

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Vibrio anguillarum* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL
DUYARLILIĞI VE PLAZMİD İZOLASYONU**

Nihan GÜNLÜ

**Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2013**

© 2013 [Nihan GÜNLÜ]

TEZ ONAYI

Nihan GÜNLÜ tarafından hazırlanan "*Vibrio anguillarum* suşlarının antimikrobiyal duyarlılığı ve plazmid izolasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman	Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY Süleyman Demirel Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Seçil METİN Süleyman Demirel Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY Süleyman Demirel Üniversitesi	

Enstitü Müdürü	Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN	
-----------------------	--	-------

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Nihan GÜNLÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. <i>Vibrio anguillarum</i> 'un Özellikleri.....	4
2.1.1. Morfolojik ve kültürel özellikleri.....	4
2.1.2. Fenotipik özellikleri	5
2.2. Vibriosisin Teşhisi ve Tedavisi.....	5
2.3. Antibiyotikler.....	7
2.3.1. Antimikrobiyal direnç	8
2.3.1.1. Fenotipik (doğal) direnç.....	8
2.3.1.2. Kalıtsal (kazanılmış) direnç.....	9
2.3.2. Akuakültürde antibiyotiklerin kullanımı.....	9
2.4. Plazmidler.....	11
2.4.1. Plazmid çeşitleri.....	13
2.4.1.1. F faktörü.....	13
2.4.1.2. Col plazmidleri.....	13
2.4.1.3. <i>Staphylococcus</i> plazmidleri.....	13
2.4.1.4. Virulens plazmidleri.....	14
2.4.1.5. R plazmidleri.....	14
2.4.2. Akuakültürde plazmid kaynaklı antimikrobiyal dirençlilik.....	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. <i>V. anguillarum</i> suşları.....	21
3.1.2. Kullanılan Besiyerler.....	21
3.1.3. Plazmid izalasyonu ve agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler.....	22
3.1.3.1. Plazmid izolasyon kiti.....	22
3.1.3.2. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler	22
3.1.4. Kullanılan ticari antibiyotik diskleri	23
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Suşların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi.....	24
3.2.1.1. Geleneksel bakteriyolojik testlerin kullanımı	24
3.2.1.2. API 20 E testi	25
3.2.3. Antimikrobiyal hassasiyet testleri.....	25
3.2.3.1. Disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi.....	25
3.2.3.2. ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi.....	26
3.2.4. <i>V. anguillarum</i> suşlarından plazmidlerin izolasyonu.....	26
3.2.5. Agaroz jelin hazırlanması ve örneklerin jele uygulanması.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28

4.1. Suşlarının Fenotipik Özelliklerine Ait Bulgular	28
4.2. Suşlarının Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Çıkarılması.....	31
4.3. Plazmid Profillerinin Analizi.....	35
4.4. Suşların plazmid profili ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki.....	36
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	37
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Vibrio anguillarum* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞI VE PLAZMİD İZOLASYONU**

Nihan GÜNLÜ

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**

Danışman: Prof.Dr. Ayşegül KUBİLAY

Vibrio anguillarum, akuakültür ortamlarında çok yaygın bulunan ve çok sayıda salgınlara neden olan patojenik *Vibrio* türlerinin en önemlilerinden birisidir. Bu çalışmada, ülkemiz balık işletmelerinden izole edilen *V. anguillarum* suşlarında oluşan antimikrobiyal direncin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kültür balıklarından izole edilen 11 suş ve 1 referans suşun tamamının fenotipik özellikleri; geleneksel mikrobiyolojik ve API 20 E testleri kullanılarak belirlenmiştir.

V. anguillarum suşlarında antimikrobiyal duyarlılığı belirlemede, Muller-Hinton Agarda disk difüzyon (22 antibiyotik) ve ATB VET (Biomerieux 14 289, 28 antibiyotik) strip sistemi kullanılmıştır.

Disk difüzyon methodu sonuçlarına göre, *V. anguillarum* suşlarının klindamisin, oksasilin ve linkomisine dirençli olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bütün suşlar, gentamisin, kanamisin, enroflaksasin, rifamisin, florfenikol, tobramisin, ciproflaksin ve trimethoprine duyarlı olduğu saptanmıştır.

ATB VET sonuçlarına göre eritromisin, penisilin, linkomisin, amoksilin, pristnamisin, amoksoklav, tiylosin, oksasilin, kolitsin, sephalotin, sefaperazon, sulfamethizol, streptomisin ve metronidazola direnç olduğu belirlenmiştir. Kontrimazol, flumequin ve enroflaksasine tüm suşların duyarlı olduğu görülmüştür.

Vibrio anguillarum suşlarının plazmidleri izole edilerek her suşa ait plazmid profili agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. İncelenen 12 suşun hepsinde 1-3 arasında değişen sayıda plazmid DNA'sına rastlanılmış ve molekül ağırlıkları 0,4-33 kb arasında hesaplanmıştır. 16 kb molekül ağırlığındaki plazmid DNA'sı çalışılan tüm suşlarda, 33 kb molekül ağırlığındaki plazmid DNA'sı 4 suşta, 3 kb molekül ağırlığındaki plazmid DNA'sı 3 suşta ve 0,4 kb molekül ağırlığındaki plazmid DNA'sı ise 4 suşta tespit edilmiştir. 12 suş ve 1 referans suşta 0,4-16 kb aralığındaki boyutta 1-3 plazmid bulunmuştur.

Çalışma sonuçlarımıza göre, tüm suşlarda 16 kb'da gözlenen plazmidin *V. anguillarum*'da çoklu antibiyotik direnci gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, akuakültürde balık hastalıklarının tedavisinde aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucunda bakterilerdeki antimikrobiyal direnc yaygın olarak ortaya çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Vibrio anguillarum*, antibiyotik , bakteriyel direnç, agaroz jel elektroforez, plazmid

2013, 50 Sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES AND PLASMID ISOLATION OF *Vibrio anguillarum* STRAINS

Nihan GÜNLÜ

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Aquaculture**

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Vibrio anguillarum is one of the most widely recognized pathogenic *Vibrio* species due to numerous outbreaks and its' wide occurrence in aquaculture environment. Aims of the present study were to determine of the occurrence of resistance to antimicrobials of *V. anguillarum* strains that has been isolated from cultured fish species in Turkey. A total of 11 *V. anguillarum* isolated from farmed fish and 1 reference strain were examined in terms of phenotypic characteristic. Conventional microbiological and API 20 E tests were used to determined the phenotypic characteristics of *V. anguillarum* strains.

The to disk diffusion (22 antibiotics) in Muller-Hinton agar and ATB VET (Biomerieux 14 289, 28 antibiotics) strip system were used for determined the antimicrobial susceptibility of *V. anguillarum* strains.

According to disk diffusion method results were resistant to clindamisin, oxacillin and lincomycin of *V. anguillarum* strains. Also, all strains were susceptible to gentamicin, kanamycin, enrofloxacin, rifampicin, florfenicol, tobramycin, ciprofloxacin and trimethoprim.

According to ATB VET results were resistant to erythromycin, penicilin, lincomycin, amoxycillin, pristinamycin, amox-clav.ac, tylosin, oxacillin, colistin, cephalothin, cefoperazon, sulfamethizol, streptomycin and metronidazol. All strains were susceptible to contrimoxazol, flumequin, oxolinic acid and enrofloxacin.

Plasmids of *V. anguillarum* strains were isolated and plasmid profiles of each strain was determined by agarose gel electrophoresis. The isolated strains were screened for plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. 11 strains and 1 reference strain have been found to 1 – 3 plasmids, with sizes ranging from 0,4 – 33 kb. According to our results, 16 kb plasmid seems in the all strains to be responsible from the development of multiple antibiotic resistance in *V. anguillarum*. Our study reveals that the antibiotic-resistant bacteria are

widespread in the aquaculture due to fish disease treatment used for serious antibiotic.

Keywords: *Vibrio anguillarum*, antibiotics, bacterial resistance, agarose gel electrophoresis, plasmid

2013, 50 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a, suşların identifikasyonu, tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının tespiti aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Seçil METİN'e, plazmid izalasyonu, agaroz jel elektroforezinin yapımı aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Gülgün TINAZ ve Yrd.Doç.Dr. Seyhan ULUSOY'a, suşların teminin de yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü'nden Dr. Eda YARDIMCI ve Su Ürünleri Mühendisi Can Okan GÜNAYDIN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin tüm aşamalarında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Yrd.Doç.Dr. Ali GÜNLÜ'ye de teşekkürlerimi bildiririm.

2103-YL-10 No'lu Proje ile maddi desteklerinden dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Nihan GÜNLÜ
ISPARTA, 2013

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Laktokok suşlarının plazmid içerikleri.....	18
Şekil 2.2. Bakteri plazmidlerindeki enzimatik değişimler.....	19
Şekil 4.1.TCBS agarda <i>V. anguillarum</i> 'un sarı renkli kolonilerinin görünümü (1 numaralı suş).....	29
Şekil 4.2. O/129 (Vibriostat) duyarlılık test sonucu (1 numaralı suş).....	29
Şekil 4.3. API 20 E test sonuçları (1 numaralı suş).....	29
Şekil 4.4. Disk diffüzyon testi sonucu (5 numaralı suş).....	31
Şekil 4.5. ATB VET sonucu (2 numaralı suş).....	32
Şekil 4.6. <i>V. anguillarum</i> suşlarının agaroz jelde plazmid profilleri	35
Şekil 4.7. <i>V. anguillarum</i> suşlarının agaroz jelde plazmid profilleri	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaç grupları...	10
Çizelge 2.2. Farklı O-serogrupları arasındaki <i>V. anguillarum</i> suşlarının plazmid profili	17
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>V. anguillarum</i> suşları.....	21
Çizelge 3.2. Disk difüzyon metodunda kullanılan antibiyotikler	23
Çizelge 3.3. ATB VET’de bulunan antibiyotikler.....	24
Çizelge 4.1. <i>Vibrio anguillarum</i> suşlarının fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular (25 °C’ de 24-48 saatlik inkübasyon).....	30
Çizelge 4.2. <i>V. anguillarum</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları.....	33
Çizelge 4.3. <i>V. anguillarum</i> için ATB-VET (14 289) kit sonuçları.....	34
Çizelge 4.4. Suşların plazmid profili ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHIA	Brain Heart Infusiyon Agar
TSA	Trypticase Soy Agar
TCBS	Tiyosülfat-Sitrat-Bile Sukroz Agar
LB buyyon	Luria-Bertoni buyyon
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit'in
TBE	Tris-Borik asit EDTA
GEL	Jelatin
GLU	Glukoz
MAN	Mannitol
INO	İnositol
SOR	Sorbitol
RHA	Rhamnoz
SAC	Sakkaroz
MEL	Mellobiyoz
AMY	Amigdalın
ARA	Arabinoz
NİT	Nitrit
VP	Voges proskauer

1. GİRİŞ

Su ürünleri çok önemli ve hızla gelişen bir sanayidir. Bu hızlı büyüme sürecinde çevresel etkileşimlerle birlikte bakteriyel, viral, fungal ve paraziter hastalıklarda da artış meydana gelmektedir. Kültür balıkçılığı yapılan işletmelerde görülen en önemli problemlerin başında infeksiyöz hastalıklar ile bunların yol açtığı sağlık sorunları ve ekonomik zararlar gelmektedir. Genel ve özel koruyucu önlemlerin tam, ciddi ve devamlı uygulanamadığı işletmelerde hastalık sorunu her zaman baş gösterecektir. Bazı özel durumlarda da konakçı, parazit ve çevre dengesinin korunmasına karşın yine de infeksiyonlara rastlanılabilmektedir. Kültür balıkçılığında çok sayıda balığın bir arada ve yakın temas halinde bulunması, doğada serbest yaşayanlara oranla daha fazla hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Böylece birinde çıkan infeksiyon, diğerine kolayca bulaşabilmekte ve kısa bir zaman dilimi içinde hastalık yayılarak genişlemektedir. Balıkların içinde yaşadıkları sucul ortamdaki optimal yaşam koşullarının olumsuz yönde değişmesi ile birçok infeksiyöz hastalık ortaya çıkmaktadır. Bu olumsuz faktörler balıkların bağışıklık sistemini zayıflatarak kolayca infeksiyonlara yakalanmasına sebep olurlar. Balıklarda görülen bir çok infeksiyonun, yüksek mortaliteye sebep olması nedeniyle balık işletmelerinin ekonomik kayıpları yüksek olmaktadır.

Balık yetiştiriciliğinde hastalığın önlenmesinde antibiyotiğin etkisi, tedavi sonrası oluşacak stres koşullarında infeksiyonun tekrarlaması sonucu sınırlanmakta ve antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Bu hastalıklara karşı işletmelerde hijyenik ve profilaktik tedbirler alınması gittikçe önem kazanmaya başlamıştır. İşletmelerde antibiyotikler ve kemoterapotik maddelerin aşırı kullanımı sonucu balık etinde ve çevre de istenilmeyen düzeyde kalıntıya yol açar ve balığın immün sistemini baskılayarak patojene karşı savunmasını zayıflatmaktadır (Lunden ve Bylund, 2002).

Hastalıkların koruma ve kontrolü ve aynı zamanda canlının büyümesini desteklemek amacıyla antibiyotik ve diğer kimyasal maddelerin kullanımında yoğun artış görülmektedir. Bu yoğun antibiyotik kullanımı, antibiyotiklere

dirençli mikroorganizmaların gelişmesine, sucul çevreye ve insan sağlığına zararlı etkileri ortaya çıkarabilmektedir (Barug vd., 2006). Avrupa Hayvan Sağlığı Federasyonunun yaptığı bir çalışmada 1999 yılında hayvansal üretim için kullanılan antibiyotik miktarı 4700 ton, insan tüketiminde 8500 ton olarak belirtilmiştir. Hayvansal üretimde kullanılan antibiyotiğin 3900 tonu hastalıkların tedavisinde, 786 tonu ise büyümeyi destekleyici olarak kullanılmıştır. Enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz bir şekilde kullanımı bakterilerde antibiyotiklere karşı dirençlilik gelişimine neden olmaktadır (Karayakar ve Ay, 2006). Bu nedenle yetiştiricilik sektörü sucul ekosistemi koruyarak hastalıkları kontrol etmeye ve antibiyotik kullanımını en aza indirmeye çalışmaktadır (Neary vd., 2008).

Antibiyotikler bilinçli olarak kullanılmadığında; zararlı etkileri (karsinojenik, allerjik), bakteriyel direnç gelişim, rezidü sorunu, çevre kirliliği, maliyet artışı, iş ve zaman kaybı gibi olumsuzluklara yol açarlar (Türk, 2008). Enfeksiyon hastalıklarında antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz bir şekilde kullanımı, bu antibiyotiklere karşı bakterilerde direnç gelişimine neden olmaktadır (Karayakar ve Ay, 2006). Antibiyotik kullanımı, immunosüpresyona sebep olmaktadır. Bu nedenle işletmelerde hastalıklardan korunmada en etkili yol; optimum yetiştiricilik şartlarının sağlanması, gerekli hijyenik ve profilaktik önlemlerin alınarak balıklarda hastalıkların ortaya çıkmasının engellenmesidir. Ancak işletmelerde yinede hastalık ortaya çıkması durumunda yapılabilecek tek şey antibiyogram sonuçlarına göre uygun kemoteropatik maddelerle tedavi uygulanmasıdır. Son yıllarda su ürünleri sektöründe hastalıklara karşı yoğun antibiyotik kullanımı nedeniyle herhangi bir hastalığa karşı önceden etkili olan bir antibiyotiğin bu hastalığa etki etmemesi balıklarda da antimikrobiyal dirençlilik geliştiğini göstermektedir.

Antibiyotik çağından önce izole edilip saklanan bakterilerde direnç faktörlerinin bulunmadığı ve bugün pratikte kullanılan hemen hemen tüm antibiyotiklere bu bakterilerin duyarlı oldukları kanıtlanmıştır (Doğancı, 2001). Bakteriler çevresel değişikliklere çok çabuk cevap verebildiklerinden, bu yetenekleri sucul ekosistemde köklü değişikliklere yol açabilmektedir (Giuliano, 2003). Bu

özellikleri geliştirilen her yeni antibiyotiğe direnç geliştirebilmelerine de yol açmakta ve infeksiyonlarla mücadelede en önemli engel olan antibiyotiklere direnç sorunu ortaya çıkmaktadır (Vahaboğlu, 2004). Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir (Akçam vd., 2004). Günümüzde klinik önemi bulunan bakterilerde antibiyotik dirençliliği ile ilgili 100'den fazla gen bulunduğu bilinmektedir. Bir diğer yönden dirençlilik yayılabilir bir özelliktir ve oluştuktan sonra, büyük bir hızla sadece aynı tür ve cinsler içinde değil, plazmid ve transpozonlar gibi aktarılabilir genetik materyallerle diğer bakterilere de geçebilmektedir (Doğancı, 2001).

Bu çalışma ile hem denizel hemde tatlı su ortamlarındaki yetiştiriciliği yapılan balık türlerin de sık görülen ve önemli ekonomik kayıplara sebep olan *Vibrio anguillarum*'un farklı suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı gösterdikleri duyarlılık derecelerinin ve direnç belirlenen suşlardaki direnç plazmidlerinin tespiti amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Vibrio anguillarum*'un Özellikleri

V. anguillarum, Vibrionaceae familyasında, Gram negatif, virgül şeklinde çubuk şekilli bir bakteridir. Halofilik özellikli olup doğal ve kültürü yapılan deniz balıkları, tatlı su balıkları ve diğer akuatik hayvanlarda vibriosis veya hemarojik sepsisemiye neden olmaktadır (Rodkhuma vd., 2005). Vibriosis, kültürü yapılan balıklarda stres şartları altında özellikle stoklamanın yoğun ve kötü su kalitesinin bir arada bulunduğu durumlarda ciddi ekonomik kayıplar oluşturmaktadır (Noga, 2000; Peggy ve Francus- Floyd, 2002).

2.1.1. Morfolojik ve kültürel özellikleri

Vibrio cinsi Gram (-), 0,5-1,5 µm büyüklüğünde düz veya hafif kıvrık virgül şeklinde çubukları içermektedir. Bakteri spor ve kapsül oluşturmeyen, aerobik veya fakültatif anaerobik özelliğe sahiptir. Tek polar flagellumları ile hareket ederler (Austin ve Austin, 1999). Asit-fast değildirler. Sitokram oksidaz pozitif, fermantatif, Novobiosin ve Vibriostat 0/129 testine duyarlı halofilik bir bakteridir. Karbonhidratları fermente edebilir fakat gaz üretmezler. Kanlı agarda hemolitikler (Akaylı, 2001; Austin ve Austin, 2007).

Vibrio türlerinin izolasyonunda, hasta balıkların iç organlarından % 0,5-3,5 tuz ilave edilmiş Brain Heart Infüzyon Agar (BHIA), Nutrient agar, Trypticase Soy Agar (TSA) ve Tiyosülfat-Sitrat-Bile Sukroz Agar (TCBS) gibi seçici besiyeri kullanılmaktadır. *V. anguillarum* Trypticase Soy Agar (TSA)'da 22 °C'de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra kabarık sarımsı, kahverengi, 3-4 mm çapında yuvarlak ve mat koloniler oluşturur (Austin ve Austin, 1999; Balebona vd., 1998; Noga, 2000; Akaylı, 2001; Timur ve Timur, 2003; Ekici 2010). TCBS agar üzerinde ise sarı renkli koloniler oluşturmaktadır (Austin ve Austin, 1999). *Vibrio spp.* büyümesi için gerekli olan ideal şartlar; 20-22 °C'de 2-7 günlük inkübasyon süresidir. Bu bakteri 5 °C'de büyüyebilirken, 37 °C'de nadiren büyümektedir (Austin ve Austin, 1999).

Vibrio spp. ilk izolasyonunda besiyerlerine % 1-3 konsantrasyonunda tuz veya deniz suyu katılması tavsiye edilmektedir. Türlerin tuz toleranslarında farklılık olması identifikasyonda yol göstericidir (Austin ve Austin, 1999). *V. anguillarum* optimum tuz isteği % 1,5-3,5'tur. Bakterinin birçok suşu % 7'lik tuz yoğunluğuna dayanabilirken, % 10'da yaşayamazlar. Bazı suşları ise % 0,5 tuz ilaveli ortamlarda güçlükle büyümektedir (Austin ve Austin, 1999; Buller, 2004).

2.1.2. Fenotipik özellikleri

Vibrio anguillarum'un fenotipik özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda sitokram oksidaz, katalaz, β galaktosidaz, sitrat kullanımı ve Voges Proskauer pozitif, O/F testi fermentatif, Vibriostat, O/129 testine duyarlı olduğu bulunmuştur (Arda vd., 2002; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007; Akşit ve Kum 2008; Noguerola ve Blanch, 2008; Ekici 2010). Ayrıca *V. anguillarum*'un şekerleri kullanımı ve NaCl'de üreyebilme özellikleri suşlara göre değişiklik gösterdiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

2.2. Vibriosisin Teşhis ve Tedavisi

Vibriosis çoğunlukla deniz ve östarin, daha seyrek olarak da tatlısu balıklarında *Vibrio* genusu bakterilerin neden olduğu sistemik bakteriyel bir enfeksiyondur (Toranzo vd., 1982; Guerin-Faubleee vd., 1995). Vibriosis hemen hemen tüm dünyada kültür balıkçılığı yapan işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olan bulaşıcı bir hastalıktır.

Etken Vibrionaceae familyasına ait *Vibrio* türlerinden olup, en önemli türü *V. anguillarum*'dur (Reed ve Francis-Floyd, 2013; Arda vd., 2002; Toranzo vd., 2005).

Vibriosis hastalığı etkeni olan *V.anguillarum* günümüzde 50'den fazla balık türünde hastalığa neden olmaktadır. Bu bakteri hastalığın dominant türü olmasına rağmen diğer vibrio türleri de vibriosiste rol oynamaktadır (Tanrıku vd., 1996).

Hastalığın inkubasyon süresi doğal koşullar altında 7-10 gün olup klinik belirtileri balıklardaki diğer pek çok bakteriyel hastalığa benzerlik gösterebilmektedir. Hastalık genellikle letarji, iştah kaybı, suyun yüzeyine yakın bulunma veya yüzeysel yüzme ile başlar, hemorajiler ve şişkin karaciğer dokusunun geliştiği, ilerlediğinde deride matlık, kırmızı ve ölü (nekrotik) alanların şekillendiği, oluşan lekelerin yüzgeç ve ağız çevresinde yaygınlık gösterdiği dikkati çeker. Hastalık sistemik seyrettiğinde ekzoftalmusun geliştiği, bağırsak ve rektumun kanlandığı ve sıvıyla dolduğu görülür (Arda vd., 2002).

Hastalığa neden olan *Vibrio* suşlarının izolasyonu enfekte balığın karaciğer, dalak ve böbreğinden, vücut yüzeyindeki ülserlerden ekimler yapılarak gerçekleştirilir. Bu ekimler Tryptik Soy Agar (TSA), Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar (TCBS), Nutrient Agar (NA), Kanlı Agar, Alkali Pepton Water (APW) ve Brain Heart Infusion Agar (BHIA) kullanılarak yapılır. Vibrioların izolasyonu için TCBS agar selektif bir ortam olarak tanımlanmıştır Patojen, enfekte olmuş organlardan TCBS agarda saf kültürü yapılarak izole edilir. Laboratuvar şartlarında büyüme, 22 °C' de 24-36 saat arasında gerçekleşmektedir. *V. anguillarum* TSA üzerinde 22 °C'de 1-2 günlük inkübasyondan sonra kabarık, sarımsı-kahverengi, 3-4 mm çapında yuvarlak ve mat koloniler oluşturur. Vibrioların izolasyonunda kullanılan TCBS agar üzerinde *V.anguillarum* sarı renkli koloniler oluşturmaktadır (Austin ve Austin, 2007).

Balıklarda vibriosisin tedavisinde antimikrobiyal maddeler, dezenfektanlar ve kemotöropatikler kullanılmaktadır. Uygun bir dezenfektanla banyo yaptırmak derideki mikroorganizmaların ortadan kaldırılması sonucu yaraların daha hızlı iyileşmesinin ve sudaki mikroorganizma yükünün azaltılmasına da sebep olur. Ancak dezenfektanlar ve banyo tarzında uygulanan kemotöropatikler çoğunlukla hastalık sistemik hale geçtiğinde etkisizdirler. Bu nedenle hastalıkların tedavisinde oral olarak antibiyotik tedavisi tercih edilmektedir. Tedavi amacıyla oksitetrasiklin, oksolinik asit, florfenikol, furanance, sulfamerazin, nitrofurazon başarı ile kullanılmaktadır (Candan, 1991; Noga, 2000; Peggy ve Francus- Floyd, 2002).

Sülfanomid ve antibiyotiklerin tedavisi kültür balıklarında vibriosisin epizootikleri sırasında ölümlerin kontrolünde çok etkilidir (Akaylı, 2001). Bazı nitrofuran bileşikleri de vibriosisin kontrolünde yararlıdır. Araştırmacılar vibriosisin tedavisi için en etkili kemotöropotiklerin kuinolonlar, kuvvetlendirilmiş sülfanomidler ve florfenikol olarak rapor etmişlerdir (Bruno vd., 1997; Akaylı, 2001,). Hastalık görülmeden önce sülfametozinin kullanılmasının koruyucu tedavide oldukça başarılı olduğu belirtilmektedir (Akaylı, 2001). Ancak diğer balık hastalıklarında olduğu gibi vibriosisin ciddi bir problemi de bakterinin antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesidir. Özellikle salmonid balıklarda *V. anguillarum*'a karşı kullanımı çok yaygın olan oksitetrasiklin, sülfanomid ve oksolinik asit gibi belirli bazı antibiyotikler balıklarda bağışıklığı bastırdığı deneysel olarak kanıtlanmıştır (Bruno vd., 1997; Akaylı, 2001).

2.3. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteri veya mantarlar tarafından sentez edilen ve diğer mikroorganizmaların gelişimini engelleyen ve sonuçta onların ölümüne yol açan maddelerdir. Ancak genel kullanımda antibiyotik teriminin içine mikroorganizma ürünü olmayan (sülfonamidler, kinolonlar gibi) sentetik antimikrobik ajanlar da eklenmiştir. Bu güne kadar yüzlerce antibiyotik tanımlanmış olup bunların önemli bir bölümü geliştirilerek hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Tosun, 2010). Bu ilaçların yaygın kullanılmaları antibiyotiklere dirençli patojenlerin gelişmesine ve dolaylı olarak yeni ilaçlara karşı gereksinimin gittikçe artmasına neden olmaktadır. Antimikrobiyallerin kullanımı artıkça bakteriyel patojenler tarafından ortaya konan direnç mekanizmaları daha da artmış ve karmaşık bir hal almıştır. Bununla birlikte insanların enfeksiyonlara karşı galip gelme çabası bu güne kadar devam etmiştir. Günümüzde yeni antibakteriyel ajan geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar azalmakla birlikte bakterilerin çok daha zekice direnç geliştirme çabaları devam etmektedir (Krause, 1992).

2.3.1. Antimikrobiyal direnç

Direnç, bakteri veya diğer mikroorganizmaların zaman içinde etkilendikleri antibiyotiklerden etkilenmemesi veya daha az etkilenmesi olarak tanımlanmaktadır. Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale dönmesi olarak tanımlanır (Demirtürk ve Demirdal, 2004). Son yıllarda antibiyotiklere karşı giderek artan direnç sorunu tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir (Akçam vd., 2004). Bugün için ise klinik önemi bulunan bakterilerde antibiyotik dirençliliği ile ilgili 100'den fazla gen bulunduğu bilinmektedir. Bir diğer yönden dirençlilik yayılabilir bir özelliktir ve oluştuktan sonra, büyük bir hızla sadece aynı tür ve cinsler içinde değil, plazmid ve transpozonlar gibi aktarılabilir genetik materyallerle diğer bakterilere de geçebilmektedir (Doğancı, 2001). Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki ana bölümde ele alınabilir (Öztürk, 2002).

2.3.1.1. Fenotipik (doğal) direnç

Kalıtsal özellikte olmayan, bir organizmanın yapısı nedeniyle dirençli oluşu olarak tanımlanır. Burada genellikle antibiyotik maddenin bağlanarak etkili olduğu hedef molekülün olmaması ve ilacın hedefe ulaşmasını önleyen doğal engeller bu tip dirençten sorumludur. Bir antibiyotik maddeye doğal dirençli olan türün hiç bir kökeni o antibiyotikten etkilenmez (Balcı, 2007). Antimikrobiyal maddenin mikroorganizmalara etki edebilmesi için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekir. Mikroorganizma çoğalmıyorsa ve metabolizması inaktif ise fenotipik olarak ilaçlara dirençlidir. Ayrıca hücre duvarını kaybederek L-formuna geçen bakteriler penisilin ve sefalosporinlerden etkilenmezler (Öztürk, 2002).

2.3.1.2. Kalıtsal (kazanılmış) direnç

Kazanılan bir direnç tipidir. Burada bakteri popülasyonu antibiyotik madde ile ilk temasa geldiğinde ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antimikrobiyal maddeye karşı direnç gelişir. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli izolatlar ortaya çıkıp yayılmaktadır ve kromozom, plazmid, transpozun kontrolü altındadır (Öztürk, 2002).

2.3.2. Akuakültürde antibiyotiklerin kullanımı

Akuakültürde bakteriyel infeksiyonların tedavisi için antibakteriyel maddelerin kullanımı 1930'lu yılların sonunda ABD'de sulfamerazin'in kullanımıyla başlamıştır. 1950'li yıllarda oksitetrasiklin ABD'de ve Avrupa'da, 1970'lerde oksolinik asit Japonya'da balık yetiştiriciliği endüstrisine girmiştir. ABD'de yapılan araştırmalar güçlendirilmiş sulfonamidlere yoğunlaşmış, ancak balıklarda kullanımı için yasal izni 1985'de verilmiştir. Güçlendirilmiş sulfonamidlerin kullanımı frunkulosis'in tedavisi için yarar sağlamıştır. Sulfonamidlerin girmesini takiben, sulfonamidlere karşı dirençli bakterilerin görülmesinden dolayı akuakültürde diğer antimikrobiyal bileşikler (kloramfenikol, oksitetrasiklin, kanamisin, nifurprazine, oksolinik asit, sodyum nifurstyrenata ve flumequin) hızlı bir şekilde yaygınlaşmıştır (Austin ve Austin, 2007).

Günümüzde balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaç grupları Çizelge 2.1'de verilmiştir (Treves-Brown, 2000). Bu antibiyotiklerden; furazolidon, furaldaton, nitro-furazon, kloramfenikol, tiamfenikol, ronidazol ve dapson 2377/90 Sayılı AB Yönetmeliğinin EK-2'sinde kültür balıkçılığında kullanımı yasaklanmıştır.

Çizelge 2.1. Balık yetiştiriciliğinde kullanılan antibakteriyel ilaç grupları (Treves-Brown, 2000)

Tetrasiklinler	Oksitetrasiklin Klorotetrasiklin Tetrasiklin Doksiklin
Penisilinler	Ampicillin Amoksillin
Makrolidler	Eritromisin
Sulfonamidler	Sulfamerazin Sulfadimidin Sulfadimethoksin Sulfamonomethoksin
Güçlendirilmiş sulfonamidler	Tribrissen (Trimethoprin: Sulfadiazine (1/5)) Romet-30 (Ormetoprim: Sulfadimethoksine (1/5))
Kinolonlar ve Fluorkinolonlar	Nalidiksik asit Oksolinik asit
Nitrofuranlar	Furazolidone Nitrofurantoin

Deniz ve acı suda yaşayan balık türlerinde görülen en önemli ve iyi bilinen bakteriyel hastak olan vibriosisin etkeni olan *V. anguillarum* izolatlarının antibakteriyel ilaçlara karşı duyarlılıkları pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Molina-Aja vd., 2002; Vaseeharan vd., 2005; Akinbowale vd., 2006; Akşit ve Kum, 2008; Lagana vd., 2011).

Molina-Aja vd., (2002) tarafından *Penaeus karides*inden izole edilen 30 *Vibrio* sp. suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre, 22'sinin karbenisillin (% 73,3), 21'inin amficilin (% 70,0), 11'inin sephalotin (% 36,7), 6'sının oksitetrasikline (% 20,0), 5'inin amikaseine (% 16,7) ve yalnızca 1'inin kloromfenikol, gentamisin, netilmisin, nitrofurantion, peflosaksine direnç gösterdiği bildirilmiştir.

Vaseeharan vd., (2005) tarafından, *Penaeus monodon* haçeri ve havuzlarından izole edilen *Vibrio* spp. ve *Aeromonas* spp.'ye karşı antibiyotik duyarlılıklarının *in vitro* çalışıldığı araştırmada, suşların tamamının (% 100) ampisiline duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca klorotetrasiklin ve eritromisine ise sırasıyla % 43,2 ve % 47,4 oranında duyarlılık belirlenmiştir.

Akinbowale vd., (2006) tarafından Avustralya'da akuakültürden izole edilen bakterilerin antimikrobiyal dirençlerinin belirlendiği araştırmada, izole edilen 62 adet *Vibrio sp.*'nin 42'sinde (%74) en az bir antibiyotiğe karşı direnç geliştiği belirlenmiştir. Çalışılan suşların 25'inde (%40) ampisilin, 28'inde (% 45) amoksisilin, 21'inde (%34) sefalotin ve eritromisin, 9'unda (%14) sephaleksın, 4'ünde (% 6,5) oksitetrasiklin, 3'ünde (% 5) tetrasiklin ve 1'inde gentamisin ve kanamisin direnci belirlenmiştir. Ayrıca, ceftiofur, sefoperazon, kloramfenikol, florfenikol, oksolinik asit, siprofloksasin, trimetoprim, sülfametoksazol veya trimetoprim-sulfametoksazola ait direnç saptanmamıştır.

Akşit ve Kum (2008) tarafından, gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'ndan izole edilen *V. anguillarum*'un antibiyotik duyarlılık düzeyinin belirlendiği çalışmalarında, fusidik asit, linkomisin ve sefoksitin'e karşı %100 direnç; florfenikol, gentamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, novobiosin, oksitetrasiklin, siprofloksasin ve sulfametaksazol-trimetoprim'e ise %100 duyarlılık belirlenmiştir. Ayrıca, ampisiline ve basitrasine karşı % 85,7, amoksisiline karşı ise % 71,4 oranında direnç belirlenmiştir.

Lagana vd., (2011) tarafından, İtalya akuakültür çiftliklerinden izole edilen *Vibrio spp. Photobacterium damsela ssp. piscicida*'nin antibiyotiklere olan duyarlılığının disk düfüzyon metodu ile belirlendiği çalışmada, izolatların ampisilin, karbenisilin, kanamisin, sefalothine karşı dirençli, kloromfenikol, nitrofurantoin ve tobramisine duyarlı olduğu bildirilmiştir.

2.4. Plazmidler

Bazı prokaryotik (bakteri) ve ökaryotik organizmalarda (Maya, Mantar, Bitki), kendi büyük kromozomları (genomik DNA) yanı sıra, bundan ayrı olarak çok daha küçük, DNA karakterinde, çift iplikçikli diğer genetik elementler bulunmaktadır. Bunlar arasında plazmidlerle birlikte, bakteriyofajlar, kromozomla birleşik olan profajlar, transpozonlar, İS-elementleri girmektedir (Arda, 2000).

Bakterilerde kromozomdan başka, genom DNA'sından bağımsız replikasyon yapabilen, genellikle halkasal, çift iplikli olan DNA molekülleri bulunur. Bu yapılar plazmid olarak adlandırılır. Plazmidler bakterinin üremesi için gerekli olan temel genleri taşımazlar. Buna karşılık; bakteriye uygun olmayan ortam koşullarında yaşayabilme, çeşitli toksik maddeler üretme ve metabolize edebilme, antibiyotiklere dirençlilik ve antibiyotik sentezini gerçekleştirebilme, virulens arttırıcı faktör oluşturma ve patojenlik özelliği kazandırma, ağır metal iyonlarına direnç geliştirebilme, U.V. ışınlarına direnç geliştirebilme, spesifik fajlara direnç geliştirebilme, bakteriosin oluşturma gibi özellikleri sağlayan genleri taşırlar (Kuzu, 2008).

Bakteriyel plazmidler, antibiyotik direnci, virulens özellikleri veya fenotipik özelliklere dair genler taşırlar. Bazı plazmidler ise, fenotipte gözlenmeyen özelliklere dair genler taşırlar (kriptik plazmidler). Plazmidlerin hepsi kendini replike edebilme yeteneğinde olup, üzerinde 1-2 veya daha fazla gen taşıyabilirler. Plazmidlerin bazıları bakteriden bakteriye kendinin transferini sağlayacak transfer genleri taşırlar. Bu tip plazmidlere konjugatif plazmidler denilmektedir. Bu tür genleri bulundurmayan plazmidlere ise konjugatif olmayan plazmidler denilmektedir. Plazmidler kromozom dışında sitoplazmada serbest halde bulunabileceği gibi bakteri kromozomuyla bütünleşmiş halde epizomik olarak da bulunabilir (Gür, 1994).

Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmidler, içerdikleri “*tra*” genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara, plazmid kopyalarını transfer edebilme yeteneğindedirler. Plazmidlerin en önemli özelliği, yarı-bağımsız ve bağımsız olarak plazmidin replikasyonuna izin veren, replikasyon orijini adı verilen özel DNA bölgeleri taşımalarıdır (Yüksekdağ ve Beyatlı 2009). Plazmidler bir bakteride kendiliğinden oluşabildiği gibi bir başka bakteriden aktarılma yolu ile meydana gelebilirler. Bir plazmid hücrede kendiliğinden kaybolabileceği gibi kimyasal ve fiziksel yollarla da yok olabilirler (Bilgehan, 2002).

Plazmidlere bağılı direnç bulaşıcıdır ve genellikle antibiyotiğı inaktive eden veya bakterinin geçirgenliğini değıştiren enzimler ile oluşmaktadır. Aminoglikozitler, sefalosporinler, kloramfenikol, makrolitler, penisilinler, sulfonamidler, nitrofurantoin, fusidik aside karşı gelişen dirençten genellikle plazmidler sorumludur (Öztürk, 2002).

2.4.1. Plazmid çeşitleri

2.4.1.1. F faktörü

Bu faktör bir plazmid olup, çembersel çift iplikli DNA yapısındadır. Kromozomla eş zamanlı ancak ondan bağımsız olarak replike olabilme yeteneğindedir. Bu faktörü taşıyan bakterilere F+ bakteri denir. F+ (verici) bir bakteri F- (alıcı) bir bakteri ile yan yana gelip aralarında köprüler oluşturarak alıcı hücreye F faktörünü veya aynı anda bakterinin kromozomundan bir parçayı aktarabilme yeteneğine sahiptir. F faktöründe yer alan *tragenleri* bir operon içinde düzenlenmiştir. Operon içindeki birtakım genleri yönetimi altında konjugasyon olayı verici bakteride seks pilusu yapılması ile başlar. Seks pilusu bilinen fimbriyalardan oldukça büyük, içi boş, içinden genetik madde aktarımının gerçekleştiren bir yapıdır (Kaya, 2009).

2.4.1.2. Col plazmidleri

Bu plazmidler genel anlamda bakteriyosin yapımından sorumlu plazmidlerdir. Bakteriyosin, özellikle enterik bakteriler tarafından üretilen ve diğer bakteriler üzerine eritici etki gösteren maddelerdir (Kaya, 2009).

2.4.1.3. *Staphylococcus* plazmidleri

İçerdikleri plazmidler yönünden *Staphylococcus* bazı değışik durumlar göstermektedirler. Genellikle bu plazmidler tek genli plazmidler olup, sık sık bakteri kromozomu ile bütünleşebilme ve yine ayrılma özelliğı gösterebilirler. Bu plazmidler bakteriyofajlar aracılığı ile transdüksiyon yoluyla bir bakteriden

diğerine aktarılırlar. Bilinen *Staphylococcus* plazmidlerinin başlıcaları penisilinaz plazmidleri, tetrasiklin plazmidleri, kloramfenikol plazmidleri, neomisin, kanamisin plazmidleridir (Bilgehan, 1994).

2.4.1.4. Virulens plazmidleri

Bakterilerin sahip oldukları virulens faktörlerin bir kısmı kromozomlarında kodlanmasına karşın bazıları da plazmid orjinlidir (Arda, 2000). Virulens plazmidleri bakterilerin virulensini etkilerler (Bilgehan, 1994).

2.4.1.5. R plazmidleri

Özellikle Gram negatif bakterilerde antibakteriyel ajanlara karşı kromozom dışı dirençliliğin bakteriden bakteriye aktarılmasını sağlayan elementlere R plazmidleri denir. R plazmidlerin de genellikle kendi aktarımını sağlayan rezistans transfer faktör bulunmaktadır. Direnç genlerini taşıyan plazmidler R plazmidleri olup konjugatif R –plazmidlerinde direnç genleri dışında plazmidin transferinden sorumlu RTF (resistance transfer factor) olarak adlandırılan bir bölge daha yer alır. R-plazmidleri incompatibility gruplarına (Inc) ayrılırlar. Inc grup, bir bakteri hücresi içinde birlikte bulunamayan plazmidleri ifade eder. Bugün bilinen 20 kadar Inc grup vardır. Bakterilerde, genel olarak, en etkin plazmid nakli yükselmiş sıcaklıkta gerçekleşir (Küçüker, 2003).

R (konjugatif) plazmidler bir türden diğer bir türe transfer olabilirler ve daha önce hassas olan türlerde yeni antibiyotik direnci salgınlarının ortaya çıkmasına yol açabilirler. Plazmidlerdeki direnç genleri küçük mobil genetik elementler (transposonlar, integronlar, gen kasetleri gibi) içinde yerleşebilirler ve bazen direnç topluluğundaki diğer direnç genleri ile bağlantılı plazmidlere veya kromozomlara geçebilirler. Bu şekilde bir biri ile ilişkisiz birden fazla ilaca karşı eş zamanlı direnç gelişebilir R plazmidi aktarılan bakteride birçok antimikrobik ajana karşı gelişen bu dirence toplu ilaç direnci (multi-drug resistans) denir (Kuyucu, 2007).

R-plazmidleri, diğ er DNA molek  lleri gibi, transpozon veya integronları da taşıyabilirler. Transpozon (Tn) ve integronlar, bir DNA molekul  nden diğ erine, non-homolog b  lgelere integre olmak suretiyle transloke olabilen (yer değiştirebilen) DNA ele etleridir. Tn'lar kendi translokasyonlarından sorumlu transpozaz enzimlerini kodlayan genlerini, antibiyotik direnç genlerini ve ayrıca bazı katabolik genleri taşırlar. Mikroorganizmalar arasında R- plazmidlerinin taşınması transformasyon, konjugasyon ve transd ksiton yolları ile gerçekleşmektedir (Küçüker, 2003).

Ortamda ikinci bir canlı hücre veya bakteriyofaj bulunmaksızın, verici hücre tarafından ortama bırakılmış DNA'nın alıcı hücre tarafından kullanılarak, yeni bir hücre oluşmasına transformasyon denir. Bunun en güzel  rneği, pn mokoklarla yapılan deneylerdir. Kaps  oluşturmayan pnömokok kültürüne, kaps  oluşturma yeteneği olan erimiş pnömokok kültür ektraktı (DNA'sı) eklendikten kısa bir süre sonra, elde edilen yeni pnömokokların, kaps  yaptıkları saptanır (Arda, 2000).

Genetik maddeyi verici ve alıcı hücrenin yanyana gelerek aralarında köprücük oluşması sonucu genetik maddenin aktarılmasına konjugasyon denir. Konjugasyonda verici DNA'sının tümünün veya bir segmentinin, bu hücrede oluşan özel seks pilusu aracılığıyla, alıcı hücreye direkt aktarılır. Verici durumda olma yeteneği hücrede bulunan ve nakledilebilir bir genetik element olan plasmidler tarafından tayin edilir (Ippen-Ihler ve Minkley, 1986).

Bir bakteriyofaj aracılığıyla, bir bakteriden diğ erine genetik madde aktarılması olayına da transdüksiyon denir (Bilgehan, 1994). Bakteriyofajlar, nükleik materyal olarak DNA'ya sahip bakteri viruslarıdır. Bakteriyofaj girdiği bakteriyi eritiyorsa litik faj, eğer bakteri ile uyum içinde varlığını devam ettiriyorsa ılımlı (lizojenik) faj denir. Transdüksiyon olayında, alıcı bakteri (bakteriyofajın girdiği bakteri) verici bakterinin (bakteriyofajın ayrıldığı bakteri) bazı özelliklerini kazanmış olur.

2.4.2. Akuakültürde plazmid kaynaklı antimikrobiyal dirençlilik

Chang ve Bolton (1987) tarafından 75 *Aeromonas* izolatının antimikrobiyal duyarlılığı belirlenmiştir. *A. sobria*, *A. hydrophila* ve farklı coğrafik bölge izolatları arasında farklı dirençler gözlenmiştir. İzolatlar arasında çoklu direnç tespit etmişlerdir. Bununla birlikte yalnız bir konjugatif plazmid saptanmıştır. Bu 110 mega daltondaki plazmidin sekiz antibiyotik direncine aracılık ettiği tespit edilmiştir. Bu antibiyotikler ampisillin, kanamsin, streptomisin, spektinomisin, sulfisoksazol, tikarsillin, tobramisin ve trimethoprimdir. Daha önceki çalışmalarda *Aeromonas sp.*'lere karşı sefamandol, trimethoprim, kloramfenikol ve tetrasikline çok etkili olduğu bildirilirken aksine izolatların sefamandole karşı %43, tetrasikline karşı ise %21 oranında direnç geliştirdiği saptanmıştır.

Pedersen ve Larsen (1995) tarafından O1 serogrubundaki *V. anguillarum* suşlarının plazmid içeriğinin çalışıldığı bir araştırmada, toplam 113 suшта 15 farklı plazmid profili tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre 25 suшта plazmid görülmemiş, 7 suшта (67 kb'daki virülens plazmidi yok) 2 ya da 3 plazmid, 52 suшта sadece 67 kb'daki virülens plazmidi ve 19 suшта ise 67 kb'daki plazmidle birlikte 1 (17 suş) ya da 2 (2 suş) plazmid içerdiği bildirilmiştir. Gökkuşaağı alabalığından izole edilen 42 suшта 4,5 kb, 50 kb, 67 kb, 83 kb ve 90 kb'da plazmidlerden biri ya da birkaçı bulunurken, 15 suшта hiç plazmide rastlanmamıştır. Deniz levreğinden izole edilen 10 suшта 67 kb, 78 kb, 84 kb ve 90 kb'da biri ya da bir kaç, 2 suшта ise hiç plazmid tespit edilmemiştir.

Pedersen vd., (1996) 16 serotipte toplam 279 *V. anguillarum* suşunun plazmid içeriğini çalışmıştır. Çalışılan suşların %53 (164 suş)'ünün plazmid taşıdığı belirlenmiştir. O1 serotipinde ki 119 suşun 9'unda plazmid belirlenememişken, 85'inde 67 kb'da, diğerlerinde ise 5,3 kb ve 108 kb arasında 1'er ya da 2'ser adet plazmid belirlenmiştir. Özellikle 67 kb'da belirlenen plazmidin virülens plazmidi olduğu vurgulanmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Farklı O-serogrupları arasındaki *V. anguillarum* suşlarının plazmid profili (Pedersen vd., 1996)

Serogrup	Suş sayısı	Plazmid profili, kb (suş sayısı)	Serogrup	Suş sayısı	Plazmid profili, kb (suş sayısı)
01	119	Plazmid bulundurmayan (9) 26 38 67 (85) 77 5,3 - 51 53 - 56 35 - 60 5,3 - 67 (2) 10 - 67 36 - 67 (2) 48 - 67 50 - 67 (4) 53 - 67 (2) 67 - 78 (2) 67 - 84 (2) 67 - 108 74 - 84 29 - 31 - 60	05	7	Plazmid bulundurmayan (6) 2,6
			06	7	Plazmid bulundurmayan (4) 44 200 3,2 - 5,3 - 50 - 70
			07	6	Plazmid bulundurmayan (6)
			08	4	Plazmid bulundurmayan (4)
			09	2	Plazmid bulundurmayan (2)
			010	1	Plazmid bulundurmayan (1)
			VaNT2	5	Plazmid bulundurmayan (3) 11,5 68 - 83
			VaNT4	2	Plazmid bulundurmayan (2)
			VaNT5	1	Plazmid bulundurmayan (1)
			VaNT7	6	16 (4) 16 - 49 - 68 16 - 49 - 68 - 80
02	49	Plazmid bulundurmayan (34) 20 64 - 200 (4) 17 - 23 (8) 5,0 - 5,5 - 11,5	Çapraz Reaksiyonlu	12	Plazmid bulundurmayan (8) 2,3 3,3 - 12,3 15 - 20 - 15 46 - 68 - 83
03	13	Plazmid bulundurmayan (13)	Kendinden Bitişimli	3	Plazmid bulundurmayan (2) 6,0 - 14
04	11	Plazmid bulundurmayan (9) 3,9 13 - 155	Tiplendiril meyen	31	Plazmid bulundurmayan (28) 13 50 16 - 155

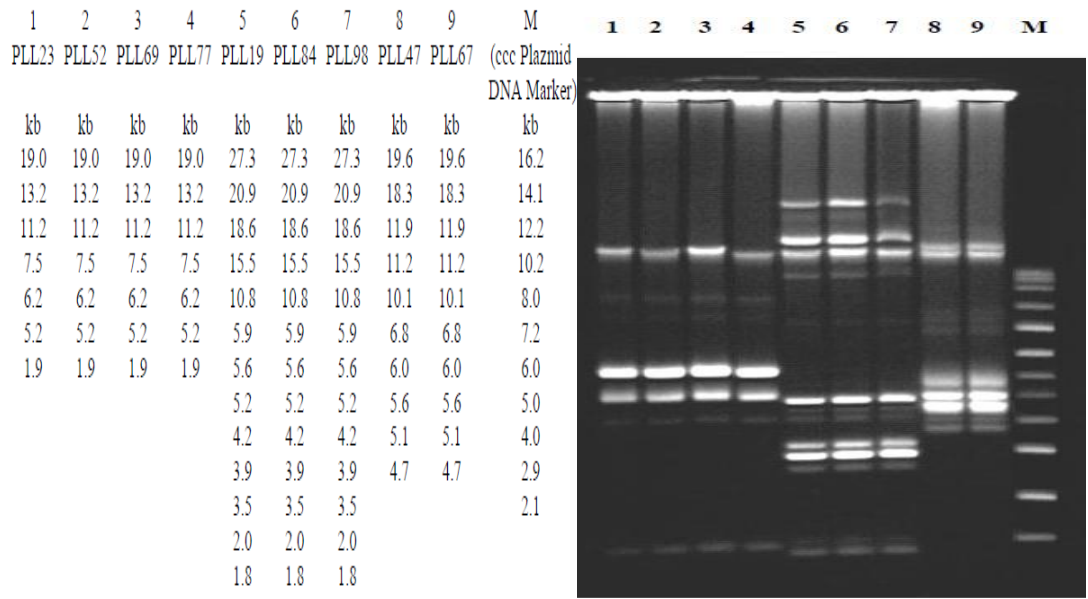
Topal vd., (1997) tarafından balıklarda izole edilen *Y. ruckeri* suşlarının plazmid profilinin belirlendiği çalışmada, incelenen suşların 10'unun 63 kb'da, 9'unun 34 kb'da, 5'inin 63-34 kb'da, 1'er tanesinin 4,4 kb ve 28 kb'da, 2'sinin ise 73 kb boyutunda virulens plazmidi taşıdığı bildirilmiştir. Çalışmada antibiyotik direnci ile plazmid varlığı arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Morii vd., (2003) tarafından Japonya'dan elde edilen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'nın çeşitli ilaçlara taşınabilir direnç mekanizması çalışılmıştır. İlaç direnci 100, 50 ve 40 kb'daki plazmidler yoluyla transfer edildiği bildirilmiştir.

Sørum vd., (2003) balık patojeni olan *A. salmonicida*'nın atipik bir suşundan 1989 yılında tetrasiklin, trimetoprin ve sulfanomide direnç gösteren 45kb'da bir R-plazmidinin (pRAS1) izole edildiğini bildirmiştir. Bu plazmid takip eden

yıllarda aynı bölgedeki *A. salmonicida* subsp *salmonicida*'dan da izole edildiği ve konjugasyon yoluyla *E. coli*'ye taşınabileceği bildirilmiştir.

Proteinaz K uygulaması sonucu bakteriyosin üreticisi oldukları tespit edilen 9 adet laktokok suşunun, alkali denatürasyon yöntemi kullanılarak yapılan plazmid izolasyonu çalışmalarında, içerdikleri plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri aynı olan üç grup oluşturduğu bildirilmiştir (Şekil 2.1)(Tuncer, 2005).



Şekil 2.1. Laktokok suşlarının plazmid içerikleri (Tuncer, 2005)

Karayakar ve Ay (2006) tarafından Mersin Bölgesinden yakalanan çipuralar (*S. aurata*)'dan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. ve *Proteus* sp.'lerinde sefazol (CF), ceftizoksime (ZOX), ceftriaksone (CRO) antibiyotiklerine karşı doğal dirençlilik frekansları ile dirençliliğin plazmide bağlı olup olmadığı araştırılmıştır. İzole edilen bakterilerde incelenen antibiyotiklere karşı doğal ve plazmide bağlı dirençlilik en fazla CF antibiyotiğine karşı geliştiği, bunu ZOX ve CRO izlediği bildirilmiştir. ZOX ve CRO'ya karşı geliştirilen dirençlilikler arasında istatistiksel bakımdan önemli bir ayrım saptanmamıştır. Denenen antibiyotiklere karşı dirençlilik frekansının önemli düzeyde yüksek çıkması, incelenen sefalosporinlerin Mersin Bölgesinde yaygın bir şekilde

kullanılmasından ve bölgedeki hastane atıklarının yeterli arıtım yapılmaksızın doğal ortamlara karışımından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir.

Abdallah vd., (2009) tarafından 8 ay deniz suyunda aç bırakılmış *Vibrio alginolyticus*'un ATCC 33787 (S1) ve ATCC 17749 (S2) ve *Vibrio parahaemolyticus*'un ATCC 17802 (S5) ile Calich halici (İtalya)'nden izole edilmiş *V. parahaemolyticus* şuşu (S6) ve kültür çipura ve levrek balığı iç organlarından izole edilmiş patojenik *Vibrio alginolyticus*'un iki (S3 and S4) şuşunun plazmidlerindeki enzimatik değişimler çalışılmıştır. Başlangıçta S6, S2, S3, ve S4 şuşlarında 22 kb'da tespit edilen plazmid ile S5 şuşunda 4.5-3.5 kb'da tespit edilen iki plazmid açlık sonrası değişime uğramadan kalmıştır. S1 şuşunda ise başlangıçta 7-5 ve 4 kb'da tespit edilen üç plazmid açlık sonrası kaybolmuştur (Şekil 2.2). Bu üç plazmidin kaybolması stres sonucu bakterilerin genetik dayanıksızlığını kanıtlamaktadır. Gerçekten deniz suyunda plazmidleri kaybolan bazı deniz bakterileri diğerlerinden daha kolay çoğalabilirler. Bu denizel ortamdaki bakterilerin virulens faktörlerinin kararlılığını yansıtmaktadır.



Şekil 2.2. Bakteri plazmidlerindeki enzimatik değişimler (Abdallah vd., 2009)

Kaya (2009) tarafından Seyhan Baraj Gölü'nden izole edilen *Enterobacteriaceae* grubu 88 bakteri şuşunun plazmidleri izole edilerek her bakteriye ait plazmid profili belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre 40 izolatın (% 45,5) plazmide

sahip olduğu, 7 antibiyotiğe karşı direnç belirlenen *Escherichia coli* suşunda hiç plazmid DNA bandı gözlenmediği, tek antibiyotiğe dirençli olan diğer bir *Escherichia coli* suşunda ise toplam 7 plazmid DNA bandı olduğu bildirilmiştir. Beş farklı antibiyotiğe dirençli olan yine bir diğer *E. coli* suşunda ise 14 plazmid DNA bandı gözlendiği belirtilmiş, yoğun antibiyotik kullanımının genellikle plazmide bağlı dirençliliğinin ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Seyhan Nehri'nin mikrobiyal kontaminasyona maruz kalması, izole edilen bakteriler arasında 7 antibiyotiğe dirençli organizma izole edilmiş olması bu durumların halk sağlığı açısından ciddi problemler teşkil edebileceği vurgulanmıştır.

Lajnef vd., (2012) tarafından Tunus'taki deniz ortamlarından izole edilen *V. alginolyticus* suşlarının antibiyotik duyarlılığı ve plazmid profilinin belirlendiği çalışmada; ampisillin, kanamisin, doksisilin, eritromisin, imipinem ve nalidiksik aside karşı çoklu direnç belirlenmiştir. Suşların % 79,48'inde plazmid DNA'sı saptanmış ve 0,5 kb ile 45 kb aralığın da 30 farklı plazmid profili belirlenmiştir. Çalışma sonuçları bakterilerde antibiyotiğe dirençin yaygın akuakültür faaliyetlerinden olabileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Vibrio anguillarum* suşları

Araştırmada 12 adet *V. anguillarum* suşu kullanılmıştır. Bu suşlar; Fethiye, Bodrum ve Ordu'daki balık çiftliklerinde ki hasta balıklardan izole edilen ve referans (ATCC 14181) suşdan oluşmaktadır. Bu suşların kökenleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *V. anguillarum* suşları

Suş No	Balık Türü	Köken
1	Levrek balığı	Bodrum (HM-22)
2	Levrek balığı	Bodrum (KK-N2)
3	Levrek balığı	Ordu (16-G)
4	Levrek balığı	Ordu (10-G)
5	Levrek balığı	Bodrum (HM-21)
6	Levrek balığı	Bodrum (KS-VA)
7	Levrek balığı	Bodrum (İST)
8	Gökkuşáğı alabalığı	Fethiye (A4)
9	Levrek balığı	Bodrum (B)
10	Gökkuşáğı alabalığı	Fethiye (M1)
11	<i>Salmo trutta</i>	ATCC 14181
12	Gökkuşáğı alabalığı	Fethiye (A6)

Suşların 5 tanesi; Eğirdir Su Ürünleri Fakóltesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan, 6 tanesi İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakóltesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan (4) ve 1 tanesi yurt dışından American Type Culture Collection (ATCC 14181 CEFAS Weymouth Laboratory., UK)'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Besiyerler

Çalışmalarda LB (Luria-Bertoni) broth, triptik soy agar (%1NaCl'li TSA), Müller Hinton agar, triptik soy broth ve thiosulfat sitrate bile sukroz agar besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.3. Plazmid izalasyonu ve agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

3.1.3.1. Plazmid izolasyon kiti

Çalışmamızda kullandığımız *V. anguillarum* suşlarının plazmidlerinin izolasyonunda hazır plazmid izolasyon kiti kullanılmıştır (Fermentas, GeneJET plazmid Miniprep Kit K0503). Test kiti içeriği aşağıdaki gibidir.

Resüspansiyon Çözeltisi	70 ml
Lizis Çözeltisi	70 ml
Nötrelizasyon Çözeltisi	100 ml
Yıkama (Çözeltisi Konsantre)	100 ml
RNase A	0,7 ml
Elution Tamponu	30 ml
GeneJet Filtrasyon tüpü	250 ad.
Toplama Tüpü	250ad.

3.1.3.2. Agaroz jel elektroforezi için gerekli çözeltiler

Tris-Borik asit-EDTA (10 X TBE) tamponu : Solüsyonun hazırlanması için; 10,8 g Tris, 5,5g Borik asit ve 4,65 g EDTA tartılarak son hacim 100 ml olacak şekilde saf suda çözülür ve pH 8,3'e ayarlanır (Maniatis vd., 1982).

Agaroz jel (% 0,8): Jelin hazırlanması için, %0,8'lik agaroz, homojen bir karışım oluşuncaya kadar ısıtılarak eritilir (Maniatis vd., 1982).

Yürütme tamponu (1 X TBE): 10x TBE tamponu 10 kat saf su ile seyreltilerek 1 X TBE solüsyonu elde edilir (Maniatis vd., 1982).

Örnek yükleme tamponu:

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
% 0,03 Brom fenol mavisi
% 0,03 Ksilen siyanol FF
% 60 Gliserol
60 mM EDTA

Stok boyama solüsyonu: Boya solüsyonun hazırlanmasında, 1g ethidium bromür 100 distile suda tamamen çözündürülür ve koyu renkli şişede +4 C'de saklanır (Maniatis vd., 1982).

DNA markırı: Agaroz jelde ayrılan plazmidlerin tayininde Fermentes GeneRuler 1kb DNA markırı (SM0313 Lot:00069995) kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan ticari antibiyotik diskleri

V. anguillarum'un antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için iki metot kullanılmıştır. Disk difüzyon methodunda, ticari olarak satın alınan, insan ve hayvan sağaltımında yoğunlaştırılarak kullanılan 22 farklı antibiyotik diski (Oxoid) kullanılmıştır (Çizelge 3.2). ATB VET (Bio Meriox) test kitinde bulunan antibiyotikler ise Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Disk difüzyon metodunda kullanılan antibiyotikler

	Antibiyotikler	Kısaltma
1	Ampisilin	AMP, 10 µg
2	Neomisin,	N, 10 µg
3	Klindamisin,	DA, 2 µg
4	Streptomisin	S, 10 µg
5	Oksasilin	OX, 1 µg
6	Oksitetrasiklin	OT, 30 µg
7	Kanamisin	K, 30 µg
8	Gentamisin	CN, 10 µg
9	Penisilin	P, 10 µg
10	Eritromisin	E, 15 µg
11	Tetrasiklin	TE30 µg
12	Enroflaksinbaytril,	ENR, 5 µg
13	Rifamisin	RD, 5 µg
14	Florfenikol,	FFC, 30 µg
15	Amoksilin,	AML, 25 µg
16	Tobramisin,	TOB, 10 µg
17	Ciprofloksisin,	CIP, 5 µg
18	Sulfafurazol,	SF, 300 µg
19	Linkomisin,	MY, 2 µg
20	Trimethoprin	W, 5 µg
21	Sulfametokzol+trimethoprin,	SXT, 25 µg
22	Sulfadiazin	SD, 300 µg

Çizelge 3.3. ATB VET’de bulunan antibiyotikler

	Antibiyotikler	(mg/l)
1	Eritromisin (ERY)	1
2	Penicilin (PEN)	0,25
3	Linkomisin (LIN)	2
4	Amoksilin (AMO)	4
5	Pristinamisin (PRI)	2
6	Amoks-ac-klav (AMC)	2
7	Tiylosin (TYL)	2
8	Okzasilin (OXA)	2
9	Kolitsin (COL)	4
10	Sepalotin (CFT)	8
11	Kotrimakzosol (TSU)	0
12	Sefaperazon (CFP)	4
13	Sulfamethizol (SUL)	100
14	Streptomisin (STR)	8
15	Flumekuin (FLU)	4
16	Spektinomisin (SPE)	64
17	Okzolinik asit (OXO)	2
18	Kanamisin (KAN)	8
19	Enrofloksasin (ENR)	0,5
20	Gentamisin (GEN)	4
21	Nitrofrantoin (FUR)	25
22	Apramisin (APR)	16
23	Fusidik asit (FUC)	2
24	Kloronfenikol (CMP)	8
25	Rifamisin (RFA)	4
26	Tetrasiklin (TET)	4
27	Metronidazol (MTR)	4
28	Doksisilin (DOT)	4

3.2. Yöntem

3.2.1. *V. anguillarum* suşların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi

V. anguillarum suşlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel bakteriyolojik testler (Collins ve Lyne, 1976; Holt vd., 1994) ve API 20 E (Bio Meriux) hızlı teşhis kiti kullanılmıştır (Tanrıkul vd., 2004; Austin ve Austin, 2007)

3.2.1.1. Geleneksel bakteriyolojik testlerin kullanımı

V. anguillarum suşlarının geleneksel bakteriyolojik testler kullanılarak fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde, tüm suşların 24-48 saat’lik kültürleri kullanılmıştır. *V. anguillarum* suşlarında; Gram boyama, oksidasyon-fermentasyon (O/F), hareket testi (asıllı damla metodu), sitokram oksidaz,

katalaz, O/129, sitrat kullanımı, jelatin hidrolizi, indol, metil red, voges proskouer, H₂S, nişasta hidrolizi, karbonhidratların kullanılması , % 0, % 3, % 6, % 7, % 8, % 10 NaCl ve 25 °C'de büyüme özellikleri yönünden incelenmiştir (Arda vd., 2002; Austin ve Austin, 2007). Tüm testler ortama % 1 NaCl eklenerek ve 22 °C'de 24-48 saat inkübasyona tabi tutularak yapılmıştır.

3.2.1.2. API 20 E testi

API 20 E teşhis kitinin kullanımı sırasında, üretici firmanın (Biomerieux, 20100) vermiş olduğu talimatlara uygun olacak şekilde, aseptik koşullarda ekimler yapılmıştır. Ekim sonrası kültürler 22 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilerek, bu sürenin sonunda ONPG, arginin dihidrolaz, üre, lisin ve ornitin dekarboksilaz gibi amino asitlerin kullanılması ve çeşitli şekerlerin kullanılması ile ilgili özellikleri değerlendirilmiştir (Tanrıkul vd., 2004, Austin ve Austin, 2007).

3.2.3. Antimikrobiyal hassasiyet testleri

Antimikrobiyal hassasiyet testleri için bakteri süspansiyonunun hazırlanmasında, %1'lik NaCl içeren Triptik soy brotha suşlardan ekim yapılarak 22°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri süspansiyonunun bulanıklığı Mc Farland 0,5'e denk olacak şekilde serum fizyolojik (% 0,9) ile ayarlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon, *V. anguillarum* suşlarının disk diffüzyon testi ve ATB VET kiti ile antimikrobiyal duyarlılıklarının tespitinde kullanılmıştır. Her iki yöntemde kullanılan antibiyotikler Çizelge 3.2,3'te verilmiştir.

3.2.3.1. Disk diffüzyon metodu ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi

V. anguillarum suşları için belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş hazır disklerle uygulanan disk diffüzyon metodu kullanılmıştır. Mc Farland 0.5 (Biomerieux sa 70 900) bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan %1 NaCl eklenen Müller Hinton Agar besiyerine 0,1 ml miktarında konulmuş ve süspansiyonun tüm besiyeri üzerini kaplayacak şekilde steril eküvyon ile

dağılması sağlanmıştır. Daha sonra, petriler kuruması için 5-10 dk laminar flowda tutulduktan sonra çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler agarın yüzeyine steril pens ile yerleştirilerek 25°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Bauer vd., 1966). İnkübasyon sonucunda her bakteri suşu için inhibisyon zon çapı milimetrik olarak cetvel ile ölçülmüştür. Test sonuçları, suşlar için hassas (S) ve dirençli (R) olarak National Commite for Clinical Laboratory Standards kriterlerine göre değerlendirilmiştir (NCCLS 1993, 1994).

3.2.3.2. ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi

V. anguillarum suşları %1 NaCl ilave edilen TSA'da gençleştirildikten sonra Mc Farland 0,5 e eşit bir bulanıklıkta süspanse edilmiştir. Bu solüsyon ATB S mediumu içeren bir ampule 200 µl otomatik pipet ile inokule edilmiş ve daha sonra ATB VET striplerinde her bir çukura 135 µl inokule edilmiştir. Stripler 22°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra çukurlarda görülen berraklık duyarlı (sensitive), bulanık ise dirençli (resistant) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. *V. anguillarum* suşlarından plazmidlerin izolasyonu

Plazmidlerin varlığının tespitinde Birnboim ve Doly (1979) ve Volgelstein ve Gillespie (1979) tarafından bildirilen metoda uygun olarak Fermentes GeneJET mini plazmid izolasyon kiti (K0503) kullanılmıştır.

LB ortamına ekilen bakteri kültürleri 25 °C'de 24 saat çalkalamalı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu bakteri kültürleri oda sıcaklığında 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek (Sigma 2-16K) çöktürülmüş ve süpernatant pipet yardımıyla tamamen uzaklaştırılmıştır. RNase A ilave edilerek hazırlanan resüspanse solüsyonundan 250µl pellet üzerine ilave edilmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra mikropipet yardımıyla mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Takiben üzerine 250µl lizis solüsyonu eklenmiş, kromozomal DNA'nın parçalanmasından kaçınarak nazıkçe tüp 4-6 kez alt-üst edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpüne 350 µl nötralizasyon solüsyonundan ilave edilmiş ve yine dikkatlice 4-6 kez alt-üst edilmiştir.

Ardından mikrosantrifüj ile 12.000 rpm hızda 5 dk. santrifüj edilmiş, krozomal DNA ve hücre parçacıkları çöktürülmüştür. Süpernatant mikropipet yardımı ile GeneJET hızlı ayırma mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, 1 dk. santrifüj edilmiş ve alta geçen süpernatant uzaklaştırılmıştır. GeneJET hızlı ayırma mikrosantrifüj tüpüne 500 µl yıkama solüsyonu ilave edilmiş, 60 sn. santrifüj sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve aynı işlem ikinci kez tekrar edilmiştir. GeneJET hızlı ayırma mikrosantrifüj tüpünde biriktirilen plazmid DNA'sı üzerine 50 µl elution tamponu ilave edilmiş, 2 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 dk. santrifüj edilmiş, saflaştırılan plazmid DNA'sı agaroz jel elektroforezi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.5. Agaroz jelin hazırlanması ve örneklerin jele uygulanması

Plazmid DNA'sının tanımlanması için yatay jel elektroforez cihazı (OWI) ve güç kaynağı (OWI) kullanılmıştır. Hazırlanan agaroz jel (% 0,8) tarakları yerleştirilmiş 11x9x0,6 cm boyutlarındaki jel kutusuna dökülmüştür ve üzerine jel tarağı yerleştirilmiştir. Agaroz tamamen soğutulduktan sonra yatay jel kutusu elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Taraklar yavaşça jelden uzaklaştırılmıştır. Elektroforez tankı jelin üzerini kaplayacak kadar 1xTBE koşturma tamponu ile doldurulmuştur. Markır ve plazmid örnekleri ayrı ayrı 5 kat örnek yükleme tamponuyla karıştırılmış ve mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına sırasıyla yükleme yapılmıştır.

Elektroforez işlemi 100 voltta marker boya jel sistemini terk edinceye kadar devam edilmiştir. Daha sonra jeller etidyum bromit boya içeren çözeltide 20 dakika bekletilmiş, jel görüntüleme sistemiyle (Dahian VUV transillüminatör) UV ışık altında görüntülenmiş ve resimleri çekilmiştir (Maniatis vd., 1982).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

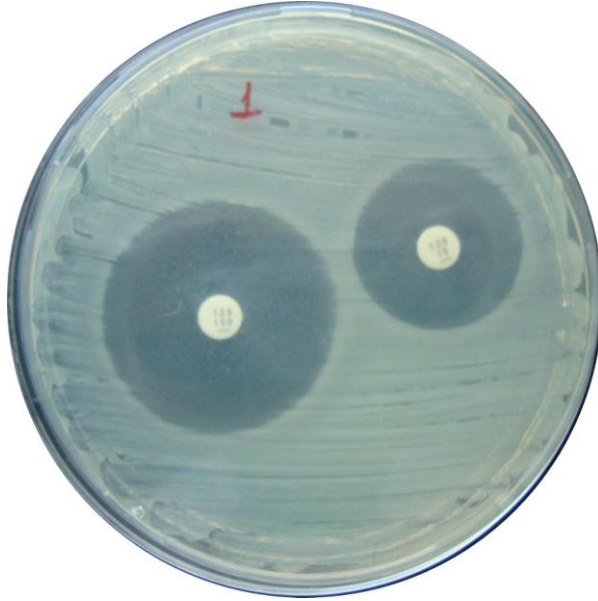
4.1. Suşlarının Fenotipik Özelliklerine Ait Bulgular

Çalışmada farklı bölgelerdeki balık çiftliklerinde balıklarda ölümlere neden olan hastalık vakalarından izole edilen 11 adet *V. anguillarum* suşunun fenotipik özellikleri yurt dışından getirtilen referans bakterinin (ATCC 14181 CEFAS Weymouth Laboratory., UK) özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Bu suşların % 1 NaCl içeren T-TSA' da 25 °C' de 24-48 saatlik inkübasyondan sonra düz, hafif kabarık, yuvarlak, krem renginde 2-3 mm çapında küçük koloniler oluşturdukları gözlenmiştir.

V. anguillarum suşların vibrio için seçici besiyeri olan Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose Agar'a (TCBS) ekimleri yapıldığında suşların tamamının sarı renkli koloniler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.1). Bu primer kültür izolatlarının saf kültürleri yapılmıştır. Mikroskopik morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için saf kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yapılarak incelenmiştir. İnceleme sonrası bakterilerin Gram negatif düz ya da hafif kıvrık çomaklar şeklinde oldukları gözlenmiştir. Çukur lamda asılı damla yöntemi ile yapılan hareket muayenesinde ise bakterilerin aktif flagellar hareket gösterdikleri gözlenmiştir. Ayrıca sitokram oksidaz ve katalaz pozitif, O/F testine fermantatif ve O/129 (Vibriostat) testine duyarlı olan (Şekil 4.1) bakterinin geleneksel ve API 20 E testleriyle fenotipik özellikleri belirlenmiştir (Şekil 4.2). Çalışmada kullanılan *V. anguillarum* suşlarının fenotipik özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. TCBS agarda *V. anguillarum*'un sarı renkli kolonilerinin görünümü (1 numaralı suş)



Şekil 4.2. O/129 (Vibriostat) duyarlılık test sonucu (1 numaralı suş)



Şekil 4.3. API 20 E test sonuçları (1 numaralı suş)

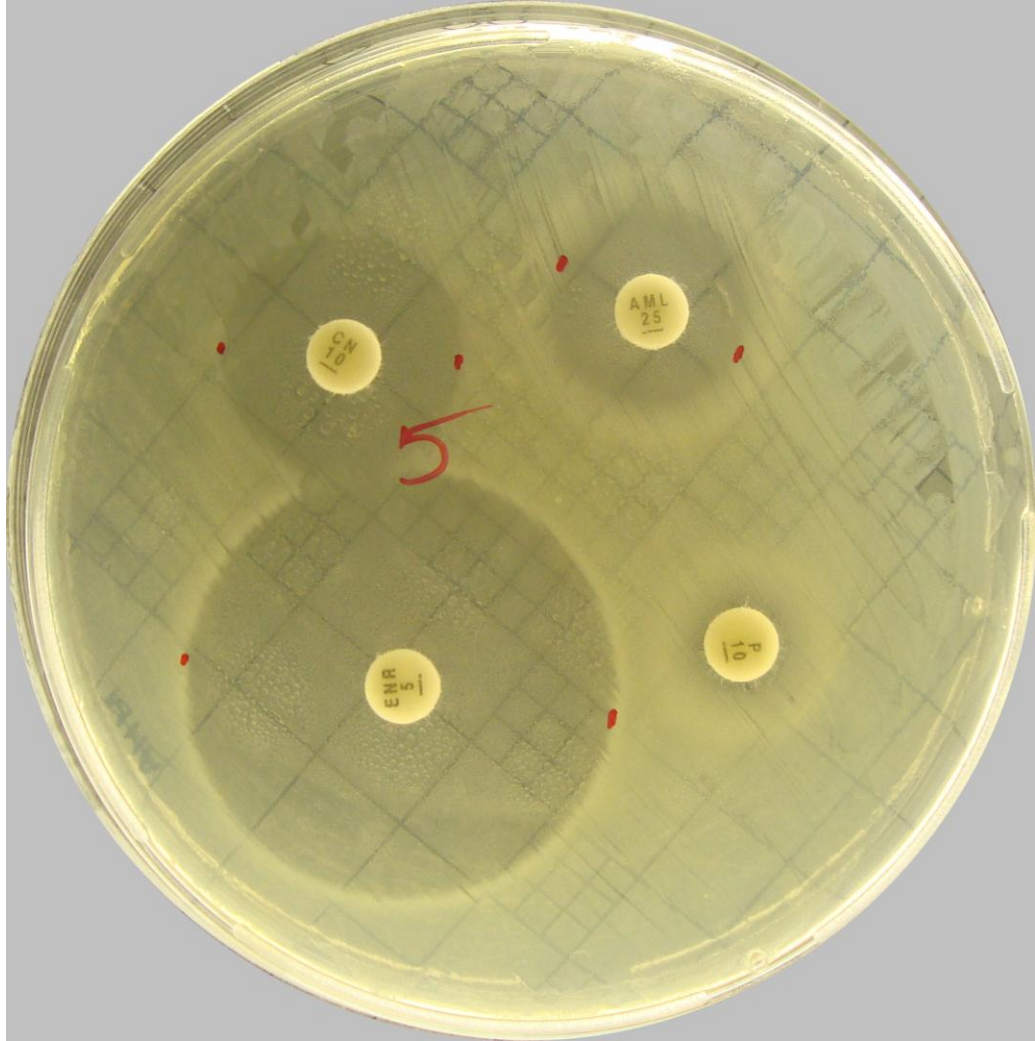
Çizelge 4.1. *Vibrio anguillarum* suşlarının fenotipik özellikleri ile ilgili bulgular
(25 °C’ de 24-48 saatlik inkübasyon)

	Suşlar											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TCBS’de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Gram boyama	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç	-, Ç
Sitokram Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Vibriostat O/129 (10µg)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Vibriostat O/129(150µg)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
β galaktozidaz (ONPG)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginin Dihidrolaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizin Dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornithin Dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S indirgeme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Voges proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%3 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%7 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
%8 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%10 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ç: Çubuk, F: Fermentatif, D: Duyarlı

4.2. Suşlarının Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Çıkarılması

V. anguillarum suşlarının antibiyotik dirençlilik profillerinin çıkarılmasında çeşitli antibiyotikler için disk difüzyon testi (Şekil 4.4) ve ATB VET yöntemi (Şekil 4.5) kullanılmıştır. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre; çalışmada kullanılan tüm suşların oksasillin, linkomisin ve klindamisin'e dirençli, kanamisin, gentamisin, enroflaksin, rifamisin, tobramisin, siprofloksisin ve timethoprime ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada kullanılan suşların % 92'sinin ampisiline, % 75'nin penisiline ve % 67'sinin streptomisine dirençli olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2).



Şekil 4.4. Disk diffüzyon testi sonucu (5 numaralı suş)

ATB VET sonuçlarına göre ise; çalışılan 12 suşun tamamında eritromisin, penisilin, linkomisin, amoksillin, pristinamisin, amoks-ac-klav, tiylosin, oksasilin, kolitsin, sepalotin, sefaperazon, sulfamethizol, streptomisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı direnç, kotrimakzsol, flumekuin, okzolinik asit ve enrofloksasine karşı ise duyarlılık belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, spektinomisin, kanamisin, gentamisin, apramisin ve fusidik asit'e sadece 7. ve 9. suşların duyarlı, geri kalan suşların ise dirençli, rifamisin'e 6. suş, nitrofrantoin'a 2. ve 5. suşlar hariç geri kalanların duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.5. ATB VET sonucu (2 numaralı suş)

Çizelge 4.2. *V. anguillarum* suşlarının disk düffüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	Kodu	Ölçülen zon (mm) ve izolatların duyarlılık durumları																	
		<i>V. anguillarum</i> suşları												Toplam Sayı			Toplam Yüzde		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	R	I	S	%R	%I	%S
Ampisilin	AMP10	10(R)	11(R)	12(R)	0(R)	8(R)	0(R)	10(R)	9(R)	0(R)	16(I)	0(R)	10(R)	11	1	0	92	8	0
Neomisin	N10	15(I)	14(I)	13(I)	12(R)	12(R)	12(R)	15(I)	13(I)	13(I)	14(I)	16(I)	14(I)	3	9	0	25	75	0
Clindamisin	DA2	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	12	0	0	100	0	0
Streptomisin	S10	16(S)	0(R)	0(R)	11(R)	0(R)	10(R)	11(R)	12(I)	8(R)	14(I)	19(S)	13(I)	7	3	2	58	25	17
Oksasilin	OXI	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	12	0	0	100	0	0
Oksitetrasiklin	OT30	35(S)	10(R)	13(R)	28(S)	16(I)	31(S)	33(S)	36(S)	33(S)	33(S)	38(S)	31(S)	2	2	8	17	17	67
Kanamisin	K30	19(S)	18(S)	18(S)	19(S)	19(S)	20(S)	21(S)	20(S)	18(S)	19(S)	22(S)	21(S)	0	0	12	0	0	100
Gentamisin	CN10	20(S)	21(S)	20(S)	19(S)	21(S)	19(S)	20(S)	19(S)	19(S)	22(S)	23(S)	21(S)	0	0	12	0	0	100
Penisilin	P10	0(R)	13(R)	10(R)	0(R)	7(R)	0(R)	15(I)	14(I)	0(R)	13(I)	0(R)	9(R)	9	3	0	75	25	0
Eritromisin	E15	15(I)	16(I)	17(I)	15(I)	20(I)	17(I)	0(R)	18(I)	19(I)	18(I)	25(S)	29(S)	1	9	2	8	75	17
Tetrasiklin	TE30	35(S)	17(I)	18(I)	29(S)	17(I)	26(S)	35(S)	31(S)	36(S)	33(S)	40(S)	35(S)	0	3	9	0	25	75
Enroflaksinbaytril	ENR5	33(S)	35(S)	37(S)	37(S)	36(S)	32(S)	41(S)	42(S)	38(S)	39(S)	52(S)	43(S)	0	0	12	0	0	100
Rifamisin	RD5	29(S)	24(S)	25(S)	18(S)	29(S)	18(S)	32(S)	31(S)	30(S)	29(S)	33(S)	23(S)	0	0	12	0	0	100
Florfenikol	FFC30	37(S)	34(S)	30(S)	36(S)	37(S)	37(S)	47(S)	42(S)	39(S)	38(S)	48(S)	43(S)	0	0	12	0	0	100
Amoksisilin	AML25	17(I)	17(I)	16(I)	15(I)	18(S)	16(I)	12(R)	21(S)	16(S)	19(S)	12(R)	19(S)	2	5	5	17	42	42
Tobramisin	TOB10	21(S)	19(S)	16(S)	18(S)	18(S)	16(S)	20(S)	19(S)	19(S)	20(S)	23(S)	17(S)	0	0	12	0	0	100
Ciprofloksisin	CIP5	36(S)	40(S)	40(S)	35(S)	40(S)	35(S)	46(S)	46(S)	44(S)	43(S)	58(S)	46(S)	0	0	12	0	0	100
Sulfafurazol	SF300	24(S)	0(R)	0(R)	26(S)	0(R)	26(S)	34(S)	21(S)	27(S)	21(S)	35(S)	26(S)	3	0	9	25	0	75
Linkomisin	MY2	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	0(R)	12	0	0	100	0	0
Trimetoprin	W5	28(S)	33(S)	34(S)	30(S)	31(S)	29(S)	38(S)	29(S)	28(S)	28(S)	43(S)	37(S)	0	0	12	0	0	100
Sulfametoksin-	SXT25	35(S)	17(S)	16(S)	31(S)	14(I)	30(S)	35(S)	33(S)	32(S)	35(S)	31(S)	35(S)	0	1	11	0	8	92
Sulfadiazin	SD300	17(S)	0(R)	0(R)	17(S)	0(R)	14(S)	18(S)	20(S)	14(S)	16(S)	20(S)	20(S)	3	0	9	25	0	75
R		5	9	9	7	9	6	7	4	6	3	6	5						
I		3	4	4	2	4	3	2	4	2	5	1	2						
S		14	9	9	13	9	13	13	14	14	14	15	15						

R:Dirençli, I:Orta Duyarlı, S:Duyarlı

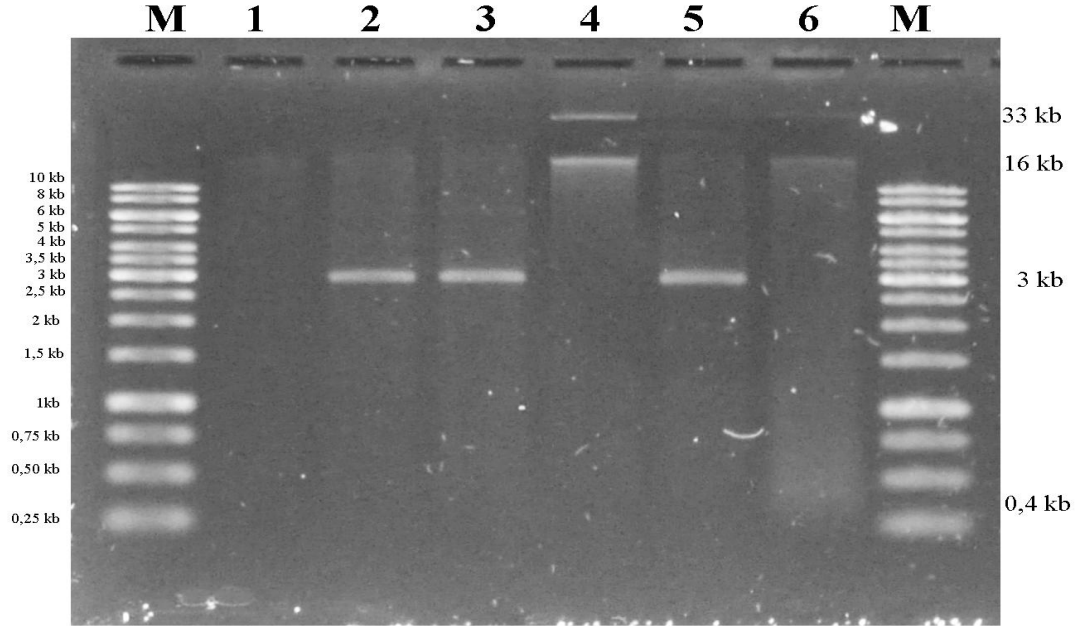
Çizelge 4.3. *V. anguillarum* için ATB VET testine göre antibiyotik duyarlılıkları

	Antibiyotikler	(mg/l)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	R	S	%R	%S
1	Eritromisin (ERY)	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
2	Penicilin (PEN)	0,25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
3	Linkomisin (LIN)	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
4	Amoksilin (AMO)	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
5	Pristinamisin (PRI)	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
6	Amoks-ac-klav (AMC)	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
7	Tiylosin (TYL)	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
8	Okzasilin (OXA)	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
9	Kolitsin (COL)	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
10	Sepalotin (CFT)	8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
11	Kotrimakzozol (TSU)	0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	12	0	100
12	Sefaperazon (CFP)	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
13	Sulfamethizol (SUL)	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
14	Streptomisin (STR)	8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
15	Flumekuın (FLU)	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	12	0	100
16	Spektinomisin (SPE)	64	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	2	83	17
17	Okzolinik asit (OXO)	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	12	0	100
18	Kanamisin (KAN)	8	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	2	83	17
19	Enrofloksasin (ENR)	0,5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0	12	0	100
20	Gentamisin (GEN)	4	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	2	83	17
21	Nitrofrantoin (FUR)	25	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	2	10	17	83
22	Apramisin (APR)	16	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	2	83	17
23	Fusidik asit (FUC)	2	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	10	2	83	17
24	Kloronfenikol (CMP)	8	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	5	7	42	58
25	Rifamisin (RFA)	4	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	1	11	8	92
26	Tetrasiklin (TET)	4	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	8	4	67	33
27	Metronidazol (MTR)	4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12	0	100	0
28	Doksisilin (DOT)	4	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	3	9	25	75
R			21	23	21	19	23	20	14	20	16	20	19	21				
S			7	5	7	9	5	8	14	8	12	8	9	7				

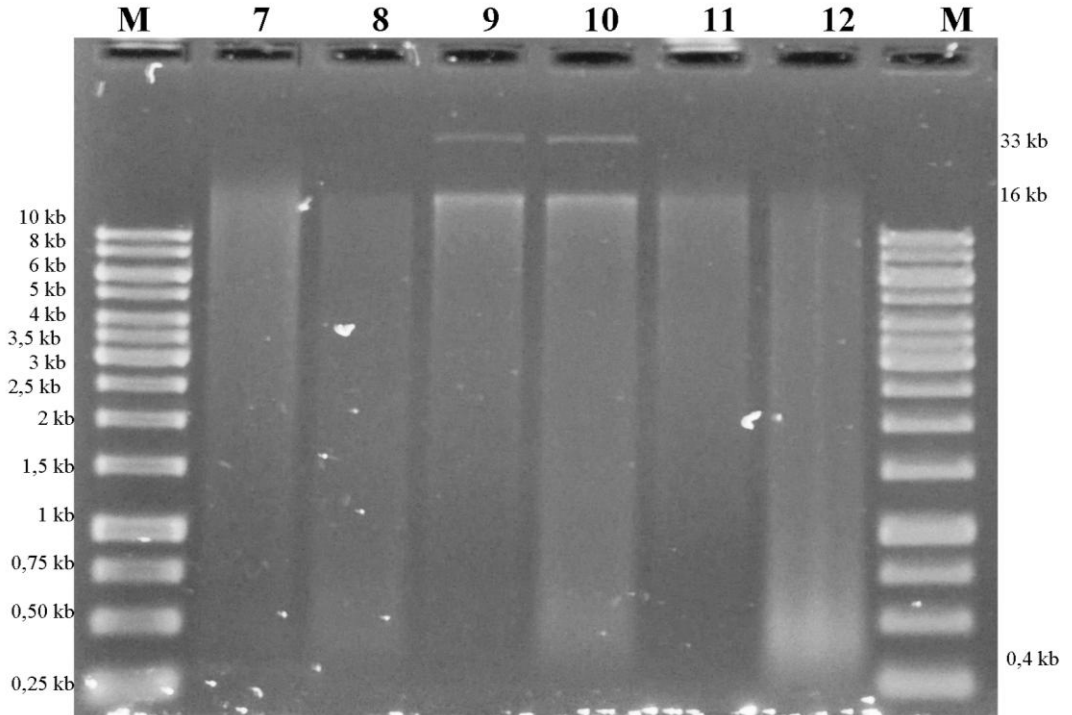
R:Dirençli, S:Duyarlı

4.3. Plazmid Profillerinin Analizi

Çalışmada 11 adet *V. anguillarum* suşu ve 1 adet referans suşun plazmid DNA profillerini içeren agaroz jellerin resimleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.6. *V. anguillarum* suşlarının agaroz jelde plazmid profilleri



Şekil 4.7. *V. anguillarum* suşlarının agaroz jelde plazmid profilleri

İncelenen 12 *V. anguillarum* suşunun hepsinde 1-3 arasında değişen sayıda plazmid DNA'sına rastlanılmış ve plazmid profilleri 0,4-33 kb arasında hesaplanmıştır. 16 kb'da ki plazmid DNA'sı çalışılan tüm suşlarda, 33 kb'da ki plazmid DNA'sı 4, 6, 9, 10 numaralı suşlarda, 3 kb'da ki plazmid DNA'sı 2, 3, 5 numaralı suşlarda ve 0,4 kb'da ki plazmid DNA'sı ise 6, 8, 10, 12 numaralı suşlarda tespit edilmiştir (Şekil 4.6,7).

4.4. Suşların plazmid profili ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki

V. anguillarum suşlarında disk diffüzyon metodu ile yapılan antibiyotik duyarlılığı testi sonucunda bulunan direnç ile suşlarda saptanan plazmid DNA'larının ilişkisi Çizelge 4.4'te verilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre; 1., 11. ve 12. suşlarda aynı antibiyotiklere direnç ve sadece 16 kb'da plazmid olduğu, 2. ve 3. suşlarda ortak direnç ve 3 kb-16 kb'da iki plazmid bulunduğu, 4. ve 6. suşlarda ortak direnç ve 16 kb-33kb'da iki plazmid gözlemlendiği, 5., 7. ve 9. suşlarda ise farklı direnç ve farklı plazmidler saptanmıştır. Ayrıca, 8. ve 10. suşlarda ortak direnç belirlenmiş olmasına rağmen, 16 kb'lık plazmid dışında 10. suшта 33 kb'da ikinci bir plazmid olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Suşların plazmid profili ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki

Suş No	Dirençli antibiyotikler	Plazmid profili
1	AMP, DA, OXI, P, MY	16 kb
2	AMP, DA, S, OXI, OT, P, SF, MY, SD	3 kb - 16 kb
3	AMP, DA, S, OXI, OT, P, SF, MY, SD	3 kb - 16 kb
4	AMP, N, DA, S, OXI, P, MY	16 kb - 33 kb
5	AMP, N, DA, S, OXI, P, SF, MY, SD	3 kb - 16 kb
6	AMP, N, DA, S, OXI, P, MY	16 kb - 33 kb
7	AMP, DA, S, OXI, E, AML, MY	16 kb
8	AMP, DA, OXI, MY	16 kb
9	AMP, DA, S, OXI, P, MY	16 kb - 33kb
10	AMP, DA, OXI, MY	16 kb - 33 kb
11	AMP, DA, OXI, P, MY	16 kb
12	AMP, DA, OXI, P, MY	16 kb

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Vibriozis bütün dünyada kültür balıkçılığında yaygın bir şekilde ortaya çıkması nedeniyle önemli bir problem olarak görülmektedir (Toranzo ve Barja, 1990; Reed ve Floyd-Francis, 2013). Bu hastalık deniz balıkları, kabuklu ve eklem bacaklı su ürünlerinin üretimini sınırlandırıcı bir bakteriyel enfeksiyondur (Çağırzan, 1993; Akaylı, 2001; Tanrıkul vd., 2004; Timur ve Korun, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Tanrıkul, 2007; Korun ve Timur, 2008). Vibriozise neden olan baskın türün *Vibrio anguillarum* olduğu kabul edilmesine rağmen diğer bazı vibrio türleride (*V. ordalii*, *V. damsela*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*) birçok deniz ve acı su türlerinde hastalığa sebep olmaktadır (Reed ve Floyd-Francis, 2013).

Gram negatif, tek polar flagellumu ile hareketli, virgül ya da çubuk biçiminde olan *V. anguillarum*'un teşhisi, genellikle fenotipik özellikleri incelenerek yapılmaktadır (Bruno vd., 1997; Austin ve Austin, 1999). *V. anguillarum*'un fenotipik özelliklerinin belirlenmesinde geleneksel mikrobiyolojik testler ve günümüzde API 20 E ve BIONOR Mono aglütinasyon hızlı teşhis kitleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Akaylı, 2001; Tanrıkul vd., 2004; Austin ve Austin, 2007). Farklı balık türlerinden izole edilen *V. anguillarum* suşları ile yapılan çalışmalarda; deniz levreklerinden izole suşlar (*V. anguillarum* O1) arasında biyokimyasal özellikleri yönünden farklılık görülürken (Tanrıkul vd., 2004), farklı bölge ve zamanlarda gökkuşağı alabalığından izole edilen *V. anguillarum* O1 suşları arasında biyokimyasal özellikleri açısından farklılık olmadığı ifade edilmiştir (Tanrıkul, 2007).

Araştırmamızda 12 suşun geleneksel mikrobiyolojik testleri kullanarak elde ettiğimiz sonuçlarında; indol, jelatin, arabinoz ve %7'lik NaCl'de üreme dışındaki diğer özellikleri açısından suşlar arasında bir farklılık görülmemiştir. Bu yönüyle çalışmamızda kullandığımız suşlar homojen bir yapı göstermiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, ülkemizden izole edilen *V. anguillarum* suşlarıyla çalışmış olan araştırmacıların bulgularını desteklemektedir (Candan, 2000;

Tanrıkul vd., 2004; Ercan ve Candan, 2006; Tanrıkul, 2007; Korun ve Gökoğlu, 2007; Akşit ve Kum, 2008; Ekici 2010).

Çalışma sonuçlarımıza göre, 25 °C'de 24 saat inkübasyon sonucunda *V. anguillarum* suşlarının tamamının sitokram oksidaz, katalaz, hareketlilik, ONPG, arginin dihidrolaz, sitrat kullanımı, VP reaksiyonu ile glukoz, mannitol ve sakaroz gibi şekerlerden asit üretiminin pozitif; lizin ve ornitin dekarboksilaz, triptofan deaminaz, üre ve H₂S indirgeme ile inositol, rhamnoz, mellobiyoz ve amigdalin gibi şekerlerden asit üretimi testlerinin negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da küçük değişiklikler dışında çalışmamızla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Candan, 2000; Yaman vd., 2003; Tanrıkul vd., 2004; Ercan ve Candan, 2006; Tanrıkul, 2007; Korun ve Gökoğlu, 2007; Noguerola ve Blanch 2008; Akşit ve Kum, 2008; Ekici 2010). Suşlar arasında indol, jelatin hidralizasyonu ile sorbitol ve arabinoz asit üretimi sonuçlarında farklılıklar gözlenmiştir. *V. anguillarum*'un farklı serotip veya farklı coğrafik bölgelerden izole edilen suşları arasında biyokimyasal özelliklerin değişkenlik gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Yaman vd., 2003; Tanrıkul vd., 2004; Ekici 2010). Austin ve Austin, (2007) tarafından *V. anguillarum*'un biyokimyasal özellikleri ile ilgili çalışmada arjinin dihidrolaz, ONPG, simon sitrat besiyerinde üreme, jelatin ve sorbitol kullanımı pozitif; H₂S, lizin ve ornitin dekarboksilaz ve üre kullanımının negatif olduğu bildirilmiştir. *V. anguillarum* türleri içerisinde biyokimyasal farklılıklar daha çok şekerlerden asit üretiminde görülse de türlerin hepsinde glukoz, mannitol, sakarozdan asit üretimi pozitifdir.

V. anguillarum'a ait 11 suş referans bakteri (ATCC 14181) ile karşılaştırıldığında, referanstan farklı olarak indol testinde 9 numaralı suşta, jelatin hidrolizasyonu testinde 4. ve 6. suşlarda, sorbitol testinde 2, 3, 5 ve 7 nolu suşlarda, arabinoz testinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 ve 12 numaralı suşlarda farklılıklar tespit edilmiştir. ATCC 14181 nolu suş ile 10. suş hariç diğer suşların indol üretiminin pozitif olması ile Çağırğan (1993), Yaman vd., (2003), Demircan ve Candan (2006) Austin ve Austin (2007) ve Korun ve Gökoğlu (2007) tarafından bildirilen sonuçlarla aynıdır. *V. anguillarum*'a ait indol testi

Tanrıkul (2007) tarafından negatif, Noguerola ve Blanch (2008) ise %75-89 pozitif olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlardan indol testinin suşlar arasında farklı sonuçlar verebileceği anlaşılmaktadır. Benzer farklılıklar jelatin hidrolizasyonu, sorbitol ve arabinoz testlerinde diğer araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Candan, 2000; Yaman vd., 2003; Tanrıkul vd., 2004; Tanrıkul, 2007; Korun ve Gökoğlu, 2007; Noguerola ve Blanch 2008; Akşit ve Kum, 2008; Ercan 2009; Ekici 2010).

V. anguillarum'a ait 12 suşun farklı tuzluluklarda üreyebilme özellikleri üzerine yapılan çalışmamızda, % 0 % 3 ve % 5 NaCl çözeltisinde suşların tamamının ürediği, %7'de sadece 11. suşun üreyemediği, % 8 ve 10 konsantrasyonda ise tüm suşlarda üreme gerçekleşmediği saptanmıştır (Çizelge 4.1). Bulgularımızın aksine, Akşit ve Kum (2003) çipura ve levrek balıklarında izole edilen *V. anguillarum*'un %0 ve %7 NaCl'de üreyemediğini bulmuştur. Bulgularımızla uyumlu olarak, Plumb (1999), Demircan ve Candan (2006), Ekici (2010), *V. anguillarum*'un NaCl'siz ortamlarda da üreyebildiği bildirmiştir. Ayrıca bulgularımızla uyumlu olarak Noguerola ve Blanch (2008), *V. anguillarum*'un tuzsuz ortamda %26-47 oranında üreme gerçekleştirdiğini, %3 ve %6 NaCl konsantrasyonlarında ise üremenin pozitif olduğu, %8 ve %10'da ise üremenin gerçekleşmediği bildirilmiştir.

Deniz ve acı suda yaşayan balık türlerinin en önemli ve iyi bilinen bakteriyel hastalığı olan vibriosisin etkeni olan *V. anguillarum* izolatlarının antibakteriyal ilaçlara karşı duyarlılıkları pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Akşit ve Kum (2008) gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *V. anguillarum*'da fusidik asit, linkomisin ve sefoksitin'e karşı %100 direnç, florfenikol, gentamisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, novobiosin, oksitetrasiklin, siprofloksasin ve sulfametaksazol-trimetoprim'e ise %100 duyarlılık belirlenmiştir. Ayrıca, ampisiline ve basitrasine karşı % 85,7; amoksisiline karşı ise % 71,4 oranında direnç belirlenmiştir. Akinbowale vd., (2006) izole edilen 62 adet *Vibrio sp.*'nin ampisilin, amoksisilin ve eritromisine düşük oranda direnç gösterdiğini belirlerken, Vaseeharan vd., (2005) ise aynı etkenin ampisiline yüksek (% 100), kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin, nalidiksik asit ve

oksitetrasikline düşük oranlarda dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Molina-Aja vd., (2002) tarafından *Penaeus* karidesinden izole edilen 30 *Vibrio* sp. suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre, 22'sinin karbenisillin (% 73,3), 21'inin ampisillin (% 70), 11'inin sefalotine (% 36,7), 6'sının oksitetrasikline (% 20), 5'inin amikasin (% 16,7) ve yalnızca 1'inin kloromfenikol, gentamisin, netilmisin, nitrofurantion, peflosaksine direnç gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda benzer sonuçlar elde edilmekle birlikte, disk difüzyon testi sonuçlarına göre; kullanılan tüm suşların oksasilin, linkomisin ve klindamisin'e (% 100), % 92'sinin ampisiline ve % 75'inin penisiline dirençli, % 100'ünün kanamisin, gentamisin, enroflaksinbaytril, rifamisin, tobramisin, siprofloksisin, florfenikol ve trimetoprime, % 92'sinin sulfametoksin-trimethoprim, % 75'inin tetrasiklin ve sulfafurazol'a duyarlı olduğu belirlenmiştir. ATB VET sonuçlarına göre ise, çalışmada kullanılan 12 suşun tamamında eritromisin, penicilin, linkomisin, amoksilin, pristnamisin, amoks-ac-klav, tiylosin, okzasilin, kolitsin, sepalotin, sefaperazon, sulfamethizol, streptomisin ve metronidazol antibiyotiklerine karşı direnç, kotrimakzosol, flumekuin, okzolinik asit ve enrofloksasinne karşı ise duyarlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, spektinomisin, kanamisin, gentamisin, apramisin ve fusidik asite sadece 7. ve 9. suşların duyarlı, geri kalan suşların ise dirençli, rifamisine 6. suş, nitrofrantoina 2. ve 5. suşlar hariç geri kalanların duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

V. anguillarum'un 11 suşu ve referans suşta plazmid DNA'sı izalasyonu sonucunda yapılan agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre, suşların hepsinde 1-3 arasında değişen sayıda plazmid DNA'sına rastlanılmış ve tespit edilen plazmid DNA'larının plazmid profilleri 0,4-33 kb arasında hesaplanmıştır. 16 kb'da ki plazmid DNA'sı çalışılan tüm suşlarda, 33 kb'da ki plazmid DNA'sı 4, 6, 9, 10 numaralı suşlarda, 3 kb'da ki plazmid DNA'sı 2, 3, 5 numaralı suşlarda ve 0,4 kb'da ki plazmid DNA'sı ise 6, 8, 10, 12 numaralı suşlarda tespit edilmiştir. Araştırmamıza benzer şekilde pek çok araştırmacı tarafından *V. anguillarum*, *Y. ruckeri*, *Photobacterium damsela*, *A. salmonicida*, *Laktococ*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. ve *Vibrio alginolyticus* türlerine ait suşların farklı plazmid profillerine sahip olduğunu bildirilmiştir (Pedersen ve Larsen, 1995;

Pedersen vd., 1996; Topal vd., 1997; Morii vd., 2003; Srum vd., 2003; Tuncer, 2005; Karayakar ve Ay 2006; Abdallah vd., 2009; Kaya 2009).

V. anguillarum suşlarında disk diffüzyon metodu ile yapılan antibiyotik duyarlılığı testi sonucunda bulunan direnç ile suşlarda saptanan plazmid DNA'larının ilişkisinin belirlenmeye çalışıldığı bu çalışmada, tüm suşların ampisilin, klindamisin, oksasilin ve linkomisine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu direncin ise tüm suşlarda yaklaşık 16 kb'da tespit edilen plazmid DNA'sı ile taşındığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, Chang ve Bolton (1987) tarafından 75 *Aeromonas* izolatının antimikrobiyal duyarlılığının belirlendiği çalışmaları, ampisillin, kanamisin, streptomisin, spectinomisin, sulfisoksazole, tisersillin, tobramisin ve trimethoprim karşı belirlenen direncin 110 mDa'daki plazmidin aracılık ettiği bildirilmiştir. Lajnef vd., (2012) tarafından *V. alginolyticus*'un antibiyotik duyarlılığı ve plazmid profilinin belirlendiği çalışmada, ampisillin, kanamisin, doksisillin, eritromisin, imipinem ve nalidixik aside karşı çoklu direnç belirlenmiştir. Suşların % 79,48'inde plazmid DNA'sı saptanmış ve 0,5 kb ile 45 kb aralığının da 30 farklı plazmid profili belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre bakterilerde antibiyotiğe direnç gelişiminin yaygın akuakültür ve denizel ortamlarla ilişkili yetiştiricilik faaliyetlerinden olabileceği bildirilmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre; 1., 11. ve 12. suşlarda aynı antibiyotiklere direnç ve sadece 16 kb'da plazmid olduğu, 2. ve 3. suşlarda ortak direnç ve 3 kb-16 kb'da iki plazmid bulunduğu, 4. ve 6. suşlarda ortak direnç ve 16 kb-33kb'da iki plazmid gözlemlendiği, 5., 7. ve 9. suşlarda ise farklı direnç ve farklı plazmidler saptanmıştır. Ayrıca, 8. ve 10. suşlarda ortak direnç belirlenmiş olmasına rağmen, 16 kb'lık plazmid dışında 10. suşta 33 kb'da ikinci bir plazmid olduğu tespit edilmiştir.

Dünyada ve ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliğinin hızlı artışıyla birlikte balık hastalıklarında da önemli artışlar olmuştur. Bakteriyel enfeksiyonların işletmelerde görüldüğünde tedavi amacı ile antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. Tedavide yoğun ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı genellikle

bakterilerde plazmide bağı dirençliliğinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bakteri plazmidleri ile gelişen ilaç dirençliliği akuakültürde antibiyotik kullanımında ciddi problemlere yol açmaktadır. Benzer şekilde, çalışmada kullanılan tüm *V. anguillarum* suşlarında da 16 kb'da saptanan plazmid DNA'sının ampisilin, klindamisin, oksasilin ve linkomisine karşı belirlenen dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada aynı plazmidleri bulunduran suşlarda, ortak çoklu antibiyotik direnç gelişimi saptanmıştır.

Sonuç olarak; balıklarda vibriosis hastalığı etkeni olan *V. anguillarum* suşlarında çalışma sonuçlarımıza göre ortaya çıkan çoklu antibiyotik direnci, akuakültürde kontrolsüz ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucunda oluşan bir durumdur. Bunun dışında sucul ekosisteme hastane atıklarının karışması, sucul ekosistemin çevresindeki tarımsal faaliyetlerin de mikrobiyal direnç gelişiminde önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenlerden dolayı infeksiyonların tedavisinde antibiyotikler, antibiyogram duyarlılık testleri olmaksızın kullanılmamalıdır. Etkene yönelik tedavide; antimikrobiyal duyarlılığa göre antibiyotik seçiminin yapılmasının ve doğru doz ve sürede kullanılmasının sağlanması ile bakteriyel direnç gelişiminin önlenilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, direnç ile ilgili tarama çalışmalarının devamlı yapılması, antibiyotik kullanımı ile direnç ilişkisinin kesin olarak belirlenmesini sağlayacak çalışmaların yürütülmesi ve antibiyotik duyarlılığı ile plazmid arasındaki ilişkiyi ortaya çıkaracak ilave çalışmaların yapılması, dirençli infeksiyonların önlenmesinde en etkili yol olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Kallel, H., Bakhrouf, A. 2009. Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater. Archives of Microbiology, 191,493–500.
- Akaylı, T. 2001. Kültür Çipura balıklarında (*Sparus aurata*, L.1758) Vibriosis'in Elisa ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 77s. İstanbul.
- Akçam, F. Z., Gönen, İ., Kaya, O., Yaylı, G. 2004. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Enterobakterilerde Beta-laktam Antibiyotiklere Duyarlılık ve ESBL Sıklığının Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi, 11(1),6-9.
- Akinbowale, O.L, Peng, H., Barton, M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology, 100,1103-1113.
- Akşit, D., Kum, C. 2008. Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(1),1-7.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, K.S. 1994. İmmunoloji. Medisan Yayınevi, 394s. Ankara.
- Arda, M. 2000. Temel mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No:46. Ankara.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıyüpoğlu, M., 2002. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Austin, B., Austin, D.A. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Second edition. Ellis Horwood Limited Chichester, 457p.U.K.
- Austin, B., Austin, D.A. 2007. Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish, Praxis Publishing, Fourth Edition. 363p.
- Balcı, R.S., 2007. Seyhan Baraj Gölünün Bakteriyolojik Kirlilik Düzeyinin Belirlenmesi ve *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Antibiyotik Dirençliliği. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 79 s. ADANA,
- Balebona, C.M., Zorilla, I., Morinigo, M.A., Borrege.J.J. 1998. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt head sea bream (*Sparus aurata*, L) in south western Spain from 1990 to 1996. Aquaculture, 166, 19-35.

- Barug, D., Jong, J., Kies A.K., Verstegen. M.W.A. 2006. Antimicrobial growth promoters. Where do we go from here?. Wageningen Academic Publishers. 422 pp.
- Bauer, A.U., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Track, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. Journal of Clinical Pathology, 45: 493-494.
- Bilgehan, H. 1994. Temel Mikrobiyoloji ve Bağımsızlık Bilimi. Fakülteler Kitap Evi Barış Yayınları, 589, 145-178.
- Bilgehan, H. 2002. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitap Evi Barış Yayınları, 777s.
- Birnboim, H.C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7, 1513 -1522.
- Buller, N.B. 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. A practical Identification Manual, CABI publishing, 0851997384. U.K.
- Bruno, D.W., Alderman, D. J., Schlotfeldt, H.J., 1997. What Should I Do?. A practical Guide for the marine fish farmer. ISBN 0-9526242-2-2.
- Candan, A. 1991. Çipura (*Sparus aurata*, L.1758) yetiştiriciliğinde mevsimsel olarak görülen hastalık etkenlerinin tesbit ve tedavi yönteminin geliştirilmesi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100s, İstanbul.
- Candan, A. 2000, Türkiyede Üretilen Atlantik Salmon (*Salmo salar* L.)'unda Saptanan İlk Vibriosis Olgusu. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 24, 1.
- Chang, B., Bolton, S.M. 1987. Plasmids and Resistance to Antimicrobial Agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1281-1282.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. 1976. Microbiological Methods. Butterworths, 521p. London-Boston.
- Çağırğan, H. 1993. Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*, L.) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı Doktora Tezi, 117s, İzmir.
- Demircan, D., Candan, A. 2006. Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN Gene) Associated with Vibriosis in Marine Fish in Turkey. Turkish Journal of Veterinarian Animal Science, 30, 305-310.
- Demirtürk, N. Demirdal, T. 2004. Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. Kocatepe Tıp Dergisi 5, 17-21.

- Doğancı, L. 2001. Antibiyotik Direncinin Sıklığı Üzerine Antibiyotik Kullanımının Etkisi. Klinik Dergisi, 14(2), 57-61.
- Ekici, S. 2010. Gökkuşluğu Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Vibriosis'e Karşı Aşı Uygulanmasının Bağışıklık Sistemine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 112s. Isparta.
- Ercan, M.D. 2009. Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.1758) balıklarında *Vibrio anguillarum*'un patogenezi üzerine bir araştırma. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, 93s.İstanbul.
- Giuliano, L. 2003. Bacterial diversity in the Mediterranean and the Black seas: a comparative approach. International Conference on the Sustainable Development of the Mediterranean and Black Sea Environment 1-3, Greece.
- Guerin Fauble, V., Rosso, L., Vigneulle, M. Flandrois, P.J. 1995. The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* related organisms. Journal of Applied Bacteriology, 78, 621-629.
- Gür, D. 1994. Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi. Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Güneş Kitabevi Limitet Şirketi, Ankara, 19-37.
- Ippen-Ihler, K.A., Minkley, E.G. 1986. The Conjugation System of F, the Fertility Factor of *Escherichia coli*. Annual Review of Genetics, 20, 593-624.
- Karayakar, F., Ay, Ö. 2006. Mersin Balıkçı Barınağından Yakalanan *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)'dan İzole Edilen Enterobacteriaceae Grubu Bakterilerin Bazı III. Kuşak Sefalosporinlere Karşı Plasmid Kökenli Dirençliliğin Saptanması. Ekoloji 15, 59, 32-36.
- Kaya, Y. 2009. Seyhan Baraj Gölü'nden izole edilen *Enterobacteriaceae* grubu bakterilerde antibiyotik dirençliliği ve plazmid profillerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 58s, Adana.
- Korun, J., Gökoğlu, M. 2007. *Listonella anguillarum* Isolated from Hatchery Cultured Red Porgy *Pagrus pagrus* in Turkey. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6(6),823-827.
- Korun, J., Timur, G. 2008. Marine vibriosis associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. Journal of FisheriesSciences.com (online), 2,1,66-76.
- Krause, R.M. 1992. The origin of plagues: old and new. Science,257,1073-1078.

- Küçük, M.A. 2003. Salmonella'larda antibiyotiklere direnç mekanizmaları
Erişim Tarihi: 01.01.2010.
- Kuzu, S.B. 2008. Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi
Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen
Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 82s, ADANA.
- Kuyucu, N. 2007. Antibiyotik Direnci. Çocuk Enf. Derg.; 1, 33-8.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. Bergey' s
Manual of Determinative Bacteriology. Williams&Wilkins, 485-487.
- Laganà, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zaccone, R., Delia, S. 2011. Susceptibility to
antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*
strains isolated from Italian aquaculture farms. New Microbiologica, 34,
53-63.
- Lajnef, R., Snoussi, M., Romalde, J.L., Nozha, C., Hassen, A. 2012. Comparative
study on the antibiotic susceptibility and plasmid profiles of *Vibrio*
alginolyticus strains isolated from four Tunisian marine biotopes. World
Journal of Microbiology & Biotechnology, 28, 3345–3363.
- Lunden, T., Bylund, G. 2002. Effect of Sulphadiazine and trimethoprim on the
immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary
Immunology and Immunopathology, 85, 99-108.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Meyers, J.A., Sanches, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. 1976. Simple agarose gel
electrophoretic method for the identification and characterization of
plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology, 127, 1529-1537.
- Molina-Aja, A., Garcia-Gasca, A., Abreu-Grobois, A., Bolan-Mejia, C., Roque, A.,
Gomez-Gil, B. 2002. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio*
strains isolated from cultured penaeid shrimp. FEMS Microbiology
Letters, 213, 7-12.
- Morii, H., Hayashi, N., Uramoto, K. 2003. Cloning and nucleotide sequence
analysis of the chloramphenicol resistance gene on conjugative R
plasmids from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp.
piscicida. Diseases of Aquatic Organisms, 53, 107–113.
- NCCLS, 1993. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.
5th Edition, Approved Standard, M2-A5, 13, 24, Villanova, PA.
- NCCLS, 1994. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility
Tests. 5th Informational Supplement, M100-S5, 14, 16, Villanova, PA.

- Neary, E.T., Develi, N, Yüksel, S.A. 2008. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kullanılan Aşılar Gazi Osmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(2), 29-35.
- Noga, E.J. 2000. Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Iowa State University Press, pp.367, Ames.
- Noguerola, I., Blanch, A.R. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. Journal of Applied Microbiology, 105(1), 175-85.
- Öztürk, R. 2002. Antimikrobik ilaçlara Karşı Direnç Gelişme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar. Sempozyum Dizisi No: 31, 83-100.
- Pedersen, K., Larsen, J.L. 1995. Evidence for the Existence of Distinct Populations of *Vibrio anguillarum* Serogroup O1 Based on Plasmid Contents and Ribotypes. Applied And Environmental Microbiology, 61 (6), 2292-2296.
- Pedersen, K, Tiainen, T., Larsen, J.L. 1996. Plasmid profiles restriction fragment length polymorphism and O-serotypes among *Vibrio anguillarum* isolates from cultured Sparus sarba. Marine Pollution Bulletin, 39, 245-249.
- Peggy, A.R. Francus-Floyd, R., 2002. *Vibrio* Infections of Fish. <http://edis.ifas.ufl.edu> Erişim Tarihi: 01.06. 2002.
- Reed, P.A., Francis-Floyd, R. 2013. *Vibrio* infections of fish. <http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/13/26/00001/FA03600.pdf>, Erişim Tarihi: 10.01.2013.
- Plumb, J.A. 1999. Health maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes. Iowa State University Press, pp.328, Ames, Iowa.
- Rodkhuma, C., Hironoa, I., Crosab, J.H., Aoki, T. 2005. Four Novel Hemolysin Genes Of *Vibrio anguillarum* And their Virulence To Rainbow Trout. Microbial Pathogenesis 39,109-119.
- Sørum, H., L'Abe'e-Lund, T.M., Solberg, A., Wold, A. 2003. Integron-Containing IncU R Plasmids pRAS1 and pAr-32 from the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(4), 1285-1290.
- Tanrıkul, T.T., Cagırgan, H., Toksen, E. 1996. Bacterial Diseases of Fish. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi (Balık Hastalıkları Özel sayı) 20(34), 105-127.
- Tanrıkul, T.T., Çağırhan, H., Tokşen, E. 2004. Levrek'lerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) İzole Edilen *Vibrio* Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi, 21(3-4), 243- 247.

- Tanrıkul, T. 2007. Vibriosis as an Epizootic Disease of Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*) in Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(10), 1733-1737.
- Timur, G., Timur, M. 2003. Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Yayınları. İstanbul.
- Timur, G., Korun, J. 2004. First outbreak of vibriosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. İstanbul University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18,1-9.
- Topal, A., Candan, A., Anđ-Küçüker, M., Karataş, S. 1997. Balıklardan izole edilen *Yersinia ruckeri* suşlarının plazmid profil analizleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 27,81-84.
- Tosun, M. 2010. Antimikrobik İlaçlar http://pharm.ege.edu.tr/pp/metinertosun/antimikrobiyal_tedavi_temel_kavramlar.pdf Erişim Tarihi: 10.01.2010.
- Tuncer, Y. 2005. Laktokok suşları tarafından üretilen bakteriyosinlerin tanısı ve bu özelliğın genetik doğasının belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 125 s. ANKARA
- Treves-Brown, K.M. 2000. Applied Fish Pharmacology, Aquacultures series 3, Kluwer Academic Publishers, 309pp.
- Toranzo , A.E., Barja, J.L., Hetrick, F.M. 1982. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in Eustarine and Fresh Waters. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 3,43-45.
- 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 Organism 9, 73-82.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J.L. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture, 246, 37-61.
- Türk, N. 2008. Balık Hastalıkları Konya Semineri. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü http://bornova.vet.gov.tr/PDF/sunular/Bakteriyel_Hastaliklar.pdf Erişim Tarihi: 10.01.2010.
- Vahaboğlu, H. 2004. Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel, 2: 92-96.
- Vaseeharan, B., Hussian, M.R., Chen, J.C. 2008. RpoN gene, RAPD profile, antimicrobial resistance and plasmids of *Vibrio anguillarum* isolates from vibriosis infected *Penaeus monodon*. Letters in Applied Microbiology 47,380-385.

- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan, T., Chen, J.C. 2005. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio spp.* and *Aeromonas spp.* isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. International Journal of Antimicrobial Agents, 26, 285-291.
- Vogelstein, B., Gillespie, D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 76, 615-619.
- 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. Ortaokul On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(2), 1-36.
- Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. 2009. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Fizyolojik, Biyokimyasal, Plazmit DNA ve Protein Profil Özelliklerinin İncelenmesi. Gıda, 34 (2), 91-98.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nihan GÜNLÜ
Doğum Yeri ve Yılı : Akhisar-Manisa - 1977
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : nihangunlu@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Akhisar Lisesi
Lisans : SDÜ, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü

Mesleki Deneyim

Yuvalı İÖO, Vekil Öğretmenlik,	2000-2001
Gökçehüyük İÖO, Ücretli Öğretmenlik,	2005-2007
Sarıdris İÖO, Ücretli Öğretmenlik,	2001-2005
Eğirdir Endüstri Meslek Lisesi, Denizcilik Meslek Lisesi, Su Ürünleri Bölümü, Meslek Öğretmenliği,	2009-2011