sea Coast of Turkey. *The Isreali Journal of Aquaculture*, 56(3), 226-231.
- KARATAŞ, S., CANDAN, A., DEMİRCAN, D., 2005, Atypical Aeromonas Infection in Cultured Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black Sea, *The Isreali Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57(4), 255-263.
- KARATAŞ, S., CANDAN, A., 2007, Important Bacterial, Viral diseases and Treatment in Marine Aquaculture. In: *Marine Aquaculture in Turkey*. Edited by Candan, A., Karataş, S., Küçüktaş, H., Okumuş, İ., *Turkish Marine Research Foundation*, 978-975-8825-18-9
- KARUNASAGAR, I., PAI, R., MALATHI, G.R., KARUNASAGAR, I., 1994, Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection *Aquaculture*, 128, 203-209.
- KAV, K., ERGANİŞ, O., 2007, Balıklarda Aşılama Teknikleri, *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 21(2), 95-102.

- KAWAKAMI, H., NAKAJIMA, K., 2002, Cultured fish species affected by red sea bream iridoviral disease from 1996 to 2000, *Fish Pathology*, 37, 45 – 47.
- KAYIŞ, S., CAPKIN, E., BALTA, F., ALTINOK, I., 2009, Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey - A Survey, *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 61(4), 339-344.
- KIIYUKIA, C., NAKAJIMA, A., NAKAI, T., MUROGA, K., KAWAKAMI, H., HASHIMOTO, H., 1992, *Vibrio cholerae* Non-O1 Isolated from Ayu Fish (*Plecoglossus altivelis*) in Japan, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 3078-3082.
- KIRAN, F., OSMANAĞAOĞLU, Ö., 2011, Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda/Tiplendirmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1), 62-74.
- KIRKAN, S., GÖKSOY, E.O., KAYA, O., 2003, Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 50, 339-342.
- KITAO, T., AOKI, T., FUKUDOME, M., KAWANO, K., WADA, Y., MIZUNO, Y., 1983, Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan, *Journal of Fish Diseases*, 6(2), 175-181.
- KIM, S.B., NEDASHKOVSKAYA, O.I., MIKHAILOV, V.V., HAN, S.K., KIM, K.O., RHEE, M.S., BAE, K.S., 2004, *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 1617–1620.
- KORNBERG, A., BAKER, T.A., 2005, *DNA replication*, University Science Books, 1891389440, 9781891389443.
- KORUN, J., TİMUR, G., 2001, Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 12, 15-30.
- KORUN, J., TİMUR, G., 2008, Marine Vibrios Associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Journal of Fisheries Sciences*, 2(1), 66-76.
- KORUN, J., TİMUR, G., 2005, The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57 (3), 197–206.
- KORUN, J., OLGAC, V., AKGUN-DAR, K., KOLORNI, A., DIAMANT, A., 2005, Mycobacteriosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., cultured in Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57 (4), 215–222.

- KOVACS, G., BURGHARDT J., PRADELLA, S., SCHUMANN, P., STACKEBRANDT, E., MHRIALIGETI, K., 1999, *Kocuria palustris* sp. nov., and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*), *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 167-173.
- KRANTZ, G.E., REDDECLIFF, J.M., HEIST, CE., 1963, Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout, *Journal of Immunology*, 91, 757-760.
- KRAXBERGER - BEATTY, T., MCGAREY, D. J., 1990, *Vibrio harveyi*, an opportunistic pathogen of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), held in captivity. *Journal of Fish Diseases*, 13, 557-560.
- KUBİLAY, A., ULUKÖY, G., 2004, First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24(3), 137-143.
- KUM, C., KIRKAN, Ş., SEKKİN, S., AKAR, F., BOYACIOĞLU, M., 2008, Comparison of In Vitro Antimicrobial Susceptibility in *Flavobacterium psychrophilum* Isolated from Rainbow Trout Fry, *Journal of Aquatic Animal Health*, 20(4), 245-251.
- LAI, C.C., WANG, J.Y., LIN, S.H., TAN C.K., WANG C.Y., LIAO, C.H., CHOU, C.H., HUANG Y.T., LIN, H.I., HSUEH, P.R., 2010, Catheter-related bacteraemia and infective endocarditis caused by *Kocuria* species, *Clin Microbiol Infect*, 17, 190-192.
- LALITHA, M.K., 2004, *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Department of Microbiology Christian Medical College Vellore, Tamil Nadu.
- LANNAN, C.C., BARTHOLOMEW, J.L., FRYER, J.L., 1999, Rickettsial and Chlamydial Infections, In: *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. Edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, 0851991947.
- LARSEN, J.L., MELLERGAARD, S., 1984, Agglutination Typing of *Vibrio anguillarum* Isolates from Diseased Fish and from the Environment, *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1261-1265.
- LE BRETON, A.D., 1999, Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19(6), 250-253.
- LEIBNIZ INSTITUTE DSMZ, 2012, - *Bacterial Nomenclature up to date (Approved Lists, Validation Lists*, [online], Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Germany, <http://www.dsmz.de/> [Ziyaret Tarihi: 12 Nisan 2012].

- LEONG, T.S., COLORNI, A., 2002, Infectious Diseases of Warmwater Fish in Marine and Brackish Waters. In: *Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture*, Edited by P.T.K. Woo, D.W., Bruno, L.H.S. Lim, CABI Publishing Series, 0851994431, 9780851994437.
- LIU, P.C., LIN, J.Y., CHUANG, W.H., LEE, K.K., 2004, Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 495–499.
- LÓPEZ, J.R., ROCA E., NÚÑEZ, S., HERRAN, R., NAVAS, J.I., MANCHADO, M., HERRERA, M., TORANZO, A.E., 2009, Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 84, 209–217.
- LPSN, 2012, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN), [online] <http://www.bacterio.cict.fr/>, [Ziyaret Tarihi: 13 Nisan 2012].
- MARSHALL, S., HEATH, S., HENRÍQUEZ, V., ORREGO, C., 1998, Minimally Invasive Detection of *Piscirickettsia salmonis* in Cultivated Salmonids via the PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(8), 3066.
- MARTINEZ-PICADO, J., BLANCH, A.R., JOFRE, J., 1994, Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 732.
- MCINTOSH, D., MEADEN, P.G., AUSTIN, B., 1996, A Simplified PCR-Based Method for the Detection of *Renibacterium salmoninarum* Utilizing Preparations of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Lymphocytes, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 3929–3932.
- MCPHERSON, M.J., MØLLER, S.G., 2006, *PCR*, Taylor & Francis, 0415355478, 9780415355476.
- MEMBERS OF THE SFM ANTIBIOGRAM COMMITTEE, 2003, Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie report 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21, 364–391.
- MILLER, R.W., CHAPMAN, W.R., 1976, Epistylis and *Aeromonas Hydrophila* Infections in Fishes from North Carolina Reservoirs, *The Progressive Fish-Culturist*, 38(3).
- MINDLIN, S.Z., SOINA, V.S., PETROVA, M.A., GORLENKO, Z.H.M., 2008, Isolation of Antibiotic Resistance Bacterial Strains from Eastern Siberia Permafrost Sediments, *Russian Journal of Genetics*, 44, 36–44.

- MIYATA, M., INGLIS, V., AOKI, T., 1996, Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction, *Aquaculture* 141,13–24.
- NAKAYAMA, T., ITO, E., NOMBRA, N., MATSUMURA, M., 2006, Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimps farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.*, 258, 194-199.
- NAM, Y., CHANG H., PARK, J.R., KWON, H., QUAN, Z., PARK, Y., LEE, J., YOON, J., BAE J., 2007, *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 12–18.
- NASCIMENTO, A.M.A., 2011, Use of the rRNA operon and Genomic Repetitive Sequences for the Identification of Bacteria. In: *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, Edited by F.J. de Bruijn, John Wiley & Sons, 1118010442, 9781118010440.
- NELSON, E.J., GHIOSE, W.C., 1999, Isolation and identification of *Pseudoalteromonas piscicida* strain Cura-d associated with diseased damselfish (Pomacentridae) eggs, *Journal of Fish Diseases*, 22, 253-260
- NEWTON, C.R., GRAHAM, A., 1994, *PCR*, BIOS Scientific Publishers Limited, 1 872748 82 1.
- NOGA, E.J., 2010, *Fish Disease: Diagnosis and Treatment* (Cilt Second Edition). Singapore: Blackwell Publishing.
- NOGUEROLA, I., BLANCH, A.R., 2007, Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys, *Journal of Applied Microbiology*, 105, 175-185.
- OSORIO, C.R., COLLINS, M.D., TORANZO, A.E., BARJA, J.L., ROMALDE, J.L., 1999, 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis, *Appl Environ Microbiol*, 65:2942–2946.
- OTTO, M., 2004, Virulence Factors of The Coagulase-Negative Staphylococci, *Frontiers in Bioscience*, 9, 841-863.
- PATEL, S., YATES, M. & SAUNDERS, N. A., 1997, PCR-enzymelinked immunosorbent assay and partial rRNA gene sequencing: a rational approach to identifying mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2375–2380.
- PACHA, R.E., KIEHN, E.D., 1969, Characterization and Relatedness of Marine Vibrios Pathogenic to Fish: Physiology, Serology, and Epidemiology, *Journal of Bacteriology*, 100(3), 1242-1247.

- PATEL, S., YATES, M., SAUNDERS, N.A., 1997, PCR-enzymelinked immunosorbent assay and partial rRNA gene sequencing: a rational approach to identifying mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.*, 35: 2375–2380.
- PAZOS, F., SANTOS, Y., MAGARINOS, B., BANDIN, I., NUNEZ, S., TORANZO, A.E. 1993, Phenotypic Characteristics and Virulence of *Vibrio anguillarum*-Related Organisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 2969-2976.
- PEDERSEN, K., KUHN, I., SEPPANEN, J., HELLSTROM, A., TIAINEN, T., RIMAILA-PARNANEN, E., LARSEN, J.L. 1999, Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 337–347.
- PEDERSEN, K., TIAINEN, T., LARSEN, J.L., 1995, Antibiotic resistance of *Vibrio anguillarum*, related to serovar and plasmid contents, *Acta Vet. Scand.* 36, 55–64.
- PEDERSEN, K., VERDONCK, L., AUSTIN, B., AUSTIN, D.A., BLANCH, A.R., GRIMONT, P.A.D., JOFRE, J., KOBLAVI, S., LARSEN, J.L., TIAINEN, T., VIGNEULLE, M., SWINGS, J., 1998, Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* is a junior synonym of *Vibrio harveyi*, *International Journal of Systemic Bacteriology*, 48, 749-758.
- PELT-VERKUIL, E.V., BELKUM, A.V., HAYS, J.P., 2008, *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, Springer, 1402062400, 9781402062407.
- PONDER, M.A., GILMOUR, S.J., BERGHOLZ, P.W., MINDOCK, C.A., HOLLINGSWORTH, R., THOMASHOW, M.F., TIEDJE, J.M., 2005, Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria, *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 103–115.
- REDDY, G.S.N., PRAKASH, J.S.S., PRABAHAR, V., MATSUMOTO, G.I., STACKEBRANDT, E., S. SHIVAJI, 2003, *Kocuria polaris* sp. nov., an orange-pigmented psychrophilic bacterium isolated from an Antarctic cyanobacterial mat sample, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 183–187.
- REED, P. A., FRANCIS-FLOYD, R., 1996, *Vibrio* Infections of Fish [online], University of Florida Ifas extension. *University of Florida, Institue of Food and Agricultural Sciences* , [Ziyaret Tarihi: 20 Nisan 2011].
- RHODES, L.D., RHODES, W.B., STROM, M.S., 1998, Sensitive detection of *Renibacterium salmoninarum* in whole fry, blood, and other tissues of Pacific salmon by reverse transcription-polymerase chain reaction, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7, 270–279.
- RINGØ, E., SPERSTAD, S., MYKLEBUST, R., REFSTIE, S., KROGDAHL, A., 2006, Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal, *Aquaculture*, 261, 829–841.

- RINGØ, E., VADSTEIN, O., 1998, Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *J. Appl. Microbiol.* 84, 227–233.
- RODGERS, C.J., 2003, The Risks Associated With The Use of Veterinary Drugs and Chemicals in Aquaculture: and Control. *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture*, Advanced Seminar, İzmir, Turkey, 21-23 May, International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza, Food and Agriculture Organization of the United Nations Fisheries Department, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of Turkey, Turkish Fisheries Foundation.
- SANDERS, J.E., FRYER, J.L., 1980, *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of Bacterial Kidney Disease in Salmonid Fishes, *International Journal of Systemic Bacteriology*, 30(2), 496-502.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- SARJITO, RADJASA, O. K., SABDONO, A., PRAYITNO, S. B., & HUTABARAT, S., 2009, Phylogenetic Diversity of the Causative Agents of Vibriosis Associated with Groupers Fish from Karimunjawa Islands, Indonesia. *Current Research of Bacteriology*, 2 (1), 14-21.
- SAVAŞ, H., ALTINOK, I., ÇAKMAK, E., FİRİDİN, S., 2006, Isolation of *Renibacterium salmoninarum* from cultured Black Sea salmon (*Salmo trutta labrax*): first report in Turkey, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 26(6), 238.
- SAVINI, V., CATAVITELLO, C., MASCIARELLI, G., ASTOLFI, D., BALBINOT, A., BIANCO, A., FEBBO, F., D'AMARIO, C., D'ANTONIO, D., 2010, Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*, *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1395–1402.
- SAWABE, T., MAKINO, H., TATSUMI, M., NAKANO, K., TAJIMA, K., IQBAL, M.M., YUMOTO, I., EZURA, Y., CHRISTEN, R., 1998, *Pseudoalteromonas bacteriollica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 769-774.
- SATYANARAYANA, K., 2009, Detection of Antimicrobial Resistance in Common Gram Negative and Gram Positive Bacteria Encountered in Infection Diseases – An Update, *ICMR Bulletin*, 49(1-3).
- SCHIEWE, M. H. , TRUST T. J. ve CROSA, J. H., 1981, *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish, *Current Microbiology*, 6, 343-348.
- SCHNICK, R.A., 2001, International harmonization of antimicrobial sensitivity determination for aquaculture drugs, *Aquaculture* 196, 277–288.

- SECHI, L.A., COLORNI, A., DUPRE, I., MOLICOTTI, P., FADDA, G., ZANETTI, S., 2002, Strain variation in Mediterranean and Red Sea *Mycobacterium marinum* isolates, *Microbiologica*, 25, 351-356.
- SENG, L.T., COLORNI, A., 2002, Infectious Diseases of Warmwater Fish in Marine and Brackish Water. In: *Diseases and disorders of finfish in cage culture* Edited by Woo, P. T. K., Bruno, D.W., Lim, L.H.S., *CABI Publishing Series*, 0851994431, 9780851994437.
- SENTOMER, 2012, DNA Dizileme [Online], http://www.sentromer.com/page_dizileme_tr.php [Ziyaret Tarihi: 18 Şubat 2012].
- SHARIFUZZAMAN, S.M., ABBASS, A., TINSLEY, J.W., AUSTIN, B., 2011, Subcellular components of probiotics Kocuria SM1 and Rhodococcus SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, 30, 347-353.
- SHIELDS, R.J., 2001, Larviculture of marine finfish in Europe, *Aquaculture*. 200: 55-88.
- SKOVHUS, T.L., RAMSING, N.B., HOLMSTRÖM, C., KJELLEBERG S., DAHLLÖF, I., 2004, Real-Time Quantitative PCR for Assessment of Abundance of *Pseudoalteromonas* Species in Marine Samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2373-2382.
- SMITH, P., HINEY, M.P., SAMUELSEN, O., 1994, Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning, *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 273-313.
- SMITH, P., 2008, Antimicrobial resistance in aquaculture, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 27(1), 243-264.
- SOFFIENTINO, B., GWALTNEY, T., NELSON, D.R., SPECKER, J.L., MANUEL, M., GÓMEZ-CHIARRI, M., 1999, Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture, *Dis. Aquat. Org.*, 38, 201-210.
- SORENSEN, U.B.S., LARSEN, J.L., 1986, Serotyping of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51(3), 593-597.
- STACKEBRANDT, E., KOCH C., GVOZDIK, O., SCHUMANN, P., 1995, Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermaococcus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4), 682-692.
- SUAU, A., BONNET, R., SUTREN, M., GODON, J., GIBSON, G. R., COLLINS, M. D. ve DORE, J., 1999, Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from

Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4799–4807.

SUN, Y.Z., YANG, H.L., MA, R.L., ZHANG, C.X., LIN, W.Y., 2011, Effect of dietary admistiration of *Psychrobacter* sp. on the growth, feed utilization, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*, *Aquaculture Nutrition*, 17, e733-e740.

ŞAHRİKOĞLU, L., CANDAN, A., 2002, A Research on *Aeromonas hydrophila* Infection in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Istanbul University, 14, 59-70.

ŞEN, E., 2007, *Levrek (Dicentrarchus labrax L.1758) Balıklarında Flexibacter maritimus Eenfeksiyonu Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

TANRIKUL, T.T., ÇAĞIRGAN, H. 2001, Doğadaki Kefal Balıklarında Görülen Pasteurellosis Salgını, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, (3-4), 509 – 512.

TARIM VE ZİRAAT BİLGİ BANKASI, 2011, *Su Ürünleri*, http://www.tarimziraat.com/su_urunleri/ [Ziyaret Tarihi: 21 Nisan 2012].

TENDENCIA, E. A, 2002, *Vibrio harveyi* isolated from cage cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines, *Aquaculture Research*, 33, 455–458.

TEUBER, M., MEILE, L., SCHWARZ, F., 1999, Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76,1-4, 115-137,

THOMPSON, F. L., THOMPSON, C. C., LI, Y., GOMEZ-GIL, B., VANDENBERGHE, J., HOSTE B.,VE J., SWINGS, 2003a, *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 753–759

THOMPSON, F. L., LI, Y., GOMEZ-GIL, B., THOMPSON, C. C., HOSTE, B., VANDEMEULEBROECKE, K. RUPP, G. S., PEREIRA, A., DE BEM, M. M., SORGELOOS, P., SWINGS, J., 2003b, *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 245–252

THOMPSON, F. L., THOMPSON, C. C., SWINGS, J., 2003c, *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.), *System. Appl. Microbiol.* 26, 65–69

THOMPSON, F. L., THOMPSON, C. C., HOSTE, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M., Swings, J., 2003d, *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1495–1501

- THOMPSON, F.L., GOMEZ-GIL, B., VASCONCELOS, A.T.R., SAWABE, T., 2007, Multilocus Sequence Analysis Reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are Distinct Species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(13), 4279–4285.
- TISON, D. L., NISHIBUCHI, M., GREENWOOD, J. D., SEIDLER, R. J., 1982, *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 640–646.
- TİMUR, G., AKAYLI, T., 2003, *First Study of Staphylococcosis in Farmed Rainbow Trout*. International Symposium of Fisheries and Zoology (in memory of Ord. Prof. Dr. Curt KOSSWIG in His 100th Birth Anniversary) Istanbul University Fisheries and Zoology Faculty, 23-25 October, Istanbul, 67-79.
- TİMUR, G., TİMUR, M., 1991, An Outbreak of Enteric Redmouth Disease in Farmed Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 11, 181-182.
- TİMUR, G., KARATAŞ, S., ÇOLAK, S., AKAYKI, T., 1999, A Study on Fish Frunculosis of Young Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* L.), Istanbul University, *Journal of Aquatic Products*, Special Issue, 461-467.
- TİMUR, G., KORUN, J., 2004, First Outbreak of Vibriosis in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Istanbul University Journal of Aquatic Sciences*. 18, 1-9.
- TİMUR, G., TİMUR, M., KORUN, J., 2004, A Study on the Outbreak of *Flavobacterium psychrophilum* Infection in a Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hatchery in Turkey. *Istanbul University Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 17, 21-27.
- TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T. KORUN, J., 2007, Survey Study of Pathologies Affecting Farmed Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) and Marine Cultured Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* in Turkey, 13th International Conference of the EAAP “Diseases of Fish and Shellfish”, Grado-Italy, 17/22 September.
- TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T. KORUN, J., ERKAN, M., 2011, First Occurrence of Erythrocytic Inclusion Body Syndrom in Marine Reared Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bamidgeh*, 63, 1-8.
- TİMUR, G., TİMUR, M., 2003, *Balık Hastalıkları*, İstanbul Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi, ISBN: 975-404-699-9.
- TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T., KORUN, J., ERKAN, M., 2008, The first observation of viral erythrocytic infection associated with pathogenic bacteria and some ectoparasites in cultured Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Turkey, *Bulletin of the European association of Fish Pathologists*, 28(2), 58-65.

- TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T., KORUN, J., THOMPSON, K.D., 2005, First observation of rickettsia- like organisms in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 25(5), 196.
- TİMUR, G., TİMUR, M., KARATAŞ, S., AKAYLI, T., 1999, Ichthyophonus hoferi ile infekte olmuş kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) görülen pasteurellosis hastalığı üzerine bir çalışma. *İst. Üniv. Su Ürün. Dergisi*, Özel sayı 443 – 447.
- TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T., KORUN, J., ERKAN, M., 2008, The first observation of viral erythrocytic infection associated with pathogenic bacteria and some ectoparasites in cultured Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 28(2), 57-64.
- TOPAL SARIKAYA, A., 2008, DNA'nın İzolasyonu ve Analizi, In: *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Edited by G. Temizkan, N., Arda, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- TORANZO, A.E., BAYA, A.M., ROBERSON, B.S., BARJA, J.L., GRIMES, HETRICK, F.M., 1987, Specificity of Slide Agglutination Test for Detecting Bacterial Fish Pathogens, *Aquaculture*, 61, 81-97.
- TORANZO, A.E., BARJA, J.L., 1990, A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain, *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 73-82.
- TORANZO, A.E., BARREIRO, S., CASAL, J.F., FIGUERAS, A., B. MAGARIFIOS, BARJA, J.L., 1991, Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) : first report in Spain, *Aquaculture*, 99, 1-15.
- TORANZO, A.E., BEATRIZ, M., ROMALDE, J.L., 2005, A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture*, 246, 37 – 61
- TREVES-BROWN, K.M., 2000, *Applied Fish Pharmacology 3. cilt/Aquaculture Series*, Springer, 0412621800, 9780412621802.
- TUİK, 2010, Su Ürünleri İstatistikleri, *Türkiye İstatistik Kurumu*, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?tb_id=47&ust_id=13 [Ziyaret Tarihi: 20 Nisan 2011].
- TUİK., 2011, *Su Ürünleri İstatistikleri* [online], Türkiye İstatistik Kurumu, www.tuik.gov.tr [Ziyaret tarihi: 11 Mayıs 2012]
- TURGAY, E., 2009, *Kültür Balıklarında Görülen stafilokokkal Enfeksiyonlar Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- TURGUT NEARY E., DEVELİ N., AKINLAR YÜKSEL S., 2008, Su Ürünleri Yetistirciliğinde Kullanılan Asılar, *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(2), 29-35.

- TÜGEM, 2011, *Su Ürünleri*, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü [online] <http://www.tugem.gov.tr/> [Ziyaret Tarihi: 21 Nisan 2012].
- UCKO, M., COLORNI, A., KVITT, H., DIAMANT A., ZLOTKIN, A., KNIBB, W.R., 2002, Strain Variation in *Mycobacterium marinum* Fish Isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5281-5287.
- ÜSTEK, D., ABACI, N., SIRMA, S., ÇAKİRİS, A., 2011, Yeni nesil DNA dizi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, 1(1), 11-18.
- VILLAMIL, L., FIGUERAS, A., TORANZO, A. E., PLANAS, M., NOVOA, B., 2003, Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae, *Journal of Fish Diseases*, 26, 5, 293–303
- WAKABAYASHI, H., HIKIDA, M., MASUMURA, K., 1986. *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 36, 396-398.
- WANG, Y., LEUNG, P.C., QIAN, P.-Y., GU, J.-D., 2006, Antibiotic resistance and plasmid profile of environmental isolates of *Vibrio* species from Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. *Ecotoxicology*, 15, 371–378.
- WHITMAN, K. A. (2004). *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual Techniques and Procedures*. Iowa: Iowa State Press A blackweel Publishing Company.
- YAMAN, F., SEÇER, S., HALKMAN, A.K., 2003, Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarında Vibriosiz ve Pasteurellosis'in Araştırılması. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(2), 1-36.
- YARDIMCI, R. E., 2011, *Kültür levrek balıklarında (Dicentrarchus labrax L.) tenacibaculum maritimum'un identifikasyonunda diyagnostik tekniklerinin karşılaştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ZHOU, J., FANG, W., YANG, X., ZHOU, S., HU, L., LI, X., QI, X., SU, H., XIE, L., 2012, A Nonluminescent and Highly Virulent *Vibrio harveyi* Strain Is Associated with “Bacterial White Tail Disease” of *Litopenaeus vannamei* Shrimp, *Plos one open access*, 7(2), e29961.
- ZIFENG, W., TIAN, X., SHAOJUN P., MIN, L., HAIDONG, Y., 2009, Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27, 3, P. 487-492.
- ZLOTKIN, A., ELDAR, A., GHITTINO, C., BERCOVIER, H., 1998, Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 36: 983–985.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Kadıköy’de doğdum. İlkokul, ortaokul ve liseyi İstanbul’da okudum. 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesini kazandım. 2004 yılında Padi Advanced Open Water Diver dalıcı brövesi aldım. 2006 yılında İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı Başkanlığı tarafından düzenlenen sertifika programlarına katılarak Hijyen ve Kalite Sertifikası ile HACCP Sertifikası aldım. 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Balık Hastalıkları Laboratuvarında öğrenci asistanlık yaptım. 2010 yılında yüksek lisansım devam ederken bir yıl kadar sistem, ürün ve personel belgelendirmesi üzerine özel bir firmada Su Ürünleri Belgelendirme Uzmanı olarak çalıştım. Yabancı dilim ingilizcedir.