

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**TRABZON VE RİZE İLLERİ'NDE BULUNAN BAZI ALABALIK
İŞLETMELERİNDE GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLARIN TESPİTİ VE
BAZI ETKENLERİNİN ÇOKLU PCR İLE TEŞHİSİ**

DOKTORA TEZİ

Şevki KAYIŞ

AĞUSTOS 2009

TRABZON

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BALIKÇILIK TEKNOLOJİSİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**TRABZON VE RİZE İLLERİNDE BULUNAN BAZI ALABALIK
İŞLETMELERİNDE GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLARIN TESPİTİ VE
BAZI ETKENLERİNİN ÇOKLU PCR İLE TEŞHİSİ**

Şevki KAYIŞ

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“Doktor” (Balıkçılık Tek. Mühendisliği)
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13.07.2009
Tezin Savunma Tarihi : 17.08.2009**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. İlhan ALTINOK
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
Jüri Üyesi : Prof. Dr. İbrahim CENGİZLER
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Erol ÇAPKIN
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Nadir BAŞÇINAR**

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU

Trabzon 2009

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak hazırlanmıştır ve 2003K120750 kodlu proje ile Devlet Planlama Teşkilatı tarafından desteklenmiştir.

Su ürünleri yetiştiriciliği yapılan işletmelerde, bakteriyel hastalıklar nedeniyle gerek maddi ve gerekse iş gücü bakımından oldukça büyük oranda kayıplar meydana gelmektedir. Bu kayıpların önlenmesinde, hastalıkların erken teşhisi ve uygun tedavi önem arz etmektedir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde su ürünleri yetiştiriciliği yapılan işletmelerde bakteriyel balık hastalıklarının tespit edilmesi, daha kısa zamanda ve hassasiyette teşhisine olanak sağlanması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada, ayrıca tespit edilen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç seviyeleri de incelenmiştir. Bölgede bulunan işletmelerin balık hastalıklarına bakışı ve genel uygulamalarına da yer verilmiştir.

Doktora eğitimim boyunca, tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç.Dr. İlhan ALTINOK'a, laboratuvar uygulamalarında kıymetli katkıları ve her konuda desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Erol ÇAPKIN, Arş. Gör. Halis BORAN ve Arş. Gör. Serkan KORAL'a, Rize Su Ürünleri Fakültesi ve Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi'nin tüm değerli akademik ve idari personeline teşekkürlerimi sunarım. Doktora yeterlilik, tez izleme ve daha birçok konuda bizlere destek olan merhum Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ hocamıza Allah'tan rahmet diliyorum.

Her konuda desteğini hissettiğim aileme ve eşime şükranlarımı sunarım.

Şevki KAYIŞ
Temmuz 2009

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| ÖNSÖZ | II |
| İÇİNDEKİLER | III |
| ÖZET | V |
| SUMMARY | VI |
| ŞEKİL LİSTESİ | VII |
| TABLO LİSTESİ | VIII |
| 1. GENEL BİLGİLER | 1 |
| 1.1. Giriş | 1 |
| 1.2. Bakteriyel Balık Hastalıkları..... | 4 |
| 1.2.1. Yersiniosis..... | 6 |
| 1.2.2. Frankulosis | 8 |
| 1.2.3. Bakteriyel Böbrek Hastalığı | 9 |
| 1.2.4. Hareketli (Motil) Aeromonas Enfeksiyonu | 10 |
| 1.2.5. Kolumnaris Hastalığı | 11 |
| 1.3. Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Teşhis Yöntemleri | 12 |
| 1.3.1. İç ve Dış Semptomlar | 12 |
| 1.3.2. Histopatolojik Yöntem..... | 13 |
| 1.3.3. Serolojik Yöntem | 13 |
| 1.3.4. Biyokimyasal Teşhis Yöntemleri | 13 |
| 1.3.5. Moleküler Teşhis Yöntemleri..... | 14 |
| 1.3.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)..... | 14 |
| 1.3.5.2. Restriksiyon Parçacığı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)..... | 15 |
| 1.3.5.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)..... | 15 |
| 1.3.5.4. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)..... | 16 |
| 1.3.5.5. Çoklu (Multipleks) PCR (mPCR)..... | 16 |
| 1.4. Bakteriyel Balık Hastalıklarının Tedavisi..... | 17 |
| 1.5. Önceki Çalışmalar..... | 17 |
| 1.6. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı..... | 20 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2. | YAPILAN ÇALIŞMALAR..... | 23 |
| 2.1. | Balık Materyali ve Örnekleme..... | 23 |
| 2.2. | Örneklerin İşlenmesi..... | 24 |
| 2.3. | Elde Edilen Bakterilerin Morfolojik Karakterlerinin Belirlenmesi..... | 25 |
| 2.4. | İzolatların Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi..... | 25 |
| 2.5. | Antibiyoqram Testi..... | 25 |
| 2.6. | Çoklu PCR İçin DNA İzolasyonu..... | 26 |
| 2.7. | Çoklu PCR İçin Primerlerin Dizayn Edilmesi..... | 26 |
| 2.8. | Denemede Kullanılan Bakteriler ve Kültürleri..... | 27 |
| 2.9. | Çoklu PCR Şartları ve Görüntüleme..... | 28 |
| 2.10. | Çoklu PCR'nin Hassaslığının Belirlenmesi..... | 29 |
| 2.11. | Çoklu PCR Sonuçlarının Doğrulanması..... | 29 |
| 3. | BULGULAR..... | 30 |
| 3.1. | Su Parametreleri ve İşletmelerin Genel Durumu..... | 30 |
| 3.2. | Biyokimyasal Test Sonuçlarına Göre İzole Edilen Bakteriler..... | 31 |
| 3.3. | Çoklu PCR Sonuçları..... | 34 |
| 3.4. | Antibiyotik Direnç Seviyeleri..... | 36 |
| 4. | TARTIŞMA..... | 39 |
| 4.1. | Su Kriterleri | 39 |
| 4.2. | Biyokimyasal Test Sonuçları..... | 41 |
| 4.3. | Çoklu PCR Sonuçları..... | 42 |
| 4.4. | Çoklu PCR ve Biyokimyasal Yöntemin Karşılaştırılması..... | 43 |
| 4.5. | Antibiyotik Dirençleri..... | 44 |
| 5. | SONUÇLAR..... | 46 |
| 6. | ÖNERİLER..... | 48 |
| 7. | KAYNAKLAR..... | 50 |

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan 34 farklı alabalık işletmesi, 2007 ve 2008 yılları arasında bakteriyel patojenler açısından incelenmiş ve bazı etkenlerinin teşhisi amacıyla çoklu PCR protokolü oluşturulmuştur. Bu amaçla, toplam 558 balık örneklenmiş ve 40 farklı bakteri türü fenotipik olarak izole edilmiştir. Çalışmada yersiniosis, furunkulosis, vibriosis, hareketli *Aeromonas* septisemi, bakterial soğuk su hastalığı ve *Pseudomonas* enfeksiyonları kaydedilmesine karşın, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, ve *A. salmonicida salmonicida*'dan kaynaklanan enfeksiyonların oldukça yoğun olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas putida*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *P. luteola* kaynaklı enfeksiyonlara ise nadir olarak rastlanmıştır. Tür çeşitliliğine bakıldığında bakterilerin İlkbahar ve Yaz mevsimlerinde yoğunluk gösterdiği belirlenmiştir. Bakterilerin %50 den daha fazla bir kısmının ampisilin, sepholatin, eritromisin, neomisin, sulfamethokzasol ve tetrasiklin'e karşı dirençli olduğu gözlemlenirken, en etkin antibiyotiklerin oksolinik asit ve florfenikol olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyel balık patojenleri arasında önemli yeri olan *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin aynı anda teşhisine olanak sağlayacak çoklu PCR potokolü oluşturulmuştur. Bu çoklu PCR potokolü balıklarda meydana gelen doğal enfeksiyonların teşhisinde başarıyla kullanılmıştır. Fenotipik karakterlerin kullanımına dayalı metotlarla karşılaştırıldığında oluşturulan PCR potokolünün daha hassas olması bu metodun geleneksel teşhis metotlarına alternatif olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Alabalık, bakteri, mevsimsel dağılım, hastalık, PCR

SUMMARY

Bacterial fish diseases in some of the trout farms in Trabzon and Rize and identification of some of their agents by multiplex PCR

Thirty four freshwater trout farms, in The Eastern Black Sea Region of Turkey were surveyed seasonally for bacterial pathogens and diseases between 2007 and 2008. And also a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method was designed for five pathogens. A total of 558 fish were examined and 40 bacterial isolates were identified phenotypically. Yersiniosis, furunculosis, vibriosis, motile *Aeromonas* septicemia, bacterial cold water disease, and Pseudomonad infection were recorded. Infections caused by *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida salmonicida*, occurred most frequently, but only one and two outbreak of *Pseudomonas putida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *P. luteola* infection were recorded, respectively. Most of the bacteria were isolated in spring and summer. Numbers of isolated bacteria were reduced in fall and winter. The disc susceptibility pattern was fairly consistent regardless of geographic areas or year of isolation. Fifty percent or more bacteria were resistant to ampicillin, cephalothin, erythromycin, neomycin, sulfamethoxazole, and tetracycline. The most effective antibiotics were oxolinic acid and florefenicol.

A multiplex polymerase chain reaction (PCR) method was designed for the simultaneous detection of the five major fish pathogens, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum*, and *Yersinia ruckeri*. The multiplex PCR assay was useful for the detection of the bacteria in naturally infected fish. This assay is a sensitive and specific and reproducible diagnostic tool for the simultaneous detection of five pathogenic bacteria that cause disease in fish. Therefore, it could be a useful alternative to the conventional culture based method.

Key Words: Trout, bacteria, seasonality, disease, PCR

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Şekil 1. Mevsim ve sıcaklık değerlerine göre izole edilen bakteri sayıları..... | 33 |
| Şekil 2. <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Flavobacterium columnare</i> , <i>Renibacterium salmoninarum</i> ve <i>Yersinia ruckeri</i> 'nin aynı anda teşhisi için geliştirilmiş olan çoklu PCR..... | 35 |
| Şekil 3. Balık karaciğerine eklenen <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Flavobacterium columnare</i> , <i>Renibacterium salmoninarum</i> ve <i>Yersinia ruckeri</i> 'nin çoklu PCR koşullarındaki hassasiyeti..... | 36 |

TABLolar DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|------------------------|
| Tablo 1. Örnekleme takvimi..... | 23 |
| Tablo 2. <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Flavobacterium columnare</i> , <i>Renibacterium salmoninarum</i> ve <i>Yersinia ruckeri</i> 'nin aynı anda teşhisi için geliştirilmiş olan çoklu PCR protokolü..... | 28 |
| Tablo 3. Su kriterlerinin mevsimsel değerleri..... | 30 |
| Tablo 4. Alabalık işletmelerinden izole edilen bakteriler..... | 32 |
| Tablo 5. Alabalık işletmelerinden izole edilen bazı bakterilerin gösterdiği hastalık semptomları..... | 33 |
| Tablo 6. Çoklu PCR (mPCR) ve biyokimyasal testler sonucunda <i>Aeromonas</i> <i>salmonicida</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> , <i>Flavobacterium columnare</i> ve <i>Renibacterium salmoninarum</i> 'a ait bulgular..... | 35 |
| Tablo 7. İzole edilen bakterilerin antibiyotik dirençleri..... | 37 |

1.GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Su ürünleri, zengin mineral içeriği, esansiyel aminoasitleri ve yağ asitlerini ihtiva etmesinin yanında, kalp sağlığı üzerindeki olumlu etkileri gibi insan sağlığına faydalı diğer özellikleri ve gerekse lezzeti bakımından, karasal besin kaynaklarına önemli bir alternatif olarak görülmektedir (Hoşsu vd., 2001; Braun, 2005). İnsan gıdası olarak yararlanılmaya çalışılan su ürünlerinin genel olarak avcılık yoluyla elde edilmesi, bu kaynakların giderek azalmasına ve ihtiyacı karşılamayacak hale gelmesine sebep olmuştur. Bu nedenle, ihtiyacı karşılamak adına yeni avcılık politikalarının geliştirilmesini ve su ürünleri yetiştiriciliğini ön plana çıkarmıştır (Çelikkale vd., 1999; Sidhu, 2003). Su ürünleri yetiştiriciliğinin başlangıç tarihinin MÖ 2000’li yıllara dayandığı sanılmaktadır. MÖ. 475 yılında Fan Lia, sazan yetiştiriciliği ile ilgili ilk eseri yazmıştır. Gerçek anlamda su ürünleri yetiştiriciliği, 1930’lu yıllarda Danimarka ve diğer ülkelerde alabalık yetiştiriciliği ile yaygınlaşmış ve 1960-1970’li yıllarda salmon yetiştiriciliği geliştirilmeye başlanmıştır (Çelikkale vd., 1999; Hoşsu vd., 2001).

Su ürünleri yetiştiriciliği kapsamında; alabalık yetiştiriciliği dünyanın birçok ülkesinde geniş çevresel koşullar altında yapılmaktadır. Alabalıklar genel olarak Avrupa kökenli [Alp alası (*Salvelinus alpinus* L. 1758), Atlantik salmonu (*Salmo salar* L., 1758), Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811)] ve Amerika kökenli [kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis* Mitchill, 1814), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), kesikboğaz alabalık (*Oncorhynchus clarki* Richardson, 1836)] olmak üzere iki grupta toplanırlar (Emre ve Kürüm, 1998). Alabalıklar minimum 5,5 mg/l doymuş oksijen gereksinimi olan, 0-25°C’de yaşayabilen, yumurta inkübasyonu için 8-12°C ve optimum gelişme sıcaklığı olarak 15-16°C deki su ortamlarını tercih eden türlerdir. (Roberts ve Shepherd, 1997). TÜİK (2008), verilerine göre Türkiye’de 58433 tonu iç sularda, 2700 tonu denizlerde olmak üzere toplamda 61173 ton alabalık yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Ülkemizde Doğu Karadeniz Bölgesi’nde üretimi yapılan alabalık türleri içerisinde en yaygın tür gökkuşağı alabalığıdır. Bunun yanı sıra kaynak alabalığı, deniz alabalığı

ve dere alabalığı yetiştiriciliği de yapılmaktadır (Seven, 2004).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde uygun çevre şartları, su kalitesi, yem temini, pazarlama ve iş gücü sorunlarının yanında, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tatlı su ve denizlerde yapılan kültür balıkçılığında ekonomik kayıplara neden olan en önemli sorun, çeşitli hastalıkların varlığıdır (Çelikkale, 1991; Tokşen, 1999; Timur ve Timur, 2003). Balık hastalıklarının tüm dünyada su ürünleri yetiştiriciliğini sınırlandıran bir faktör olduğu ve özellikle kuluçka işletmelerinin kârını olumsuz yönde etkilediği açık bir gerçektir (Ateşoğlu, 1996). Aynı zamanda dünyada bir endüstri dalı haline gelen akuakültürde, yetiştiriciler maliyeti düşürmek için birim hacimdeki suda maksimum miktarda balık yetiştirmenin yollarını aramaktadır. Bu durum doğada serbest yaşamaya alışmış balıklarda stres nedeni olmakta ve doğal ortamda yaşayan balıklarda rastlanmayan kayıpların kültür ortamındaki balıklarda meydana gelmesine sebep olmaktadır (Tokşen, 1999). Tüm bu gerçekler dikkate alındığında meydana gelebilecek olan kayıpların engellenmesi ya da en aza indirgenmesinde balık hastalıklarından korunma ve hastalıklarla mücadelenin önemi ortaya çıkmaktadır. Balık hastalıkları ile mücadelede en önemli husus hastalıkların meydana gelmesini önlemektir. Fakat bunun ötesinde hastalık durumunda hastalığın doğru teşhis edilmesi ve ekonomik yönden en uygun tedavi yöntemlerinin uygulanması kayıpları azaltıcı en önemli etkidir. Doğru teşhis ve tedavi balık hastalıklarının yayılmasını önleyecek ve sektörün verimliliğine katkı sağlayacaktır (Ateşoğlu, 1996).

Balık sağlığını etkileyen faktörler patojenik ve patojenik olmayan etkenler olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır. Beslenme ve su kalitesinde meydana gelen olumsuzluklar balıklarda çeşitli hastalıklara sebep olmakta ve patojenik olmayan hastalıklar grubunda yer almaktadır (Plumb, 1999). Balıklarda anemi, deri renginde anormallik, yüzgeçlerde erozyon, solungaç, göz ve yüzgeçlerde kanama, solungaçların solgun olması, vücuttaki şekil bozuklukları, uyuşukluk, karaciğerde renk anormallikleri ve kanamalar gibi birçok hastalık belirtileri besinsel kaynaklı olabilmektedir (Lasee, 1995). Alabalıklarda A vitamini fazlalığının toksik etki yapabileceği, E vitamini eksikliğinin ise solungaç lamellerinin bir birine yapışmasına neden olduğu bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

Bunun yanı sıra çevresel faktörler yoğun olarak yapılan yetiştiricilikte çok büyük önem taşımaktadır. İçinde yaşadıkları sucul ortamdaki ani değişiklikler sonucunda balıklarda meydana gelen stresin nedeni, çoğunlukla çevresel faktörlerin uygun olmamasından kaynaklanmaktadır. Suda bulunan çözünmüş oksijen miktarının farklı balık

türleri için belirtilen değer aralıklarında bulunmaması balıklar için çeşitli sorunlar meydana getirmektedir. Alabalıklar için sudaki erimiş oksijenin optimum değer aralığı 6-11 mg/l olarak belirtilmiştir. Oksijen yetersizliğinde balıklarda uyuşukluk, su girişinde toplanma, su yüzeyine ani fırlamalar ve büyük balıklar öncelikli olmak üzere kitlesel ani ölümler rapor edilmiştir (Plumb, 1999). Su sıcaklığı, balıkların üreme ve beslenme gibi fizyolojik faaliyetleri üzerinde etkili olmasının yanında, amonyum ve nitrit gibi maddelerin toksisitesini etkileyen önemli çevresel kriterlerlerden biri olarak değerlendirilmektedir. Yüksek su sıcaklığının amonyum bileşiklerinin toksik etkisini artırarak, balıklarda kahverengi kan hastalığının oluşmasına zemin hazırladığı belirtilmektedir (Lasee, 1995). Işık, erimiş gazlar, pH, toksik maddelerin varlığı ve askıda katı madde miktarı gibi faktörler balık sağlığını etkileyen diğer önemli çevresel kriterler arasında yer almaktadır (Plumb, 1999).

Yapıcı etkenlerden kaynaklanan hastalıkları patojenik hastalıklar olarak adlandırılmış ve bu etkenler viral, fungal, paraziter ve bakteriyel olmak üzere dört ana grupta incelenmektedir (Roberts ve Shepherd, 1997). Viral hastalıkların, çoğu durumlarda, klinik semptom göstermeden balıklarda ölümlere sebebiyet verdiği ve bu tür hastalıkların kontrolünün sınırlı olduğu ifade edilmiştir (Lasee, 1995). Viral kaynaklı hastalıklar olarak; viral hemorajik septisemi (VHS), infeksiyöz pankreatik nekrozis (IPN), infeksiyöz hematopatik nekrozis (IHN) sayılabilir (Schaperclaus, 1992). Bunların dışında Lasee (1995), viral hastalıklar arasında genç salmonlarda görülen *Oncorhynchus masou* virus hastalığını, ayrıca golden shiner virus ve channel catfish virus gibi hastalıkları da bildirmiştir. Ülkemizde ilk olarak viral hastalık etmenlerinden IPN gökkuşağı alabalıklarından (Candan, 2002), VHS ise kalkan (*Pisetta maxima*) balıklarından (Nishizawa vd., 2006) izole edilmiştir.

Su kalite kriterlerinin bozuk olduğu balık işletmelerinde, özellikle yumurtaların gözlenme aşamasında, ölü organik materyaller üzerinde fungal organizmaların çoğaldığı ve Saprolegniasis, Brachiomycesis, Ichthyophonosis gibi hastalıkların meydana geldiği bilinmektedir (Lasee, 1995).

Su ortamında balıkların parazitler için önemli bir konakçı olduğu, bazı parazitlerin yaşam ortamı olarak hayatlarının tümünde, bazılarının da ara konakçı olarak balıkları kullandığı bildirilmiştir. Bu parazit-konakçı ilişkisinde parazitlerin balıklarda önemli ekonomik kayıplara sebep olabilecek hastalıkları meydana getirdiği de bilinmektedir. Balıklarda hastalık meydana getiren bu parazitler Protozoa, Trematodes, Nematodes,

Cestodes, Crustacea ve Leches olarak altı ana gruba ayrılmıştır (Klinger ve Floyd, 1998). Bu parazit grupları arasında su ürünleri yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde özellikle yumurtadan ilk çıkış dönemlerinde yoğun olarak ölümlere sebep olan parazitlerin protozoan parazitler olduğu bildirilmiştir (Pillay, 1995). Protozoan parazitlerden *Ichthyophthirius multifiliis* balıklarda kısa sürede çok sayıda ölümlere sebep olmaktadır (Durborow vd., 1998). Protozoan parazitlerden *Trichodina* spp. stres oluşturan çevre şartlarında su kalitesinin düşük olduğu ortamlarda, uygun olmayan rasyonla beslenen balıklarda sayıca artmakta ve ölüm ile sonuçlanacak derin solungaç ve deri lezyonlarına neden olmaktadır (Kinne, 1984). *Ambiphyra* balıklarda yoğun stok şartlarında solungaçlardaki gaz değişimini engelleyen bir protozoan parazittir (Durborow, 2003). Tavolga ve Nigrelli (1947), yaptıkları çalışma sonucunda *Ichthyobodo necator* ile enfeste olmuş kılıçkuyruk (*Xiphophorus helleri*) ve moli (*Xiphophorus maculatus*) türlerinde enfestasyon şiddetinin %40–73 oranında mortalite ile seyrettiğini bildirmişlerdir. Ege bölgesinde 1998 yılında bir çipura işletmesinde %60'lara varan yavru çipura ölümlerinin *Ichthyobodo* spp.'den kaynaklandığı belirlenmiştir (Tokşen, 2000). Sonuç olarak ülkemizde balık parazitleri ile ilgili yapılan çalışmalar değerlendirilmiş ve 2008 yılına kadar rapor edilen parazit sayısı 180 olarak bildirilmiştir (Özcelep, 2009).

1.2. Bakteriyel Balık Hastalıkları

Balıklarda patojenik olan bakterilerin, yoğun balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bilinmektedir (English vd., 1993; Austin ve Austin, 2007). Su ürünleri yetiştiriciliği yapılan ünitelerden izole edilen bakterilerin bazılarının temel hastalık etmeni olmadığı ve fırsatçı organizmalar oldukları ifade edilmektedir (Austin ve Austin, 2007). Kültür şartlarında balıklarda hastalık meydana getiren bakteriler doğal ortamda bulunan balıklardan izole edilebilmektedir. Ancak doğal ortamda bulunan balıkların stres koşullarından uzak olmaları nedeniyle bu vakaların nadiren ölümle sonuçlandığı bilinmektedir (Toronzo vd., 2005). Bakteriyel hastalık etmenleri deniz ve tatlı su yetiştiriciliği yapılan sistemlerde farklılık göstermektedir. Özellikle *Pasteurella* spp., *Vibrio* spp. ve *Piscirickettsia salmonis* gibi balık patojenlerinin deniz sistemlerinde yaygınlığı ifade edilmektedir (Toronzo vd., 2005).

Bakteriyel patojenlerin balıklarda meydana getirdiği iç ve dış klinik semptomlar balığın türü, yaşı ve hastalığın seyri ile (akut, kronik) değişmektedir. Bunun yanı sıra

Pasteurella spp. gibi bazı bakteriyel patojenlerden kaynaklanan hastalıklarda hiçbir semptom görülmeden yüksek oranda ölümler gözlemlendiği bildirilmiştir (Toronzo vd., 2005). Bakteriyel hastalıklar balıklarda, gözlerde çift ya da tek taraflı eksoptalmia, renkte kararırma, deri üzerinde lezyonlar, yüzgeçlerde erime, iştahsızlık, iç organlarda kanama ve büyüme, karaciğerde solgunluk gibi belirtiler göstermektedir (Toronzo vd., 2005; Lasee, 2005; Altinok vd., 2007)

Furunkulosis (*Aeromonas salmonicida*), vibriosis (*Vibrio* spp.), edwardsiellosis (*Edwardsiella* spp.), yersiniois (*Yesinia ruckeri*), kolumnaris (*Flavobacterium columnare*), ve bakteriyel böbrek hastalığı (*Renibacterium salmoninarum*) gibi bakteriyel kökenli hastalıklar tüm dünyada su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelerde ciddi ölümlere sebep olan başlıca hastalıklardandır (Lasee, 1995; Timur ve Timur, 2003).

Balıklarda bakteriyel bir hastalık olan pasteurellosis, gram negatif, hareketsiz bir bakteri olan *Pasteurella piscicida* tarafından meydana getirilmektedir. Su sıcaklığının 25°C'yi bulduğu ve yağmur suları ile tuzluluk oranının azaldığı durumlarda etkisinin arttığı bildirilmektedir. Genel belirtileri, böbrek ve dalakta küçük nekroz odakları, hemoraji ve iç organlarda büyümedir (Austin ve Austin, 2007).

Lactococcus garviae (sinonim; *Enterococcus seriolicida*), gram pozitif, hareketsiz, fakültatif anaerobik, H₂S gazı üreten bir bakteridir. Eldar vd. (1999), *L. garviae*'nin Avrupa, Asya ve Avustralya kıtalarında balıklarda patojen olarak yayılım gösterdiği ve gökkuşağı alabalığı, kalkan ve sarıkuyruk balıklarında mortaliteye sebep olduğu bildirilmiştir (Kusuda vd., 1991; Ceschia vd., 1992; Ghittino, ve Prearo, 1992; Palacios vd., 1993; Toranzo vd., 1994). *Lactococcus garviae* ile enfekte olmuş balıklarda eksoptalmia, abdomende şişme, bağırsak kısmında sarı renkte sıvı oluşumu, karaciğerde solgunluk, gözde, solungaçta, yüzgeç tabanında, iç organlarda ve solungaçta hemorajiler gözlemlenmiştir (Austin, 1999). Enfeksiyonların özellikle su sıcaklığının 16°C'nin üzerindeki sıcaklıklara ulaştığı yaz aylarında artış gösterdiği bilinmektedir (Vendrell, 2006).

Vibriosis birçok deniz balığı türünde ve tatlı su balıklarında görülmekle birlikte tuzlu sularda yetiştiriciliği yapılan balıkların en önemli ve en iyi bilinen hastalıklarından biri olarak tanımlanmaktadır. Balık vücudunda alt kısımlarda ve anüs civarında kızarıklık, kabarcık ve ülserlerin oluşmasıyla karakterize, bulaşıcı bir hastalıktır. *Vibrio anguillarum* başta olmak üzere, *V. ordalii*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* türleri gram negatif ve oksidaz pozitif özellik gösteren hastalığın etkeni olan türlerdir.

Vibriosis alabalık ve sazanlar dâhil hemen hemen tüm balıklarda görülmektedir (Austin ve Austin, 2007).

Salmonid balıklarda soğuk su hastalığı olarak bilinen enfeksiyonların etkeni; gram negatif, spor oluşturmeyen, kapsülsüz, aerobik veya fakültatif anaerobik, gliding hareketi yapan çomak şeklindeki bir bakteri olan *Flavobacterium psychrophilum*'dur (sinonim, *Cytophaga psychrophilum*) (Borg, 1960; Inglis vd., 1993). *Flavobacterium psychrophilum* A.B.D.'de ilk kez 1946'da juvenil gökkuşağı alabalıklarında izole edilmiştir (Inglis vd., 1993), daha sonra 1948 yılında Borg tarafından juvenil coho salmonlarda (*O. kisutch*) izole edilmiştir. Enfekte olmuş balıkların kuyruk yüzgeç sapında ve dorsal yüzgeç arkasında lezyonlar ve erimeler, balıkların renginde kararma olduğu bildirilmiştir (Inglis vd., 1993; Austin, 1999)

Türkiye'de bakteriyel balık patojenleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. ve son yıllarda ise streptokok enfeksiyonları yaygın patojenik hastalıklar olarak rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 1985; Karataş vd., 1995; Candan, 2000; Önalın, 2002; Kubılay ve Uluköy, 2004; Altınok vd., 2006; Altınok vd., 2007).

Savaş vd. (2005), Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bakteriyel böbrek hastalığının etkeni olan *R. salmoninarum*'u izole ederek Türkiye'de izole edilen patojenler arasına dâhil etmişlerdir. Ülkemizde 2006-2007 yılları arasında gerçekleştirilen çalışmalarda Doğu Karadeniz Bölgesi'nde *Pseudomonas luteola*'nın balıklarda ilk defa hastalık meydana getirdiği (Altınok vd., 2007), *P. putida*'nın da Japonya dışında ki balıklarda patojenitesinin varlığı tespit edilmiştir (Altınok vd. 2006). Yersiniosis, frunkulosis, bakteriyel böbrek hastalığı, hareketli aeromonas hastalıkları ve kolumnaris hastalığı dünyada ve Türkiye'de yaygın olarak izole edilen ve yüksek mortaliteye sebep olan bazı önemli bakteriyel hastalıklardır.

1.2.2.1. Yersiniosis

Yersiniosis hastalığının etkeni olan *Yersinia ruckeri* ilk olarak 1950 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Rucker tarafından gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Rucker, 1966). Gram negatif, hareketli, spor oluşturmeyen, oksidaz negatif, katalaz pazitif ve flagellalı olan bu bakterinin uygun olmayan su kriterleri ve aşırı stok yoğunluğunun bulunduğu yetiştiricilik işletmelerinde, balıklarda ağız ve dil üzerinde kanamalarla

karakterize olduğu bildirilmektedir (Lasee, 1995). English vd. (1993), hastalığın balıklarındaki kronik seyirinde meydana gelen semptomları, renkte kararma, uyuşukluk, deri üzerinde kanamalar ve ülserler, karaciğer, pilorik seka, hava kesesi ve iç organlar üzerinde bulunan yağlar üzerinde küçük çapta kanamalar şeklinde ifade etmişlerdir.

Yersinia ruckeri ilk olarak gökkuşuğı alabalıklarından izole edilmiştir. Ayrıca, bütün salmonidlerde hastalık meydana getirdiğı ve büyük ekonomik kayıplara sebep olduğu bilinmektedir (McDaniel, 1979; Valtonen vd., 1992; Austin ve Austin, 2007). Salmonid türlerin dışında, kalkan (*Scophthalmus maximus*), sazan (*Cyrinus carpio*), yılan balığı (*Anguilla anguilla*), mersin balığı (*Acipenser baeri*) (English vd., 1993) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) gibi türlerde de rapor edilmiştir (Savaş vd., 2006). Yersiniosis hastalığı, Avustralya, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygın olarak yayılım göstermektedir (Austin ve Austin, 2007).

Hastalığın etkeni olan *Y. ruckeri* Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ve Tryptic Soy Agar (TSA) gibi genel besi yerlerine aseptik ekimler sonucu 20-25°C de 48 saat süreyle izole edilebilmektedir. Bunun yanı sıra hem izolasyonda hem de tanımlamada *Y. ruckeri* için seçici bir besi yeri olan Shotts-Waltman Agar (SWA) yaygın olarak kullanılmaktadır (Waltman ve Shotts, 1984; Austin ve Austin, 2007). *Y. ruckeri*'nin tanımlanmasında, rutin biyokimyasal testlerin dışında, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Cossarini-Dunier, 1985) ve Analitical Profil Index (API) gibi ticari test kitlerinin kullanımı da yaygınlaşmış durumdadır (Balta vd., 2005).

Moleküler biyolojide meydana gelen gelişmeler sonucunda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla bakterilerin tür teşhisinin yapılabilir hale gelmesi, balık patojenlerinin teşhisine yönelik çalışmalara hız vermiştir. Bu bağlamda Gibello vd. (1999), gökkuşuğı alabalığı dokusundan, Altinok vd. (2001), yine gökkuşuğı alabalığının kan dokusundan *Y. ruckeri*'nin izolasyonunu PCR yöntemiyle başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

Balık patojenlerine karşı koruma amaçlı aşı çalışmaları ilk olarak 1940'lı yıllarda Duff tarafından ele alınmıştır. Daha sonraları Ross ve Klontz (1965), balıklarda yersiniosis'e karşı fenolle inaktif hale getirilmiş aşığı oral yolla başarıyla kullanmışlardır. Günümüzde yersiniosis'e karşı enjeksiyon ve immersiyon yoluyla ticari olarak aşılama yapılabilmektedir (Bullock ve Anderson, 1984; Ellis, 1988).

Bakteriyel balık hastalılarının tedavisine yönelik antimikrobiyal ajanlar günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Austin ve Austin (2007), balık patojenlerine karşı 30 farklı antibiyotiğin yaygın olarak kullanıldığını ifade etmişlerdir. Yersiniosis hastalığının

tedavisinde oksitetrasiklin (50-75mg/kg/CA/10gün), sulfamerazin (100-200mg/kg/CA/10gün) ve kloramfenikol (50-70mg/kg/CA/10gün) kullanılmaktadır (Lasee, 1995).

1.2.2.2. Frunkulosis

Frunkulosis hastalığının etkeni olan *Aeromonas salmonicida salmonicida*, ilk olarak Emmerich ve Weibel tarafından 1894 yılında, *Basillus* ismi ile Almanya'da bir alabalık işletmesinin kuluçkahanesinden izole edilmiştir. Bakteriye bugün geçerli olan *A. salmonicida salmonicida* ismi Griffin ve arkadaşları tarafından 1953 yılında verilmiş ve hastalık, ismini hasta balıklar üzerinde bulunan ve "furunkul" olarak isimlendirilen kabarcık benzeri lezyonlardan almıştır (Austin ve Austin, 2007).

Aeromonas salmonicida salmonicida fenotipik karakteristik olarak, gram negatif, fakültatif anaerobik, rod şeklinde, hareketsiz, oksidaz ve katalaz pozitif, indol, üre ve VP negatif, jelatin pozitif, ksiloz, ramnoz ve laktoz negatif, glikoz pozitif ve tirozin ya da fenilalanin bulunan katı besi yerlerinde kahverengi pigment oluşturması ile karakterize olan bir bakteridir. Balıklarda subakut ve kronik seyirde hastalık semptomları, uyuşukluk, gözde şişme, yüzgeç diplerinde kanamalar, burun ve anal açıklıkta kanlanma, deri ve kaslarda frunkuller, otopsi bulguları olarak ise karaciğerde kanamalar, dalakta büyüme ve böbrekte nekrozlar şeklinde rapor edilmiştir. Özellikle genç balıklarda su sıcaklığının yükselmesiyle (13°C'nin üzeri), hastalığın akut seyirinde renkte koyulaşma, yüzgeç diplerinde kanlanma ve balıklarda dikkat kaybı olduğu bildirilmiştir (McCarthy ve Roberts, 1980; English vd., 1993; Lasee, 1995).

Frunkulosis, Avrupa'da ilk olarak Almanya'da kahverengi alabalıklardan (*Salmo trutta*) izole edilse de, hastalık, kültürü yapılan bütün salmonid balıklar için en önemli bakteriyel hastalıklar arasında ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra, hastalığın, özellikle sazan (*Cyprinus carpio*), yılan (*Anguilla anguilla*) balıkları ve bazı yassı deniz balıkları için de önemli bir patojenik hastalık olduğu bildirilmiştir. Frunkulosis ABD, Avusturya, Japonya, Asya ve başta Belçika, İngiltere ve Fransa olmak üzere Avrupa ülkelerinde de yayılım göstermektedir (Lasee, 1995; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Hastalık etmeni bakteri TSA ve Brain Heart Infusion Agar (BHIA) gibi genel besi yerlerinde izole edilebilmektedir. API test kitleri ve serolojik teşhis yöntemi olarak ELISA yöntemi teşhis için kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 2007). Ayrıca *A. salmonicida*

salmonicida PCR (McCormick vd., 1990), plazmit profili (Bast vd., 1988; Toranzo vd., 1991, Sorum vd., 1993), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Miyata vd., 1995), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Umelo ve Trust 1998) gibi çeşitli moleküler teknikler yardımıyla teşhis edilebilmektedir.

Furunkulosis hastalığına karşı ilk ticari aşı çalışmaları 1990'lı yıllarda gerçekleştirilmiş, özellikle introperitonel aşılama ile başarılı immunitenin sağlandığı bildirilmiştir (Lillehaug vd., 1992). Hastalığın tedavisinde yeme antibiyotik ilavesi (McCarthy ve Roberts, 1980) yanında enjeksiyon yöntemiyle de (Brown ve Grant 1992) başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Kloramfenikol, furazolidon ve oksitetrasiklin furunkulosis tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler olmakla birlikte, bakterinin oksitetrasikline karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir (Tsoumas vd., 1989; Inglis vd., 1991; Grant ve Laidler 1993).

1.2.2.3. Bakteriyel Böbrek Hastalığı

Bakteriyel böbrek hastalığı *Renibacterium salmoninarum* tarafından oluşturulan bakteriyel bir hastalıktır. *R. salmoninarum* ilk olarak Ordal ve Earp (1956) tarafından tanımlanan, gram-pozitif, basil, aerobik, sitokrom oksidaz negatif, hareketsiz, şekerli besi yerlerinde gaz üretmeyen ve spor oluşturmeyen bir bakteridir. Kronik olarak özellikle böbreklerde ve diğer iç organlarda meydana gelen lezyonlarla karakterize edilmektedir (Fryer ve Sanders, 1981, Fryer ve Lannan, 1993). Optimum üreme sıcaklığı 15-18°C olan bakterinin, üreme süresinin bir kaç haftayı bulduğu, 37 °C'de ise üremediği bildirilmiştir (Sanders ve Fryer, 1980).

Hastalık ilk olarak 1930 yılında İskoçya'da Atlantik salmonlarından izole edilmiştir (Smith 1964). Genel olarak tüm salmonidlerde hastalık etmeni bakteri izole edilse de gölge balığı (*Thymallus thymallus*) ve ayu (*Plecoglossus altivelis*) gibi balıklardan da izole edilmiştir (Kettler vd., 1986). Coğrafik dağılım olarak bakıldığında bakteriyel böbrek hastalığı Amerika, Kanada, Avrupa, Asya da dağılım göstermekle birlikte salmonid türlerin yetiştiriciliğinin yapıldığı hemen her yerde izole edilebilmektedir (Fryer ve Lannan 1993). Özellikle Kuzey Amerika'da bu hastalık nedeniyle büyük oranda ölümler meydana gelmiştir (Starliper vd., 1997).

Hasta balıklarda meydana gelen dış semptomlar gözde şişme, karında sıvı birikimi, genel olarak deride renk kaybı, yüzme bozukluğu ve anal açıklığın şişmesi, otopsi

bulgularında ise karaciğerde solgunluk, böbrekte solgunluk ve şişme aynı zamanda granüler bir yapı oluşumu olarak bildirilmiştir (Bruno, 1986). Sanders vd. (1978), hastalığın şiddetinin su sıcaklığına bağlı olduğunu, en yoğun ölümlerin 6,7-12,2°C'de meydana geldiğini bildirmişlerdir. *R. salmoninarum*'un yayılımı horizontal ve vertikal yollarla gerçekleşmektedir (Allison, 1958; Fryer ve Lannan, 1993).

Renibacterium salmoninarum enfeksiyonlarının teşhisinde ilk izolasyon amacıyla Selective Kidney Disease Medium (SKDM) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu besi yerinde bakterinin 3-4 haftada çoğaldığı bildirilmiştir (Austin vd., 1983). Biyokimyasal testler, ELISA ve PCR (OIE 2003) gibi teşhis yöntemleri kullanılmakla birlikte, bakterilerin yavaş üremesi nedeniyle serolojik metodun kullanılması tavsiye edilmemiştir. (Bruno, 1988).

Tedavide etkin bir başarı sağlanamaması hastalık etmenine karşı geliştirilmeye çalışılan ümmün tepkinin oluşmasında da etkili olmuş fakat etkin bir aşı geliştirilememiştir. Bu nedenle hastalıktan korunmada en etkin yol olarak bulaşmanın önlenmesi tavsiye edilmektedir (OIE, 2003).

1.2.2.4. Hareketli (Motil) *Aeromonas* Enfeksiyonu

Hareketli aeromonas enfeksiyonları gerek yetiştiriciliği yapılan tatlı su balık türlerinde ve gerekse doğal alanlarda yaşayan balıklarda yaygın olarak rastlanan en önemli enfeksiyonlar arasında kabul edilmektedir. Hareketli aeromonas enfeksiyonlarının etkeni olan bakteriler *Aeromonas hydrophyla*, *A. sobria*, *A. cavia* ve *A. veronii* olarak ifade edilmiştir. Bu bakterilerin balıklarda çoğu durumlarda doğal olarak bulunduğu stres koşullarında hastalık meydana getirdiği bildirilmiştir. Bu bakteriler arasında özellikle *A. hydrophyla* balıklarda en yaygın patojen olarak rapor edilmektedir (Martinez-Murcia vd., 1992; Lasee, 1995).

Aeromonas hydrophyla tuzluluk oranı yüksek olmayan tüm sucul sistemlerde bulunan, flagellası sayesinde aktif hareket edebilen gram negatif, çubuk ya da çomak şeklinde, sitokrom oksidaz pozitif özellik gösteren bir bakteridir. *A. hydrophyla* ilk olarak yılan balıklarından, daha sonraları sazanlardan izole edilmiş, bunun yanı sıra balıklar dışında kurbağa ve yılanlardan da izole edildiği rapor edilmiştir. *A. hydrophyla*'nın dünyanın her yerinde yaygınlığı olan ve geniş konakçı sayısına sahip bir bakteri olduğu bildirilmektedir (Austin ve Austin, 2007).

Balıklarda yüzgeç ve kuyruk kısmında nekrozlar ve deride mantar enfestasyonlarıyla birlikte seyreden derin ülserler, gözde şişme hastalığın dış semptomları arasında yer alırken, dalakta büyüme ve solgunluk, karında sıvı birikimi ve böbrekte büyümeyle birlikte nekrozlar iç semptomlar olarak bildirilmiştir (English vd., 1993; Lasee, 1995).

Hasta balıklardan TSA ve BHIA besi yerlerine yapılan ekimler yardımıyla ilk izolasyonunun yapılabildiği bildirilmiştir. Fakat motil aeromonas etkeni olan bakteriler için selektif bir besi yeri olan Rimler Shotts agar ilk izolasyon için yaygın olarak kullanılmaktadır (Shotts ve Rimler, 1973). Bu besi yerinde meydana gelen sarı koloniler *Aeromonas* türlerinin oluşturduğu koloniler olarak ifade edilmiştir. API test kitleri ve PCR ile kolaylıkla teşhis yapılırken, yoğun antijenik yapıları nedeniyle serolojik teşhis yöntemleri *A. hydrophila*'nın teşhisi için uygun görülmemiştir (Mishra, 1998).

Aeromonas hydrophila'nın kontrolünde etkin bir aşı çalışmasının gerçekleştirilemediği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 2007). Hastalığın tedavisi amacıyla oksitetrasiklin, eritromisin, novobisin gibi çeşitli antibiyotiklerin kullanıldığı bildirilmiş, fakat etkenin antibiyotiklere direnç kazanma özelliği nedeniyle enlofoksasin gibi yeni kimyasal ajanların kullanımı tavsiye edilmiştir (Austin ve Austin, 2007).

1.2.2.5. Kolumnaris Hastalığı

Kolumnaris hastalığı ilk olarak 1922 yılında ABD'de *Bacillus columnaris* tarafından meydana getirilen bir enfeksiyon olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları 1974 yılında bakteri *Flexibacter columnare* ve *Cytophaga columnaris* olarak adlandırılmıştır. Günümüzde ise moleküler çalışmalar ışığında yapılan araştırmalar sonucunda bakteri *Flavobacterium columnare* olarak isimlendirilmiştir (Bernardet vd., 1996).

Flavobacterium columnare, besi yerinde sarı rizoid koloniler şeklinde çoğalan, gram negatif çubuk şeklinde ve kayma hareketiyle karakterize olan bir bakteridir. Kolumnaris hastalığı balıklarda çoğunlukla dış semptomlarla tanımlanmıştır. Balıkların dış yüzeylerinden alınan kazıntı örnekleriyle hazırlanmış yaş preparatlarda bakterinin mikroskop altında kolaylıkla tanımlanabildiği bildirilmiştir. Balıkların solungaç, deri ve yüzgeçlerinde kahverengi-sarımsı lezyonlar, solungaç filamentlerinde nekrozlar, dorsal yüzgeç ve kuyrukta erimeler hastalığın en önemli semptomlarıdır. Bunun yanı sıra enfeksiyon nedeniyle balıklarda hiç bir semptom görülmeden kısa sürede ölümlerin gözlemlendiği bildirilmiştir (Durborow vd., 1998).

Hastalık etkeni hemen hemen bütün alabalık türlerinden izole edilmesinin dışında, kanal yayın (*Ictalurus punctatus*), mersin (*Acipenser baeri*), sazan (*Cyprinus carpio*) ve japon (*Carassius auratus*) balıklarından da izole edilmiştir (MacFarlane vd., 1986; Brun vd., 1991; Wakabayashi, 1993; Decostere vd., 1998; Plumb, 1999). Hastalığın oluşmasında stres koşullarının önemli olduğu vurgulanmıştır. Kolunmaris hastalığı dünyanın hemen her yerinde rapor edilmiş bir hastalıktır (Wakabayashi, 1993; Plumb, 1999).

Flavobacterium columnare'nin teşhisi, içerik yönünden zengin olmayan besiyerlerinde (Anacker ve Ordal, 1955) kültür ortamında izolasyonu, biyokimyasal testler ile tanımlama ve moleküler teşhis yöntemlerinin (Tiirola vd., 2002; Wiklund, 2008) kullanımı şeklinde gerçekleştirilebildiği gibi, balıkların dış yüzeylerinden alınan örneklerin direk mikroskop altında incelenmesi ile de teşhis edildiği bildirilmiştir.

Flavobacterium columnare için aşı geliştirme çabalarının günümüzde devam ettiği bildirilmektedir. Hastalık etkeni bakterinin daha çok balıkların dış yüzeyinde yoğunlukta olması nedeniyle tedavide bakır sülfat (CuSO₄), tuz, potasyum permanganat (KMnO₄) ve kloramin-T'nin kullanıldığı, bunun yanı sıra oral yolla tedavide oksitetrasiklin, oksolinik asit ve sulfadiazin gibi antibiyotiklere yer verildiği rapor edilmiştir (Wakabayashi, 1993; Altinok ve Grizzle, 2001; Altinok, 2004).

1.2.1. Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Teşhis Yöntemleri

Bakteriyel patojenlerin teşhisinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1.2.1.1. İç ve Dış Semptomlar

Hasta balıklarda meydana gelen iç ve dış semptomlar hastalık etmeni bakterilerin teşhisinde yol gösterici olarak kabul edilmektedir. Balık hareketinde meydana gelen değişimler, renkte değişim, göz hasarları, deride ve iç organlarda kanamalar, yüzgeçlerde ve ağızda erime, karında şişme, nekroz ve ülserler, solungaç hasarları, iç organlarda büyüme ya da küçülmeler hastalıklar için belirleyici semptomlar olarak ifade edilmektedir. Ancak bu semptomlar çoğu hastalıkta ortaya çıkabilecek belirtiler olduğundan tam bir sonuca gidilememektedir (Austin ve Austin, 2007).

1.2.1.2. Histopatolojik Yöntem

Histolojik teşhis yöntemi, ölmek üzere olan balıklardan alınan örneklerin fiksee edilerek kesitlerinin alınması ve hematoksilin, eozin gibi uygun boyalarla boyanarak dokulara verilen zararların incelenmesi şeklinde gerçekleştirilen bir yöntemdir (Luna, 1968). Ancak daha önce belirtildiği gibi hastalık etmenlerinin çoğunlukla dokularda aynı etkiyi göstermeleri ve hücrelerin otolize uğramaları her zaman kesin teşhise olanak vermemektedir. Ayrıca teşhis için geçen süre uzun bir zaman almaktadır (Atkinson, 1992).

1.2.1.3. Serolojik Yöntem

Bakterilerin serolojik teşhis yöntemleri antikor ve antijen ilişkisine dayalı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. En yaygın olarak bilinen serolojik yöntemler ELISA ve Fluorescent Antibody Technigue (FAT) olarak isimlendirilen tekniklerdir. ELISA teknikleri, antijen ve antikor saptamak için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. *Renibacterium salmoninarum*, *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio vulnificus*, *Mycobacterium* spp. gibi bir çok balık patojeninin bu tekniklerle teşhisinin mümkün olduğunu bildirilmiştir (Cossarini-Dunier, 1985; Hsu vd., 1991; Biosca vd., 1997). Birçok laboratuvar enfeksiyon hastalıkların tanısı veya endokrinoloji sahasında kendi amaçlarına yönelik ELISA sistemleri geliştirmiştir, ancak bu tekniklerin uluslararası standardizasyonu ve geçerliliği tam olarak gerçekleşmemiştir. Bu nedenle ELISA protokollerinin ve testlerde kullanılan kimyasal maddelerin uluslararası standardizasyonu gerekmektedir (Çırak, 1999).

1.2.1.4. Biyokimyasal Teşhis Yöntemleri

Tüm dünyada kullanılan en yaygın yöntem olan bu teşhis yöntemi yeni ölmüş ya da ölmekte olan balıklardan alınan örneklerin katı besi yeri üzerinde saf kültürlerinin elde edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. İleri aşamalarda bu bakteri kültürlerine biyokimyasal testlerin uygulanması ile bakterinin teşhisi sağlanabilmektedir (Bernardet vd., 1990). Mikroorganizmaların çeşitli karbon kaynaklarını (şekerler, alkoller, aminoasitler, deterjanlar) enerji kaynağı olarak kullanmaları ve bu durum sonucu oluşan farklılıkların tanı amacıyla kullanılması esasına dayalı bir metottur. Bu amaçla 1980'li yıllarda birçok

biyokimyasal testi bir arada barındıran test panel sistemleri geliştirilmiştir. Analytical Profil Index (API), bu sistemler içerisinde en yaygın, hızlı ve etkin olarak kullanılan sistemler arasında görülmektedir (Amandi vd., 1982). Ancak bu sistemlerin daha çok insan patojenleri için geliştirilmiş olması uygulamada bazı yanılgılara sebep olmaktadır.

Fenotipik teşhis yöntemi olarak da ifade edilen bu tanı yönteminde bakterilerin koloni morfolojisi, gram boyama, hareket gibi özelliklerinin yanı sıra, katalaz, oksidaz, indol, üre, metil red, voges proskauer, eskülin, sitrat, arjinin, ornitin, lizin, mannitol, glikoz, sukroz, mannoz gibi testler kullanılmaktadır. Balık patojeni olan birçok bakteri bu yöntemle teşhis edilebilmektedir. Bazı balık patojeni bakteriler için selektif olan besi yerleri geliştirilmiştir. Bakteriye böbrek hastalığının etmeni *Renibacterium salmoninarum* için Selective Kidney Disease Medium (SKMD), *Vibrio* spp. için Thiosulphata Sitrata Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) bu tür besi yerleridir (Austin ve Austin, 2007).

1.2.1.5. Moleküler Teşhis Yöntemleri

Moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte patojenik balık hastalıklarının teşhisinde moleküler biyolojinin yaygın olarak kullanılması hastalıkların epidemiyolojisinde ve kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Prichard ve Tait, 2001; Altinok ve Kurt, 2003).

1.2.1.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA'ya bağlı teşhis metodu genellikle patojen türlere ait özel nükleik asit problemlerinin kullanımıyla yapılmaktadır. Hedef gen miktarı çok az olduğundan patojen teşhisindeki hassaslığı artırmak için gen parçasının çoğaltılması gerekmektedir. Bu amaç için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) en iyi bilinen tekniklerden birisi olup (Mullis, ve Faloona, 1987) bir çok balık patojeni bu teknik kullanılarak teşhis edilmektedir (Cunningham, 2002; Altinok ve Kurt, 2003). Bu metot, izole edilen hedef genetik materyalin spesifik kısa oligonükleotid primerler ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi yardımı ile in vitro koşullarda sayısal (amplifikasyonu) olarak çoğaltılması esasına dayanır. Çeşitli PCR teknikleri balık patojenlerinin ve kabuklu su ürünlerinde bulunan bir çok patojenin teşhisinde ve tür ayrımında kullanılmaktadır (Gustafson vd., 1992; Hiney vd., 1997; Brown vd., 1994; Aoki ve Hirono, 1995; Cascon vd., 1996; Patel vd., 1997; Bader

ve Shotts, 1998; Marshall vd., 1998; Zlotkin vd., 1998; Osorio vd., 1999; Ripabelli vd., 1999; Altinok vd., 2001).

1.2.1.5.2. Restriksiyon Parçacığı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Son yıllarda yaygın olarak kullanılan moleküler metotlardan birisi de Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) uygulamalarıdır. Bu metot ile türlerin, kendilerine has genetik özellikleri kullanılarak ayrımları yapılabilmektedir. Taze, dondurulmuş ve hatta işlenmiş örneklerin hangi orijinden olduğu, morfolojik olarak birbirine çok benzeyen canlılarının birbirlerinden farklılıkları tespit edilebilir. Ayrıca bu yöntem taksonomik açıdan yaşanan sıkıntıların giderilmesinde ve mutasyon tespitinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla organizmadan alınan doku örneğinden toplam DNA izole edilir. Bu ürünün nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince çok özel olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforezde ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla etiketlenmesi esasına dayanır. RFLP uygulamalarında kullanılacak 3000 civarında restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Bu yöntem basit, hızlı, düşük maliyetli ve güvenilirdir (Smith vd., 1990; Dudley vd., 1991; Messmer vd., 1993; Benchimol vd., 2000; Altinok ve Kurt, 2003).

1.2.1.5.3. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizminin üretimi, restriksiyon enzimi ile parçalara ayrılmış DNA parçalarının seçici çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntemde hem kesici enzimler hem de PCR aynı anda kullanılır. Poliakrilamid jelde analizi sonucunda bantların yoğunluğuna bakarak bireyler ayrılabilir. Minimum primer testi ile çok sayıda markır üretmesi ve yüksek çözünürlüğü, bu teknolojiyi çekici kılmaktadır. Pahalı olmasından dolayı, bu teknolojinin otomasyonu gerekmektedir (Zabeau ve Vos, 1993; Altinok ve Kurt, 2003).

1.2.1.5.4. Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun keşfi ile DNA polimorfizm araştıran yeni markır sistemleri ortaya koyulmuştur. Williams vd. (1990), tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniğı basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rasgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır. Bu teknikte 6–10 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA çoğaltımı yapılır. RAPD tekniğı; çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması bakımından popüler hale gelmiştir. Ayrıca polimorfizm oranı da çok yüksektir. Tekniğın dezavantajları ise güvenilirliğın çok sınırlı olması, tekrarlanabilirliğın düşük olmasıdır (Altınok ve Kurt, 2003).

1.2.1.5.5. Çoklu (Multipleks) PCR (mPCR)

Klasik PCR'nin modifikasyonu ile iki veya daha fazla farklı PCR amplifikasyonunun aynı reaksiyonda gerçekleştirilmesine dayalı bir metottur. Klasik PCR ile aynı basamaklarda gerçekleşir, fakat her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılır. Çoklu PCR ile daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonu gerçekleştirildiğinden kullanışlı bir inceleme yöntemi olmakla birlikte önemli derecede optimizasyon gerektirir. Değışik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi primerlerin bağlanma ısılarının birbirine uygun olması, birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri gibi bazı önemli şartlar sağlanmalıdır. Farklı primer çiftlerinin en iyi konsantrasyonlarının seçimi ve istenmeyen çoğalmaların önlenmesi amacıyla birçok denemenin yapılmasını gerektirmektedir. Ancak istenen şartların sağlanması durumunda gerek maliyetin düşürülmesi ve gerekse zaman ve iş gücü kazancı nedeniyle bir çok alanda çok kullanışlı ve güvenli bir teşhis metodudur (Chamberlain vd., 1988; Chamberlain vd., 1989).

1.3. Bakteriyel Balık Hastalıklarının Tedavisi

İnsanlarda, evcil hayvanlarda ve balıklarda görülen bakteriyel hastalıkların kontrolünde ve tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak yer almaktadır (Walton 1992). Hayvansal üretimde antibiyotikler hayvanları hastalıktan korumak için kullanıldığı gibi et hayvanlarının büyüme hızını artırmak, yem değerlendirmesini iyileştirmek ve hastalıklardan korunmak için düşük oranlarda yemlere katılarak uzun süreli kullanılmaktadır (Chopra 1994).

Antibiyotikler bakteriler üzerinde hücre duvarı sentezini baskılama, protein sentezi inhibitörleri, nükleik asitlerin fonksiyonunu bozma, metabolizmayı olumsuz etkileme gibi etkileri olan maddelerdir. Balık yetiştiriciliğinde oksitetrasiklin, eritromisin, kanamisin, furazolidon, kloramfenikol ve sulfanamidler gibi antibiyotikler kullanılmaktadır (Smith vd 1994). Antibiyotiklerin kanserojen ve alerjik etkileri, rezidü ve direnç oluşumu gibi sorunları nedeniyle kullanımlarında sınırlama yapılmaktadır. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı'nın yayınlamış olduğu 2377/90 sayılı yönetmeliğin EK-2 bölümünde belirtildiğine göre furazolidon, furaldaton, nitro-furazon, kloramfenikol, tiamfenikol, ronidazol ve dapson gibi antibiyotikler kültür balıkçılığında kullanımı yasaklı maddelerdir. Ayrıca Food and Drug Administration (FDA, ABD) eritromisin, amoksisilin, neomisin ve kanamisin gibi antibiyotiklerin kullanımını tavsiye etmemektedir. Balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler genellikle yeme ilave edilerek oral yolla kullanılır. Bunun yanı sıra enjeksiyon ve banyo yoluyla kullanımları da söz konusudur (Yanong, 2006).

1.4. Önceki Çalışmalar

Balık patojenleri ile ilgili çalışmalar özellikle kültür balıkçılığının gelişimi ve yaygınlaşmasına paralel olarak yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda gerek dünyada ve gerekse Türkiye'de balıklarda patojen olan bakteriler ile ilgili bir çok çalışma mevcut olup, bu çalışmalar teşhis metotları, tedavi yöntemleri ve patojenlerin dağılımları gibi alanlarda farklılık göstermektedir (McCarthy and Roberts, 1980; Timur ve Timur, 1985; Toranzo, 1991; Karataş vd., 1995; Valtonen vd., 1992; Candan, 2000; Savaş vd., 2006; Altinok vd., 2006; Altinok vd., 2007). Bakteriyel balık hastalıkları konusunu geniş bir şekilde irdeleyen ve konu ile ilgili bir çok araştırmayı bünyesinde barındıran temel derleme çalışmaları

gerçekleştirilmiştir (Lasee, 1995; English vd., 1993; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

Toranzo vd. (2005), denizel sistemlerde yetiştiriciliği yapılan balıklarda patojen olan *Listonella anguillarum* (*Vibrio anguillarum*), *Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio viscosus*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Pasteurella skyensis*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flexibacter maritimus*, *Lactococcus garvieae* (*Enterococcus seriolicida*), *Streptococcus iniae* ve *Renibacterium salmoninarum* gibi birçok bakterinin biyokimyasal, serolojik ve moleküler tekniklere dayalı teşhis yöntemleri ile ilgili bilgi vermiştir.

Çalışmaya konu olan *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin fenotipik özellikleri bir çok çalışmada belirtilmiştir (McCarthy ve Roberts, 1980; Fryer ve Sanders, 1981; Carnahan vd., 1991; English vd., 1993; Tirola vd., 2002). Popovic vd. (2007), *Aeromonas hydrophyla*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Photobacterium damsela*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens/putida*, *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum* ve *Yersinia ruckeri* gibi bakteriyel balık patojenlerinin API 20E panel sistemiyle teşhisini araştırmış, *Aeromonas* türleri için VP, arabinoz, jelatin ve lizin testlerinde yanlış sonuçlar verebildiğini, ancak özellikle *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella tarda* ve *V. anguillarum* için güvenli bir teşhis yöntemi olduğunu bildirmiştir. Buna ek olarak *Y. ruckeri* suşlarının API 20E panel test sistemleriyle yapılan tanımlamasında *Hafnia alvei* ile benzer özellikler gösterdiği bildirilmektedir (Santos vd., 1993).

Türkiye'de bakteriyel balık patojenlerinin biyokimyasal yöntemlere dayalı teşhisine yönelik çalışmalar 1980'li yıllarda kültür balıkçılığının ilk yıllarında başlamış ve özellikle 1990 yılından sonra su ürünleri sektörüne paralel olarak hızlı bir ivme kazanmıştır. Bu yıllarda Timur ve Timur (1981), ilk olarak Türkiye'de *Yersinia ruckeri*'nin alabalıklardan izolasyonunu gerçekleştirmiştir. Bunu takip eden yıllarda ülkemizde *Pasteurella piscicida* (Çağırğan, 1993), *Aeromonas hydrophyla* (Candan vd., 1994), *Aeromonas salmonicida* (Timur vd., 1996), Vibriosis (Candan, 2000; Tanrıkuş vd., 2004), *Flavobacterium psychrophilum* (Timur vd., 2004), *Pseudomonas septisemisi* (Akaylı ve Timur, 2004), *Renibacterium salmoninarum* (Savaş vd., 2005), *Pseudomonas putida* (Altınok vd., 2006), *Pseudomonas leteola* (Altınok vd., 2007) gibi bir çok balık patojeni bakteri türü gerek

klasik biyokimyasal teşhis yöntemleri ve gerekse API panel sistemleri yardımıyla izole edilmiştir.

Günümüzde birçok bakteriyel balık patojeni besi yerlerinde kültürü yapılmadan teşhis edilebilmektedir (Brauns vd., 1991). Polimeraz zincir reaksiyonu ve diğer moleküler teknikler yardımıyla, *R. salmoninarum* (Brown vd., 1994); *A. hydrophila* (Cascon vd., 1996); *A. salmonicida* (Hiney vd., 1992); *Vibrio anguillarum* (Hirono vd., 1996), *Ph. damsela* subspecies *piscicida*, (Aoki vd., 1995), *Y. ruckeri* (Argenton vd., 1996; Gibello vd., 1999; Altınok vd., 2000), *L. garvieae* (Zlotkin vd., 1998), *Flavobacterium* (Izumi ve Wakabayashi, 2000) ve *Mycobacterium* (Patel vd., 1997) gibi bir çok balık patojeni bakterinin teşhis edildiği bildirilmiştir.

Son yıllarda geleneksel PCR yönteminin dışında çoklu PCR uygulamaları balık patojenlerinin teşhisine yönelik çalışmalarda yer almıştır. Gonzalez vd. (2004), denizel sistemlerde balıklarda ciddi kayıpların oluşmasında etkin rolü olan beş farklı bakterinin (*V. vulnificus*, *Listonella anguillarum*, *Ph. damsela* subsp. *damsela*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ve *V. parahaemolyticus*) çoklu PCR yöntemiyle tanımlanmasına olanak sağlayan bir protokol geliştirmişlerdir. Yine Cerro vd. (2002), *A. salmonicida*, *F. psychrophilum* ve *Y. ruckeri* bakterilerine ait çoklu PCR protokolü gerçekleştirmişler ve bu protokolün balık işletmelerinde meydana gelen enfeksiyonlarda teşhis amacıyla güvenle kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Mata vd. (2004), balıklarda görülen kok enfeksiyonlarının etkeni olan dört farklı (*Streptococcus iniae*, *Streptococcus difficilis*, *Streptococcus parauberis* ve *Lactococcus garvieae*), Hussein ve Hatai (2006), ise üç farklı (*Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactia* ve *Lactococcus garvieae*) bakterinin aynı anda teşhisine olanak sağlayan çoklu PCR protokolü geliştirmişlerdir.

Ülkemizde bakteriler ile ilgili çoklu PCR çalışmaları su ürünlerinden daha çok, insan patojeni olan bakteri gruplarını ya da büyükbaş hayvanlarda hastalık yapan patojenleri kapsayacak şekilde yürütülmüştür. Hasde vd. (2002), çoklu PCR yöntemiyle Ankara Garnizonu içerisinde bulunan askeri birliklere ait kuyu sularının mikrobiyolojik analizini gerçekleştirmişlerdir. İlgili çalışmada termotoleran (toplam) koliform, *Escherichia coli*, *Shigella* ve *Salmonella* bakterilerini çoklu PCR yöntemiyle aynı anda tespit etmişlerdir. Altay vd. (2008), sığırlarda patojen iki protozoan parazit olan *Theileria annulata* ve *Theileria buffeli*'nin teşhisine olanak sağlayan çoklu PCR protokolünü, başarıyla uygulamışlardır.

Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisine olanak sağlayan antibiyotiklerin kullanımı oldukça yaygındır. Antimikrobiyal ürünlerin su ürünlerinde kullanımı 1940'lı yıllara dayanmaktadır. Daha sonraları 1950 ve 1985 yılları arasında geçen sürede sülfadiazin, kloramfenikol, oksitetrasiklin, kanamisin, nifurprazin, oksolinik asit, flumeguin gibi birçok antibiyotik bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır (Austin ve Austin, 2007). Gerek Avrupa Birliği ve gerekse ABD'de bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç nedeniyle antibiyotik kullanımı sınırlandırılmış, aşı ve hastalıkların oluşumunun engellenmesine yönelik çalışmalar gündeme gelmiştir.

Bu bağlamda bakterilerin antibiyotiklere karşı oluşturdıkları direncin belirlenmesine yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. Kırkan vd. (2006), balık patojeni olan 39 bakteriyel suşun (*Yersinia ruckeri*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida*) siprofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol, tetrasiklin ve eritromisin'e karşı duyarlılığını incelemişler ve bütün bakterilerin in vitro koşullarda siprofloksasine karşı duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Öztürk vd. (2007), sazan balıklarından izole ettikleri *Aeromonas hydrophyla*'nın meydana getirdiği enfeksiyonunun tedavisinde bakterinin danofloksasin, enrofloksasin, gentamisin, siprofloksasin, neomisin ve trimetoprim-sulfametoksazol'e karşı hassas olduğunu, fakat ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, oksitetrasiklin ve streptomisine karşı dirençli olduğunu rapor etmiştir. Yine *Aeromonas* spp. üzerinde yapılan bir diğer çalışmada bakterilerin ampisilin, kloramfenikol, oksasilin ve penisilin'e karşı dirençli oldukları, fakat en yüksek direnç oranının %88,5 ile novobiosin'e karşı olduğu bildirilmiştir (Orozova vd., 2008).

Akşit ve Kum (2008), Ege Bölgesi'nde gökkuşağı alabalıkları üzerinde yaptıkları çalışmada, balıklarda patojen olan *A. salmonicida*, *L. garvieae*, *V. anguillarum* ve *Y. ruckeri* bakterilerini izole etmişlerdir. Aynı çalışmada hastalık etkeni tüm bakterilerin enrofloksasin, florfenikol ve siprofloksasine duyarlı oldukları tespit edilmiş, diğer yandan bazı etkenlerin amoksisilin, ampisilin, basitrasin, eritromisin, fusidik asit, gentamisin, kloramfenikol, linkomisin, nalidiksik asit, neomisin, novobiosin, oksitetraiklin, sefoksitin ve sulfametoksazol-trimetoprim'e karşı değişen oranlarda dirençli oldukları belirlenmiştir.

1.5. Çalışmanın Gerekçesi ve Amacı

Balık hastalıklarının teşhisi amacıyla biyokimyasal metotların kullanımı için bakterilerin besi yerlerinde çoğaltılması gerekmektedir. Ancak bazı durumlarda

bakterilerin agar üzerinde kültürü yapılamamakta veya kültürü yapılabilen bazı bakteriler biyokimyasal testlerde kendisine fenotipik olarak yakın bakterilerden ayrılamamaktadır (Shewan ve McMeekin, 1983). Bazı patojenik bakterilerin balık bünyesinde bulunmasına karşılık yapılan kültür çalışmalarında izole edilememesi karşılaşılan muhtemel bir durumdur (Cornick vd., 1969; Pickup vd., 1996). Besi yerlerinde bakteri kültür tekniği, bakterilerin teşhisinde uzun bir zaman dilimi almakta ve yeterince hassas olmamaktadır. Bu durum erken teşhis ve hızlı sağaltım müdahalesini olanaksız hale getirmekte ve büyük sorun oluşturmaktadır (Argenton vd., 1996).

Son zamanlarda moleküler tekniklerden PCR balık patojenlerinin teşhisinde kullanılmakta hatta geleneksel PCR geliştirilerek çoklu PCR'a (mPCR) dönüştürülerek, aynı reaksiyonda birden fazla patojenin ya da hedef genin varlığı saptanabilmektedir (Chamberlain vd., 1988; Edwards ve Gibbs, 1994; Henegariu vd., 1997; Elnifro vd., 2000; Call vd., 2003). Çoklu PCR ile aynı genetik materyal kullanılırken genel olarak masraf, işçilik ve artırmak istenilen ürünlerin diğer materyallerle kontamine olma riski azaltılmaktadır (Burgart vd., 1992). Canlılarda veya ortamda bulunan mikroorganizmaların teşhisinde mPCR kullanıldığında klasik PCR'a nazaran hassaslığı azaldığı rapor edilse de (Becker vd., 1998), mPCR için optimum şartlar oluşturularak hassaslığı artırılabilir (Choppa vd., 1998).

Bakteriyel hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz bir şekilde kullanımı bir taraftan tedavide başarı sağlarken, diğer taraftan enfeksiyona neden olan bakterilerde, kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde ve hızlı bir şekilde direnç gelişimine neden olmaktadır (Mach ve Grimes 1982). Bunun sonucunda da antibiyotiklere karşı dirençli bakteri sayısı gittikçe artmakta ve bakteriyel hastalıkların antibiyotikle tedavisi zorlaşmaktadır (Saitanu vd., 1994; Andersen ve Sandaa, 1994; Cizman, 2003). Oluşan direnç sebebiyle çiftliklerde uygulanan antibiyotik tedavilerinin %32,7'si sonuçsuz kalmakta (Üstündağ vd., 2000), antibiyotiğe dirençli bakterilerin plazmit yoluyla direnç genini sucul ortamdaki bakterilerden insanları enfekte eden bakterilere taşıması nedeniyle insan sağlığı açısından büyük riskler oluşmaktadır (Sobecky vd., 1997). Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan alabalık işletmelerinde patojen ve patojen olmayan bakterileri tespit etmek ve mevsimsel dağılımlarını belirlemek.

2. *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophyla*, *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Flavobacterium columnare*'nin kısa zamanda, daha az maliyetle ve kesin teşhisine olanak sağlayacak çoklu PCR protokolü oluşturmak.

3. Biyokimyasal yöntemlerle çoklu PCR yöntemi sonucunda elde edilen verileri karşılaştırmak.

4. İzole edilen bakterilerin bazı antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç seviyelerini tespit etmek.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Balık Materyali ve Örnekleme

Örnekleme çalışmaları, 2007–2008 yılları arasında Doğu Karadeniz Bölgesi'nde 39° 43'-40° 31' doğu meridyenleri ile, 41° 00'-42° 18' kuzey paralelleri arasında yer alan Trabzon (20 adet) ve Rize (14 adet) illerinde faaliyet gösteren alabalık çiftliklerinden her mevsimi kapsayacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapılan örneklemlerin ayrıntıları Tablo 1'de özetlenmiştir. Bunun yanı sıra hastalık durumlarında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Bölümü bünyesinde bulunan Prof. Dr. İbrahim OKUMUŞ Yetiştiricilik Ünitesi ve Rize Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi, İyidere Araştırma Biriminden de örnek temin edilmiştir. Örnekleme yapılacak işletmelerin belirlenmesi aşamasında mümkün olduğunca farklı havzalarda bulunan işletmeler tercih edilmiştir.

Tablo 1. Örnekleme takvimi. O: Ocak, Ş: Şubat, M: Mart, N: Nisan, MA: Mayıs, H: Haziran, T: Temmuz, A: Ağustos, E: Eylül, EK: Ekim, K: Kasım, AR: Aralık

| Yıl | Aylar | | | | | | | | | | | |
|------|--------------|---|---|----------------|----|---|---|---------------|---|----|---|----|
| | O | Ş | M | N | MA | H | T | A | E | EK | K | AR |
| 2007 | I. ÖRNEKLEME | | | | | | | | | | | |
| 2007 | | | | | | | | II. ÖRNEKLEME | | | | |
| 2008 | | | | III. ÖRNEKLEME | | | | | | | | |

Araştırma genelinde rutin olarak örnekleme yapılan 34 işletmeden her bir örneklemede 3–15 adet, 5–250 g ağırlık aralığında balıklardan toplamda 558 balık alınmıştır. Örneklerin çoğunluğunu, gökkuşağı alabalığı (540) oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra kaynak (6), deniz (5) ve dere (7) alabalıkları da örneklenmiştir. Örnekleme yapılırken hastalık belirtisi olan balıkların seçimine dikkat edilmiş ve balıklar havuzlardan kepçe yardımıyla alınmıştır.

İşletmelerden alınan balıklarda otolizin geciktirilmesi amacıyla örnekler buz kalıpları içerisinde buz ile temas etmeyecek şekilde laboratuvar ortamına taşınmıştır. Yetiştiricilik yapılan ünitelerin su kriterlerini belirlemek amacı ile sıcaklık, çözünmüş oksijen (WTW Oxi 330i oksijen metre) ve pH (WTW pH 330i pH metre) değerleri yerinde ölçülmüştür.

Bu örnekleme sırasında işletmelerin balık sağlığı ve muhafazası konusuna bakışları ve bu konu ile ilgili genel uygulamaları hakkında yerinde bilgi edinilmiştir.

Ayrıca Doğu Karadeniz Bölgesi'nden 1999-2007 yılları arasında ve 2007 yılında Batı Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Zonguldak ilinde yetiştiriciliği yapılan alabalıklardan izole edilen, fakat tanımlanmamış, saf olarak -70°C 'de muhafaza edilmiş, orijinleri (hangi işletmeden ve hangi tarihte izole edildiği) ve diğer bilgileri kayıt altına alınmış 30 farklı izolat da çalışmaya dâhil edilmiştir. Bu bakteriler, izole edildiği balıklardan doku örnekleri alınmamış olmasından dolayı çoklu PCR ile kültür metodunun karşılaştırılmasında dikkate alınmamıştır.

2.2. Örneklerin İşlenmesi

Laboratuara getirilen balıkların dış yüzeyi ortamdan kaynaklanabilecek kontaminasyonun önlenmesi amacıyla %70'lik alkol çözeltisiyle temizlenmiştir. Bu işlem öncesinde *Flavobacterium* spp.'nin varlığının araştırılmasında balıkların derileri ve solungaçlarından kazıntı örnekleri alınmıştır.

Balıkların iç organlarından (böbrek, karaciğer ve dalak), solungaçlarından ve derilerinden steril olarak, nütrient agar (NA), triptik soy agar (TSA), cytophaga agar, Hsu-Shott, Ordal agar ve Selective Kidney Disease Medium (SKDM) gibi besi yerlerine öze yardımıyla ekimler yapılmıştır (Grizzle vd., 2003). Ekim sonuçları 22°C 'de 24 ve 48 saat süreyle takip edilirken, *Renibacterium salmoninarum* için yapılan ekimler ise 15°C 'de 21 gün bekletilmiştir. Besi yerlerinde izole edilen bakteriler daha sonra çalışılmak üzere saf olarak %15 gliserol içeren tüpler içerisinde -70°C 'de stoklanmıştır. Aynı balıkların, iç ve dış organlarından oluşan 0,5 g'lık karışımlar ayrı ayrı lizis tampon çözeltisine konularak 5 μL proteinaz K solüsyonu eklenmiş ve DNA eldesi amacıyla analiz yapılana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir (Altınok vd., 2001).

2.3. Elde Edilen Bakterilerin Morfolojik Karakterlerinin Belirlenmesi

Bakterilerin katı besi yerlerinde oluşturdukları koloni şekli ve renk incelenmiştir. Bu amaçla *Vibrio* spp. için selektif bir besi yeri olan thiosulfat sitrat bile sucroz (TCBS), *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp. için *Pseudomonas – Aeromonas* seçici (GSP) agar, *Yersinia* spp. için Shotts-Waltman (SW) agar, ve *Aeromonas salmonicida* için triptik soy agar (TSA) besi yerleri kullanılmıştır. GSP agarda sarı renk oluşturan koloniler *Aeromonas* spp., mor renk veren koloniler *Pseudomonas* spp, SW agarda buzlu cam görüntüsü veren beyaz renkte koloniler *Yersinia ruckeri* ve Ordal ve Hsu Shotts agarda sarı-kahverengimsi koloniler ise *Flavobacterium* spp. olarak kabul edilmiş olup bu yönde biyokimyasal testler yapılmıştır. Bakterilerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gram boyama yapılmıştır. İzolatların hareketli olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla Glikoz Motility Deep (GMD) besi yeri ve ayrıca lam üzerinde mikroskopta inceleme gerçekleştirilmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992; Lasee, 1995).

2.4. İzolatların Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi

Balıklardan izole edilen bakterilerin biyokimyasal karakterlerinin belirlenmesi amacıyla bu izolatlara oksidaz, katalaz, oksidasyon/fermentasyon, β -galaktosidaz (ONPG), arjinin dehidrolaz, lisin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, sitrat testi, H₂S üretimi, üre, triptofan (TDA), indol, Voges Proskauer, jelatin, glikoz, mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz, sakkaroz, amigdalin, meliboz, laktoz, metil red, eskülin, mannoz, maltoz ve arabinoz testleri uygulanmıştır (Benson, 1985).

Bu testlerin dışında bazı bakterilerin tür teşhisi amacıyla API 20E ve API 20NE (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) panel test sistemleri kullanılmıştır.

2.5. Antibiyogram Testi

Alabalık çiftliklerinden izole edilen bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençlerini belirlemek için agar difüzyon metodu uygulanmıştır. Bu amaçla 9 mm çapında ticari antibiyotik diskleri [tetrasiklin 10, oksitetrasiklin 30, sefalotin 30, streptomisin 10, sulfamethoksazol 100, oksolinik asit 2, gentamisin 10, neomisin 5, ampisilin 10,

eritromisin 15, kanamisin 30 ve florfenikol 30 (mg/disk)] kullanılmıştır (Biyoanaliz, Ankara, Türkiye). Testler, Müller Hinton agar üzerine yayılmış bakterilere antibiyotik disklerinin yerleştirilmesi sonrası 15-20°C'de bir gece bekletilmesi ve oluşan zon çaplarının kaydedilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir (Barry ve Thornsberry, 1985). Antibiyotiklerin zon çaplarının değerlendirilmesinde hassas kabul edilen sınır değerleri, oksitetrasiklin, gentamisin ve streptomisin için 15 mm, sulfamethoksazol için 16 mm, ampisilin için 17 mm, sephalotin ve kanamisin için 18 mm, oksolinik asit için 20 mm, eritromisin ve neomisin için 23 mm olarak kabul edilmiştir (NCCLS, 2002).

2.6. Çoklu PCR İçin DNA İzolasyonu

Örneklerden toplam genomik DNA fenol-kloroform-isomil alkol yöntemiyle ekstrakt edilmiştir. Bu amaçla, lizis tamponu (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, % 1 sodyum dodesil sülfat ve 50 mM EDTA) içeren tüplere aktarılıp üzerine 5 µL proteinaz-K çözeltisi (20 mg/ml) ilave edilen örnekler 60°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra fenol-kloroform-isoamil alkol (50:49:1) karışımı kullanılarak toplam DNA eldesi sağlanmıştır. TE tampon (10 mM Tris-HCl ve 0,1 mM EDTA at pH 8,0) içerisinde çözülmüş olan DNA'nın yoğunluğu UV spektrofotometre (Shimatzu, 2550) kullanılarak belirlenmiştir. Yoğunlukları 100 ng/µl olacak şekilde ayarlanan DNA'lar PCR yapılana kadar -20°C'de bekletilmiştir (Altinok vd., 2001).

2.7. Çoklu PCR İçin Primerlerin Dizayn Edilmesi

Çalışmada daha önce *R. salmoninarum*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* için dizayn edilmiş primerler kullanılmıştır. *R. salmoninarum* için (Rs1: 5'-CAA GGT GAA GGG AAT TCT TCC ACT-3'; Rs2: 5'-GAC GGC AAT GTC CGT TCC CGG TTT-3'), *A. hydrophila* için (AH1 5' GAA AGG TTG ATG CCT AAT ACG TA- 3'; AH2: 5'-CGT GCT GGC AAC AAA GGA CAG-3') ve *Y. ruckeri* için (YerF 5'-GCG AGG AGG AAG GGT TAA GTG - 3'; YerR 5'-GAA GGC ACC AAG GCA TCT CTG-3') olacak şekilde Brown vd. (1994), Nielsen vd. (2001), ve Altinok vd. (2001)'ne göre dizayn edilmiştir.

A. salmonicida için (ASF 5'-CGT TGG ATA TGG CTC TTC CT-3'; ASR 5'-CTC AAA ACG GCT GCG TA-3') primerleri Hiney vd. (1992)'den modifiye edilmiştir. *F. columnare*'nin tespitinde geri primer olarak (161B 5'-GCA CGG AGT TAG CCG ATC-3')

(Yeh vd., 2006) kullanılırken, ileri primer (FCF 5'-AAG GCA ACG ATG GGT AG-3') yeniden dizayn edilmiştir

Bu primerler geçerliliği bilinen bakteriler kullanılarak test edildikten sonra beş bakterinin (*R. salmoninarum*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*, *A. salmonicida*, *F. columnare*) varlığını aynı anda tespit edebilecek şekilde çoklu PCR protokolü oluşturma amacıyla kullanılmıştır (Kurabachew vd., 2004).

2.8. Denemede Kullanılan Bakteriler ve Kültürleri

Çoklu PCR denemesini değerlendirmek amacıyla, pozitif kontrol olarak (1) *A. hydrophila* ATCC 43874; AU9833, AU9738, AU0606, (2) *A. salmonicida* ATCC 49385, GA97030, TN9716, RY0701, RB0701, (3) *F. columnare* NCIMB 2280, CA0402, SC0406, AL0435, AL0601, (4) *R. salmoninarum*, TS0601, ve (5) *Y. ruckeri* ATCC 29473, GA97016, ESCerroU0701, EL0701, TAR0501, RARDE0201, RARDE0401, RARDE0402, RARDE0403, RAD0701, K15, RB0708, D24 bakterileri kullanılmıştır. Çoklu PCR da kullanılan bakterilere taksonomik olarak yakın olan bakteriler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu bakteriler *Aeromonas sobria* (AL94232 ve AL9425), *A. veroni* (AL0548), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Edwardsiella tarda* (AU0338 ve A19938), *E. ictaluri* (ATCC 33202, AL9549, AU9828, ve AU9738), *Enterobacter faecalis* (ATCC 2942), *Escherichia coli* (NCTC 12900), *Flavobacterium psychrophilum* (FPF), *Hafnia alvei* (TSUR0702), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas fluorescens* (AU9233, AU9738, AU9833), *Plesiomonas shigelloides* (AL9354 ve AL98051), *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Streptococcus aureus* (ATCC 25923), *Vibrio fluvialis* (CECT 4217), *Vibrio alginolyticus* (CECT 52), *V. parahaemolyticus* (CECT 511), *V. mimicus* (CECT 4218), ve *Yersinia pestis* (TA0707) dir.

Denemede kullanılan bakteri suşları: ATCC suşu, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; CECT suşu, Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; AL, AU, CA, GA, ve SC suşları, K. Hayden, Auburn University Department of Fisheries and Allied Aquaculture, Auburn, AL36849, USA; FPF suşları, T. Wiklund, Laboratory of Aquatic Pathobiology, Abo Akademi University, BioCity, Artillerigatan 5, FIN-20520 Abo, Finland; geri kalan suşlar ise Deniz Bilimleri Fakültesi'nde izole edilmiştir.

Aeromonas spp. *F. columnare* suşları, *R. salmoninarum* ve *Yersinia* spp. suşları sırasıyla triptik soy broth (TSB); Hsu-Shotts broth, KDM2 ve TSB besiyerlerinde çoğaltılmıştır. *Aeromonas* spp., *F. columnare* suşları ve *Yersinia* spp. suşları 25°C’de iki gün inkübe edilirken, *R. salmoninarum* 15°C’de 4 hafta inkübe edilmiştir.

2.9. Çoklu PCR Şartları ve Görüntüleme

İstenmeyen bantların oluşmaması ve hedeflenen bakterilere ait genlerin çoğaltılabilmesi amacıyla kullanılan primerler için uygun tutunma (annealing) sıcaklığı ve MgCl₂ konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda en iyi tutunma sıcaklığı 59°C ve MgCl₂ konsantrasyonu 3 mM olarak uygulanmıştır. PCR reaksiyonunda Qiagen Molecular Biochemicals (QIAGEN Multiplex PCR kit) reaktifleri kullanılmıştır.

Yükseltgenme işleminde, 35 µL karışım içinde 200 ng örnek DNA’sı, 17,5 µl 2X Multiplex PCR karışımı (3 mM MgCl₂, her bir primerden 100 ng) ve 3,5 µl 5X Q solüsyonu olacak şekilde hazırlanmış karışımlar kullanılmıştır. Örneklerin spesifik genlerinin çoğaltılmasında Thermo Hybaid Thermal Cycler (Thermo Electron Inc., Waltham, USA)’dan faydalanılmıştır. PCR işleminde örnek DNA’sı içermeyen reaktif kontrol ve negatif kontrol kullanılmıştır. PCR işleminden sonra, örnekler etidiyum bromit (1mg/100µL) ile 1x TBE tampon sisteminde %1,5 agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Jel görüntüleri jel görüntüleme sistemi (KODAK Gel Logic 200) kullanılarak kayıt edilmiştir. Çoklu PCR için uygulanan protokol Tablo 2 de sunulmuştur.

Tablo 2. *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*’nin aynı anda teşhisi için geliştirilmiş olan çoklu PCR protokolü

| PCR Basamakları | Segment | | |
|----------------------|---------------|---------------|------------------------|
| | Sıcaklık (°C) | Süre(Sn./Dk.) | Tekrar miktarı (Döngü) |
| Birinci denaturasyon | 95 | 15 dk | 1 |
| Denaturasyon | 94 | 30 sn | 35 |
| Yapışma (Annealing) | 59 | 90 sn | |
| Uzama (Extension) | 72 | 60 sn | |
| Final Uzama | 72 | 10 dk | 1 |

2.10. Çoklu PCR'in Hassaslığının Belirlenmesi

Bu amaçla tanımlanması hedeflenen beş bakteri ayrı ayrı uygun besi yerlerinde (Brain Heart Infusion Broth, Hsu-Shotts Broth, KDM2 broth) çoğaltılmıştır (APHA, 1998). Saf halde çoğalan bakterilerin her birinden 1 ml alınarak 5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak 9000'g de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılarak, pelet kısma 1 ml lisis sıvısı eklenmiştir.

Uygulanacak metodun balık dokularından alınan örneklerde kullanılabilir olduğunun belirlenmesi amacıyla, gökkuşağı alabalığının karaciğeri homojenize edilerek 1:10 oranında lisis sıvısı ile sulandırılmış ve saf bakteri kültürleri ile birleştirilmiştir. DNA eldesi daha önce ifade edildiği üzere fenol-kloroform-izomil alkol yöntemiyle sağlanmıştır.

Bakterilerin hangi yoğunlukta (sayılarının belirlenmesi) olduklarını belirlemek amacıyla saf kültürlerden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve 0,1 ml olacak şekilde TSA, KDM2 agar ve Hsu-Shotts agar üzerine ekimler yapılmıştır. Ekimler sonrasında *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophyla* ve *Yersinia ruckeri* TSA'da, *F. columnare* Hsu-Shotts agarda 25°C'de iki gün inkübe edilirken, *R. salmoninarum* KDM2 agarda 15°C'de 4 hafta inkübe edilmiş ve çoğalan koloniler kaydedilmiştir (del Cerro vd., 2002).

2.11. Çoklu PCR Sonuçlarının Doğrulanması

Çoklu PCR ürünlerinin *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *R. salmoninarum* ve *Y. ruckeri*'ye ait olduğunun doğrulanması amacıyla PCR ürünleri NucleoSpin PCR saflaştırma kiti (Macherey-Nagel) yardımıyla saflaştırılmış ve ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) ile sekans edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Su Parametreleri ve İşletmelerin Genel Durumu

Ocak 2007 ve Temmuz 2008 tarihleri arasında Trabzon ve Rize illerinde toplam 34 adet alabalık çiftliğine her mevsim gidilerek, tesislerin genel durumu tespit edilmiştir. Yetiştiricilik yapılan işletmelerde kullanılan suların bazı özellikleri yıl bazında, minimum ve maksimum değerler olmak üzere sıcaklık 2,7-24,6°C, pH 6,68-8,23 ve çözülmüş oksijen 4,75-13,02 mg/L olarak ölçülmüştür. Su kriterlerinin mevsimsel olarak ortalama değerleri Tablo 3'de verilmiştir

Tablo 3. Su kriterlerinin mevsimsel (ortalama±SD) değerleri

| Su kriterleri | Mevsim | | | |
|----------------|------------|------------|------------|------------|
| | İlkbahar | Yaz | Sonbahar | Kış |
| Sıcaklık (°C) | 11,41±3,66 | 17,57±4,65 | 10,34±4,44 | 7,66±1,44 |
| Oksijen (mg/L) | 8,78±1,35 | 8,99±1,44 | 10,51±1,78 | 10,17±0,82 |
| pH | 7,07±0,35 | 7,62±0,25 | 7,25±0,35 | 7,53±1,14 |

Suların fiziksel özelliklerinin yağış rejiminden etkilendiği, yağışın bol olduğu dönemlerde askıda katı maddelerin varlığının arttığı ve su kalitesinde düşüşlerin olduğu tespit edilmiştir. İşletmelerin birçoğu bu ve benzeri durumlara hazırlıksız olduklarından bu dönemlerde su kalitesindeki değişimlere bağlı zaman zaman ölümlerin veya hastalıkların ortaya çıktığı belirlenmiştir.

Örnekleme yapılan işletmelerde, sektörle ilgili yetişmiş eleman (Su Ürünleri ve Balıkçılık Teknolojisi Mühendisi) eksikliği gözlemlenmiş, bütün işletmeler göz önüne alındığında sadece 4 su ürünleri mühendisi ve 1 Bal. Tek. Müh. çalıştığı tespit edilmiştir. İşletmelerin balık sağlığı ile ilgili fiziki ve idari tedbirler konusunda yeterli hassasiyeti göstermedikleri gözlemlenmiştir. Çoğu işletmede her havuz için ayrı kepçe ve donanım kullanılmadığı, bir havuzdan çıkan suyun diğer havuzlarda tekrar kullanıldığı ve bu nedenlerle hastalıkların işletme içerisinde kolaylıkla yayıldığı belirlenmiştir.

Ayrıca diğere işletmelere gönderilen ya da başka işletmelerden gelen balıkların hastalıklardan ari olmasına dikkat edilmediğı gözlemlenmiştir. Gerek akarsular üzerinde ve gerekse baraj göllerinde kurulmuş tatlı su yetiştiricilik ünitelerinden, denizlerde bulunan kafes sistemlerine balık transferi nedeniyle bakteriyel patojenlerin denizel ortama taşındığı tespit edilmiştir. İşletme sahiplerinin ticari kaygılar nedeniyle hastalıkların teşhis ve tedavisinde dışı açılımda tereddüt gösterdikleri, hastalık problemlerini kendi içlerinde çözümleme yoluna gittikleri gözlemlenmiştir.

Bölgede hastalıkların teşhisine yönelik ilgili kurumlar ile (Trabzon Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü, KTÜ Deniz Bilimleri Fakültesi, Rize Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi ve Tarım İl Müdürlüğü) işletme sahiplerinin kurum bazında tam bir iletişim içinde olmadığı belirlenmiştir.

Tarım İl Müdürlükleri'nin işletmeleri hastalıklardan daha çok işletmelerin projelendirilmesi ve ilaç kalıntılarının (rezüdü) belirlenmesi konusunda denetlediğı gözlemlenmiştir. Bakteriyel hastalıkların tedavisinde en yaygın kullanılan antibiyotik oksitetrasiklin olarak belirlenmiş, işletmelerde ilaçların kullanımı, depolanması ve yasal durumları ile ilgili bilgi eksikliği tespit edilmiştir.

3.2. Biyokimyasal Test Sonuçlarına Göre İzole Edilen Bakteriler

Örneklerden yapılan ekimler sonucunda, besi yerlerinde morfolojik olarak farklı bakteri kolonilerinin çoğaldığı gözlemlenmiştir. Saf koloniler halinde elde edilen izolatlara biyokimyasal testler uygulanmış ve bu testlerin sonucunda bakterilerin tanımlaması yapılmıştır. Bakterilerin kaç balık örneğinden, hangi dokulardan ve hangi mevsimde izole edildikleri Tablo 4'de verilmiştir. İşletmelerden 6 bakteri cins, 34 bakteri ise tür seviyesinde olmak üzere toplam 40 farklı bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakteri gruplarından *Aeromonas* spp. içerisinde en fazla *Aeromonas hydrophila* izole edilirken, *Aeromonas sobria* sadece bir kez izole edilen tür olmuştur. *Pseudomonas* spp.'nin balıklarda yaygın olduğu belirlenmiş, *Pseudomonas luteola* balıklardan ilk defa, *Pseudomonas putida* ise Japonya dışında ilk kez alabalıklardan izole edilmiştir. Yersiniosis hastalığının etkeni olan *Yersinia ruckeri* bölgede en fazla izole edilen tür olarak ortaya çıkmıştır.

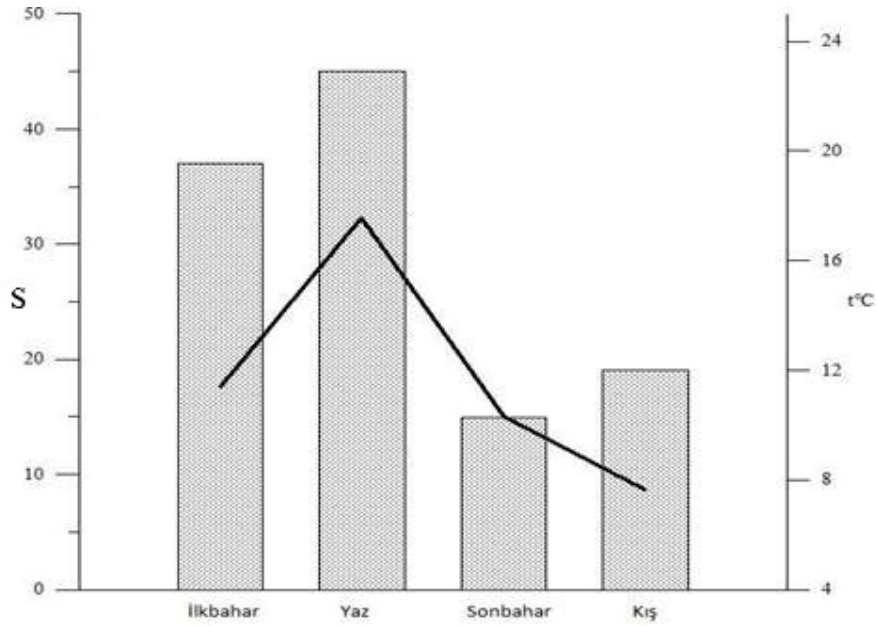
Tablo 4. Alabalık işletmelerinden izole edilen bakteriler. B: böbrek, D: dalak, KC: karaciğer, DE: deri, İB: İlkbahar, Y: Yaz, K: Kış, SB: Sonbahar

| Bakteri | Örnek | İzole Edilen Doku | | | | Mevsim | | | |
|---|-------|-------------------|----|----|----|--------|----|----|---|
| | | B | D | KC | DE | İB | Y | SB | K |
| <i>Aeromonas caviae</i> | 7 | 5 | 3 | 4 | 1 | 4 | 3 | - | - |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 11 | 5 | 6 | 8 | 1 | 3 | 3 | 1 | 4 |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | 4 | 1 | 2 | 2 | - | - | 1 | 2 | 1 |
| <i>Aeromonas sobria</i> | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Aeromonas spp.</i> | 2 | 1 | 2 | 1 | - | - | 1 | - | 1 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 6 | 4 | 1 | 3 | 1 | 5 | 1 | - | - |
| <i>Cedecea davisae</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>Edwardsiella sp.</i> | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Eikenella corrodens</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - |
| <i>Erwinia sp.</i> | 3 | 2 | - | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 |
| <i>Ewingella americana</i> | 2 | 3 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>Flavobacterium psychrophylum</i> | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 |
| <i>Hafnia alvei</i> | 2 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>Mannheimia haemolytica/Pasteurella trehalosi</i> | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Pantoea spp.</i> | 1 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Pasteurella pneumotropica</i> | 8 | 3 | 5 | 5 | - | 2 | 4 | 1 | 1 |
| <i>Photobacterium damsella</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>Plesiomonas shigelloides</i> | 2 | 1 | 1 | 1 | - | 2 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 3 | 2 | 2 | 2 | - | 2 | 1 | - | - |
| <i>Pseudomonas caryophyllii</i> | 1 | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - |
| <i>Pseudomonas difflaxi</i> | 2 | 1 | - | 1 | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>Pseudomonas diminuta</i> | 2 | - | 2 | - | - | - | - | 2 | - |
| <i>Pseudomonas floresans</i> | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas luteola</i> | 2 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | 1 |
| <i>Pseudomonas solanacearum</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | 3 | 2 | 2 | 3 | - | - | 1 | 1 | 1 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - |
| <i>Salmonella sp.</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 1 | 2 | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Shewanella putrefaciens group</i> | 1 | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - |
| <i>Shigella sonnei</i> | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 3 | 1 | 1 | 1 | - | 2 | - | 1 | - |
| <i>Vibrio fluvialis</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | - | 2 | - | - | - |
| <i>Weeksella virosa</i> | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | 2 | - | - | 2 | - | - | - | - | 2 |
| <i>Yersinia ruckeri</i> | 27 | 27 | 20 | 20 | - | 3 | 20 | 1 | 3 |

Tüm bakterilerin genel olarak iç organlarda yayılım göstermelerine karşın, *Aeromonas spp.* deriden de izole edilmiştir. *Flavobacterium psychrophylum*, *Shewanella*

putrefaciens ve *Pseudomonas luteola* ise sadece deriden izole edilmiştir. Bu bağlamda *Yersinia ruckeri*'nin tüm balıkların böbreklerinden izole edildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca çoğunlukla karaciğerden ve dalaktan, deriden ise hiç izole edilmediği belirlenmiştir.

İzole edilen bakterilerin miktar bakımından değişimi mevsimsel ve sıcaklık değerleri dikkate alınarak Şekil 1'de verilmiştir. *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp.'nin hemen her mevsimde, *Yersinia ruckeri*'nin ise özellikle sıcaklığın artış gösterdiği yaz aylarında izole edildiği gözlemlenmiştir. Daha çok deniz balıklarından izole edilen *Pasteurella pneumotropica*'nın tatlı su sistemlerinde her mevsim, *Vibrio fluvialis*' in ise izole edildiği balıkların bütün organlarında bulunduğu belirlenmiştir. *Vibrio fluvialis* hem tatlı hem de tuzlu suda yetiştiriciliği yapılan balıklardan izole edilmiştir.



Şekil 1. Mevsim ve sıcaklık değerlerine göre izole edilen toplam bakteri sayıları, (S); izole edilen toplam bakteri sayısı

Tanımlanan bakteriler arasında insan gıdası olarak tüketilen ürünlerde istenmeyen bakteriler grubunda yer alan *Salmonella* sp. gökkuşacağı alabalıklarının böbrek dokusundan izole edilmiştir. Özellikle kanal yayın balıklarında patojen olan *Edwardsiella tarda* ve *Edwardsiella ictaluri* türlerinin bulunduğu cinse ait olarak *Edwardsiella* sp. yaz mevsiminde yine gökkuşacağı alabalığının karaciğer dokusundan elde edilmiştir.

Örnekleme sonucunda tanımlanan bakteri türlerinin balıklarda meydana getirdikleri hastalık semptomları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Alabalık işletmelerinden izole edilen bazı bakterilerin gösterdiği hastalık semptomları

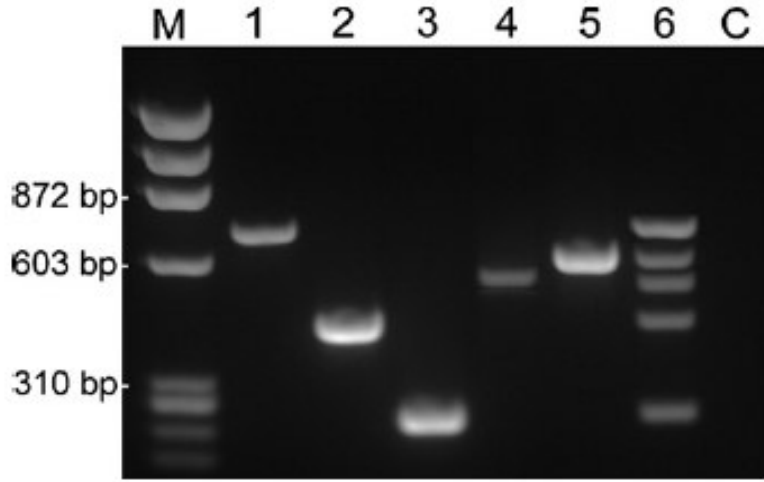
| Bakteriler | Semptomlar |
|---------------------------------|---|
| <i>Aeromonas caviae</i> | Renkte kararırma, dorsal yüzgeçte erime |
| <i>Aeromonas hydrophyla</i> | Kuyrukta erime, vücutta deformasyon |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | Bağırsakta sarı sıvı birikimi, karaciğerde küçülme |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Karaciğerde peteşi |
| <i>Ewingella americana</i> | Baş ve kuyruk yüzgecinde erime |
| <i>Flavobacterium spp.</i> | Baş kısmında yaralar |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Renkte kararırma ve karında şişlik |
| <i>Pseudomonas caryophyllii</i> | Bağırsakta sarı sıvı |
| <i>Pseudomonas floresans</i> | Abdomende kızarıklık ve yaralanma |
| <i>Pseudomonas putida</i> | Dorsal ve kuyruk yüzgecin kaybolması |
| <i>Pseudomonas luteola</i> | Dalakta büyüme, karaciğerde solgunluk, bağırsakta sarı sıvı oluşumu |
| <i>Shigella sp.</i> | Kuyrukta yaralanma, bağırsakta yangı, Pilorik çekumlarda sarı sıvı birikimi |
| <i>Yersinia ruckeri</i> | Hemoroji, dalakta büyüme, bağırsakta sarı sıvı birikimi, gözde kanlanma, deride yoğun hemorajiler |

Daha önce bilinen hastalık etmenlerinin dışında *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas luteola*'nın balıklarda belirgin bir şekilde hastalık semptomları meydana getirdiği gözlemlenmiştir.

3.3. Çoklu PCR Sonuçları

Aeromonas hydrophila, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin aynı anda teşhisine olanak sağlayacak çoklu PCR protokolü yapılan ön denemeler sonucunda başarıyla oluşturulmuş ve yapılan sekans analizi sonucunda PCR ürünlerinin hedeflenen bakterilere ait olduğu doğrulanmıştır.

PCR sonucunda oluşan ürünlerinin büyüklüğü *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *R. salmoninarum* ve *Y. ruckeri* için sırasıyla 685, 416, 204, 500 ve 589 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin aynı anda teşhisi için geliştirilmiş olan çoklu PCR. M: Phi X174 DNA/HaeIII moleküler markır, 1: *A. hydrophila* (685 bp), 2: *A. salmonicida* (416); 3: *F. columnare* (204 bp), 4: *R. salmoninarum* (500 bp), 5: *Y. ruckeri* (589 bp), 6: 5 patojeni içeren çoklu PCR; C: sadece PCR reaktiflerini içeren negatif kontrol

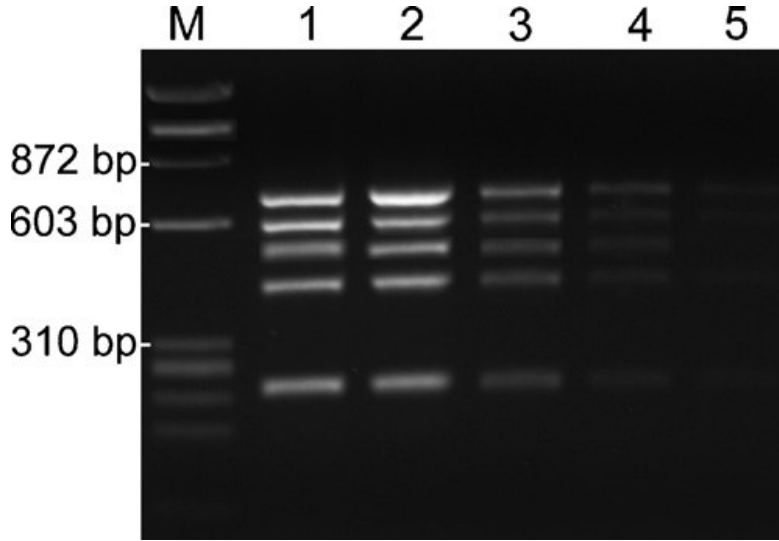
Çoklu PCR sonucunda *Aeromonas hydrophila* 43, *A. salmonicida* 28, *Flavobacterium columnare* 8 ve *Yersinia ruckeri* 55 farklı örnekten izole edilirken, yapılan çalışmalar sonucunda hiçbir örnekten *Renibacterium salmoninarum* izole edilememiştir.

Beş farklı bakteriye ait biyokimyasal test yöntemi ve çoklu PCR yöntemiyle elde edilen bulgular Tablo 6'da özetlenmiştir. Biyokimyasal yöntemler sonucu izole edilen *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* ve *Yersinia ruckeri* bakterileri aynı örneklerden çoklu PCR yöntemiyle de izole edilmiştir.

Tablo 6. Çoklu PCR (mPCR) ve biyokimyasal testler sonucunda *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium columnare* ve *Renibacterium salmoninarum*'a ait bulgular

| Bakteriler | Örnek Sayısı | |
|-----------------------------------|--------------|-------------------|
| | Çoklu PCR | Biyokimyasal test |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | 28 | 4 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 43 | 11 |
| <i>Yersinia ruckeri</i> | 55 | 20 |
| <i>Flavobacterium columnare</i> | 8 | - |
| <i>Renibacterium salmoninarum</i> | - | - |

Aeromonas hydrophila, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin çoklu PCR yöntemiyle izole edilebilmeleri için saf kültürlerinden asgari, *A. hydrophila* için 2 CFU, *A. salmonicida* için 1 CFU, *F. columnare* için 1 CFU, *R. salmoninarum* için 3 CFU ve *Y. ruckeri* için 1 CFU bulunması gerektiği belirlenmiştir. Aynı şekilde bakterilerin balık dokusundan izole edilebilmeleri için ise bu bakterilerden sırasıyla 4, 5, 8, 7 ve 4 CFU bulunması gerektiği belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Balık karaciğerine eklenen *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin çoklu PCR koşullarındaki hassasiyeti. PCR ürünlerinin büyüklüğü *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *R. salmoninarum* ve *Y. ruckeri* için sırasıyla 685, 416, 204, 500 ve 589, olarak belirlenmiştir. M: Phi X174 DNA/HaeIII moleküler markır, 1-5: sırasıyla 10^{-1} - 10^{-5} seri dilüsyonlar.

3.4. Antibiyotik Direnç Seviyeleri

Alabalık işletmelerinden izole edilen bakterilerin, uygulanan antibiyotiklere karşı göstermiş oldukları direnç yüzdeleri her bir bakteri için ayrı ayrı Tablo 7'de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre izole edilen bakterilerin genel olarak gentamisin (R: %20), oksolinik asit (R: %22,78), oksitetrasiklin (R: %26,26) ve kanamisin (R: %26,92) gibi antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları, neomisin (R: %86,67), sephalotin (R: %71,13) ve tetrasikline (R: % 66,67) karşı oldukça direnç kazanmış oldukları belirlenmiştir.

Tablo 7. İzole edilen bakterilerin antibiyotik dirençleri. AM10: Ampisilin, KF30: Sefalotin, E15: Eritromisin, CN10: Gentamisin, K30: Kanamisin, N5: Neomisin, OA2: Oksolinik asit, T30: Oksitetrasiklin, S10: Streptomisin, SMZ100: Sulfamethoksazol, TE10: Tetrasiklin, FL; Florfenikol, Ö: Örnek sayısı

| Bakteri | Ö | Antibiyotikler | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----|----------------|--------------|--------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| | | AM10 | KF30 | E15 | CN10 | K30 | N5 | OA2 | T30 | S10 | SMZ100 | TE10 | FL |
| <i>A. caviae</i> | 7 | 7 | 7 | 7 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | - |
| <i>A. hydrophila</i> | 11 | 4 | 4 | 2 | 2 | 1 | 3 | - | 1 | - | 1 | 1 | - |
| <i>A. salmonicida</i> | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - |
| <i>A. sobria</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| <i>Aeromonas</i> spp. | 2 | 1 | 2 | 2 | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>B. cepacia</i> | 6 | 6 | 4 | 1 | - | - | - | - | 2 | - | - | - | 2 |
| <i>C. davisae</i> | 2 | 2 | 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Chr. violaceum</i> | 1 | - | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - |
| <i>C. freundii</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Edwardsiella</i> sp. | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>E.corrodens</i> | 1 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - |
| <i>E. amnigenus</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 | - |
| <i>E. cloacae</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Erwinia</i> sp. | 3 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 3 | - | - | - |
| <i>E.americana</i> | 2 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>F.psyncrophylum</i> | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| <i>H. alvei</i> | 2 | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pantoea</i> spp. | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pt. pneumotropica</i> | 8 | 2 | 2 | - | 2 | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - |
| <i>Ph. damsella</i> | 1 | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - |
| <i>Pl. shigelloides</i> | 2 | 2 | 2 | - | - | - | 1 | - | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>P. aeroginasa</i> | 3 | 2 | 2 | 3 | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | - | 2 | - |
| <i>P. caryophyllii</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | 2 | - | 1 | - |
| <i>P. dilafaldi</i> | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | - | 2 | - | 2 | - | 1 | - |
| <i>P. diminuta</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | - | 1 | - | 1 | 2 | - | 2 | - |
| <i>P. floresans</i> | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - |
| <i>P. luteola</i> | 2 | 2 | 2 | 2 | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - |
| <i>P. solanacearum</i> | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>P. putida</i> | 1 | - | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas</i> spp | 3 | 1 | 1 | 3 | - | - | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | - |
| <i>Salmonella</i> sp. | 1 | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>S. liquefaciens</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Shew. putrefaciens</i> | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>S. sonnei</i> | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - |
| <i>Ste. maltophilia</i> | 3 | 1 | 2 | - | - | - | - | 1 | 1 | 3 | - | - | - |
| <i>V. fluvialis</i> | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - |
| <i>W. virosa</i> | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| <i>Y.pseudotuberculosis</i> | 2 | 1 | 1 | 2 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - |
| <i>Y.ruckeri</i> | 27 | 10 | 20 | 12 | 4 | 2 | 2 | 7 | 7 | 1 | 1 | 4 | - |
| Toplam Bakteri | | 89 | 97 | 98 | 90 | 52 | 30 | 79 | 99 | 73 | 29 | 27 | 20 |
| Dirençli Bakteri | | 58 | 69 | 51 | 18 | 14 | 26 | 18 | 26 | 40 | 9 | 18 | 2 |
| % Direnç (R) | | 65,17 | 71,13 | 52,04 | 20 | 26,92 | 86,67 | 22,78 | 26,26 | 54,79 | 31,03 | 66,67 | 10 |

Aeromonas spp. içerisinde antibiyotiklere en çok direnç kazanan tür olan *Aeromonas caviae*'nin, ampisilin, sepalothin ve eritromisine karşı %100, gentamisin, kanamisin, neomisin, oksitetrasiklin ve streptomisine karşı ise yüksek oranda dirençli ($R \geq \%50$) olduğu belirlenmiştir. Diğer *Aeromonas* türleri içerisinde yine ampisilin ve sepalothin'e karşı direnç olduğu gözlemlenmiştir.

F. psychrophylum'un kullanılan antibiyotiklere karşı fazla dirençli olmadığı, bütün *Pseudomonas* türlerinin ise sepalothin'e karşı direnç kazandığı belirlenmiştir. Sadece bir balıktan izole edilen *Salmonella* sp.'nin sepalothin, neomisin ve streptomisin'e dirençli olduğu belirlenirken, en çok izole edilen tür olan *Yersinia ruckeri*'nin sepalothin dışındaki hiçbir antibiyotiğe %50'den daha fazla direnç göstermediği gözlemlenmiştir. Florfenikol'un *Burkholderia cepacia* dışındaki bütün bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA

4.1. Su Kriterleri

Su kalite parametreleri balık sağlığını etkileyen önemli bir etken olarak kabul edilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde birçok patojenik hastalığın ortaya çıkışında özellikle su sıcaklığının doğrudan etkili olduğu bildirilmiştir (Plumb, 1999). Balıklarda *Flavobacterium psychrophilum*'un 4-10°C aralığında, *Flavobacterium columnare*'nin ise 15°C'nin üzerinde enfeksiyon meydana getirdiği bildirilmektedir (Borg, 1960). Lasee (1995), *Aeromonas salmonicida*'nın 13°C'nin üzerindeki su sıcaklıklarında özellikle genç salmonlarda etkin olduğunu, Sanders vd. (1978), ise *Renibacterium salmoninarum*'un meydana getirdiği bakteriyel böbrek hastalığında hastalık şiddetinin su sıcaklığına bağlı olarak en yoğun ölümlerin 6,7-12,2°C'de meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yine Bullock ve Anderson (1984), balıklarda *Yersinia ruckeri*'den kaynaklanan enfeksiyonların şiddetinin su sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü durumlarda azaldığını ifade etmiştir.

Bu çalışmada su sıcaklığının 11,4°C olduğu ilkbahar ve 10,3°C'de olduğu sonbahar mevsimlerinde izole edilen bakteri sayısı sırasıyla 37 ve 14 olarak tespit edilmiştir. Su sıcaklık değerlerinin birbirine yakın olmasına rağmen izole edilen bakteri sayısında önemli bir değişim gözlemlenmektedir. Bu durum, izole edilen bakterilerin sayısı ve çeşitliliğinin su sıcaklığı ile doğrudan ilişkili olmadığını göstermektedir. İlkbahar aylarında izole edilen bakteri miktarındaki artışın alabalıklarda kuluçka sonrası, hastalıklar yönünden hassas olan yeni bireylerin işletmelerde yoğun olmaları ve bu aylarda meydana gelen diğer su kalite değişimleri şeklinde açıklanabilir. Bunun yanı sıra sıcaklığın Sonbahar mevsimine göre nispeten düşük olduğu kış aylarında daha fazla sayıda bakteri izole edilmiştir. Bu farkın özellikle tür olarak *A. hydrophyla* ve *F. psychrophilum*'dan kaynaklandığı gözlemlenmektedir. Bölgede kış aylarında askıda katı madde miktarının en yüksek seviyede olduğu bilinmektedir (Gedik vd., 2009). Su sıcaklığının düşük olmasına rağmen, izole edilen bakteri sayısının fazla olması bu şekilde izah edilebilir.

Yapılan diğer çalışmalara paralel olarak, *Flavobacterium psychrophilum* su sıcaklığının düşük olduğu kış aylarında, *Yersinia ruckeri* ise çoğunlukla su sıcaklık değerlerinin 20°C'yi bulduğu yaz aylarında izole edilmiştir.

Bunun yanı sıra *Aeromonas hydrophyla*'nın su sıcaklığının yükseldiği yaz aylarında, *Pasteurella pneumotropica*'nın ise 20°C'nin üzerinde mortaliteye neden olduğu ifade edilse de (Lasee, 1995; Rahman vd., 2001; Magarinos vd., 2001), yapılan saha çalışmalarında *Aeromonas hydrophyla* ve *Pasteurella pneumotropica*'nın geniş su sıcaklık aralıklarında her mevsim balıklardan izole edildiği ortaya konulmuştur. Balıklarda meydana gelen *Pseudomonas anguilliseptica* enfeksiyonlarının 16°C'nin altında (Toranzo vd. 2005) ve *P. pseudoalcaligenes* enfeksiyonlarının ise 22°C'deki su sıcaklık değerlerinde (Austin ve Stobie, 1992) meydana geldiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada izole edilen 8 farklı *Pseudomonas* türünün geniş su sıcaklık değerlerini kapsayan bütün mevsimlerde izole edildiği belirlenmiştir.

Vibrionaceae grubunda yer alan *Vibrio* spp.'nin tuzlu sularda yetiştiriciliği yapılan balıklarda mortalite oluşturduğu bildirilse de (Austin ve Austin, 2007), Kitao vd. (1983) *Vibrio anguillarum*'un tatlı su balıklarında da mortaliteye sebep olduğunu rapor etmişlerdir. *Vibrio fluvialis*, su sıcaklığının 14°C olduğu tatlı su ve 12,8°C olduğu tuzlu su sisteminde yetiştirilen alabalıklardan izole edilmiştir.

Su sıcaklığının dışında su ürünleri yetiştiriciliği yapılan sistemlerde kullanılan suyun oksijen ve pH değerlerinin istenilen değer aralıklarında olmayışı balıklarda stres nedeni olabilmektedir. Bu durumun balıkların hastalıklara karşı hassas hale gelmesine ve fırsatçı patojenlere fayda sağladığı ifade edilmektedir (Hedrick, 1998). Coquet vd. (2002), *Yersinia ruckeri*'nin gökkuşağı alabalıklarında 7,5 pH değerinde, Yıldız vd. (2005) ise balıklarda meydana gelen *Aeromonas hydrophyla* enfeksiyonunun, 7,8 pH ve 6,5 mg/l oksijen değerinde meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada pH değeri, *Yersinia ruckeri*'nin en yoğun izole edildiği yaz aylarında 7,62 olarak kaydedilmiş, *A. hydrophyla* enfeksiyonlarında ise geniş mevsimsel dağılım nedeniyle bu değerler özellikle oksijen açısından farklı değerlerin elde edilmesine neden olmuştur.

Su ürünleri yetiştiriciliği yapılan işletmelerde balık sağlığının muhafazası oldukça önemlidir. Bu amaçla işletmelerin kanuni mevzuata ve genel hijyen kurallarına uygun davranmaları gerekmektedir (Lasee, 1995). Balık hastalıklarının yayılmasında balık transferleri önemli rol oynamaktadır. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı balık çiftliklerinde su ürünleri sağlığı ile ilgili denetimlerini su ürünleri yönetmeliği EK-9'da kısaca ifade etmektedir. Bu yönetmeliğe göre işletme sahiplerinin, balıklarda kullanılan ilaçların çeşit ve dozlarını, hastalık semptomlarını ve aşılama kayıtlarını kayıt altına almaları gerekmektedir. Ancak yapılan saha çalışmalarında, bu kayıtların büyük ölçüde ihmal

edildiği ve balık transferlerinde menşei belgelerinin yeterince önemsenmediği belirlenmiştir. Bu durum, hastalıkların diğer bölgelere yayılımına olanak sağlamaktadır.

4.2. Biyokimyasal Test Sonuçları

Tüm dünyada ve Avrupa'da balıklarda vibriosis, pasteurellosis, yersiniosis, furunkulosis, kolumnaris hastalığı, mikobakterium, motile *Aeromonas* septisemi, pseudomonosis, streptokokkosis gibi bakteriyel hastalıklar yaygın olarak rapor edilmektedir (English vd., 1993; Austin ve Austin, 2007). Ülkemizde özellikle yersiniosis, motil *Aeromonas* septisemi, vibriosis, pseudomonas enfeksiyonları ve son yıllarda streptokok enfeksiyonlarının etkenleri farklı balık türlerinden izole edilmiştir (Candan, 1993; Altinok vd., 2006; Altinok vd., 2007; Kan ve Sarıyüpoğlu, 2008; Akşit ve Kum, 2008). Bu çalışmada streptokok ve mikobakterium gibi bakteriyel balık patojenleri dışında yaygın olan bütün hastalık etmenleri rapor edilmiştir. Ayrıca daha önce balıklarda patojen olan, fakat yaygın olarak izole edilmeyen *Stenotrophomonas maltophilia*, *Shewanella putrefaciens* ve *Eikenella corrodens* gibi bakteriler de bu çalışmada balıklardan izole edilmiştir (Kozinnska ve Pekala, 2004; Jeon vd., 2007).

Yaygın olarak rapor edilen patojenlerin dışında, insanlarda özellikle çocuklarda hastalığa sebep olan *Pseudomonas putida* (Bouallegue, 2004), ilk olarak ülkemizde gökkuşağı alabalıklarında izole edilmiştir. *P. putida* sadece Japonya'da ayu, (*Plecoglossus altivelis altivelis*) ve sarıkuyruk (*Seriola quinqueradiata*) balıklarından izole edilmiş olup dünyada yayılımı olmayan bir patojendir (Kusuda ve Toyoshima, 1976; Muroga, 1990; Wakabayashi vd., 1996). Bu çalışma *P. putida*'nın Japonya dışında da balıklarda enfeksiyon meydana getirdiğini ortaya koymaktadır. Benzer bir şekilde *Pseudomonas luteola*'nın insanlarda patojenik özellik gösteren bir bakteri olduğu bildirilmiş olmasına rağmen, gerçekleştirilen bu çalışmada, *P. luteola*'nın balıklarda mortaliteyle sonuçlanan enfeksiyonlar meydana getirdiği belirlenmiştir.

Bunun yanında çalışma boyunca balıklardan izole edilen *Burkholderia cepacia*, *Cedecea davisae*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter amnigenus*, *Ewingella americana*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas caryophyllii*, *Pseudomonas dilafaldii*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas solanacearum*, *Shigella sonnei* ve *Weeksela viros* gibi bakterilerin balıklarda patojen olup olmadığı bilinmemektedir. Bu

bakteriler ile ilgili gelecekte yapılacak deneylerin konunun aydınlatılmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.

Sucul organizmaların gerek deniz taşımacılığı ve gerekse ticari olarak ülkeler ve kıtalar arası yayılımı bilinmektedir. Bu durum aynı zamanda hastalıkların yayılımına da sebep olmaktadır. Bakteriyel patojenlerin stoklar arasındaki yayılımının önlenmesi amacıyla hastalıklardan arındırılmış sertifikalı ürünlerin kullanılması gerekmektedir.

Hastalık etmenlerinin teşhisi hastalıklardan korunma ve tedavide oldukça önemlidir. İdeal koşullarda yapılan su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık etmenlerinin varlığının tespit edilmesinde genellikle yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. Sağlıklı olduğu düşünülen fakat gerçekte patojenleri taşıyıcı olan balıklar popülasyon içerisinde hastalığın yayılmasında ciddi riskler meydana getirebilirler. Hastalıklar stresli koşullarda, aşırı stok yoğunluğunun bulunduğu ve ani değişimlerin olduğu yetiştiricilik sistemlerinde meydana gelmektedir. Bu yüzden, hastalıkların kontrolü açısından, taşıyıcı balıklardaki patojenlerin tespiti oldukça önemlidir. Yanlış yapılan teşhis alınacak önlemleri ve uygulanacak tedaviyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Plumb, 1999). Bu çalışmada bakteriyel balık patojenlerinin tespiti amacıyla besi yerlerinde izole edilen bakterilere 28 farklı biyokimyasal test uygulanmıştır. Bu testler, elde edilen bakterilerin kesin teşhisine büyük ölçüde olanak sağlamıştır.

4.3. Çoklu PCR Sonuçları

Standart bakteriyolojik testlerle karşılaştırıldığında, bakterilerin izolasyonu ve tanımlanmasında PCR'nin çok daha hızlı ve kesin sonuçlar verdiği bilinmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu kültür oluşturabilen ve oluşturamayan yapılarıdaki hücrelerin tespitini sağlayan hassas bir metottur (Chu ve Lu, 2005). Araştırmalarda, besiyeri kültürlerine dayalı yapılan bakteriyel teşhislerde hassasiyetin çok azaldığı ve taşıyıcılarda düşük yoğunlukta bulunan türlerin tespitinde başarısız olunabileceği bildirilmiştir (Marshall vd., 1999; Kong vd., 2002). Bu çalışma, çoklu PCR tekniği ile sıklıkla rastlanan bakterileri (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *R. salmoninarum*, *Y. ruckeri*) taşıyan balıkların hastalık etmenlerini belirlemede önemli bir araç olabilir.

Gonzales vd. (2004), balıklarda patojen olan 5 farklı bakterinin çoklu PCR yöntemiyle aynı anda teşhisine olanak sağlayan bir protokol geliştirmişlerdir. Ancak bu çalışma daha çok denizel ortamda yetiştiriciliği yapılan balıklarda patojen olan üç farklı

Vibrio türü, *Photobacterium damsela* ve *Aeromonas salmonicida* bakterileri ile ilgilidir. Yine del Cerro vd. (2002), *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *Yersinia ruckeri* bakterilerine ait çoklu PCR protokolü geliştirmişler. Yapılan bu çalışma özellikle tatlı su balık patojenleri arasında yer alan *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *R. salmoninarum* ve *Y. ruckeri* ile ilgili yapılmış ilk çoklu PCR protokolüdür. Araştırmada spesifik primerler kullanıldığından beş bakterinin hiç biri benzer amplifike sonuçlar vermemiştir.

4.4. Çoklu PCR ve Biyokimyasal Yöntemin Karşılaştırılması

Balık hastalıklarının erken ve etkili teşhisi hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde oldukça önemlidir. Bu çalışmada, geleneksel bakteriyolojik metot ile kıyaslandığında çoklu PCR metodunun çok daha hassas olduğu ortaya konulmuştur.

Balık hastalıklarının hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesi işletmelerdeki kayıpların ve hastalıkların yayılımının önlenmesi açısından son derece önemlidir. Özellikle ithal edilen canlı su ürünleri ile birçok patojen ülkemize giriş yapmaktadır. Türkmen ve Alpbaz (2001), yapmış oldukları bir araştırmada, ülkemize 279 farklı tür akvaryum balığı ithalinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kültürü yapılan balıkların yumurtaları da ithal edilmektedir. Bu ürünlerin hastalıklar yönünden gümrüklerde hassas ve kısa bir sürede incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı yapılan çalışma oldukça önemlidir. Oluşturulan bu PCR metoduyla beş farklı bakteri 1-2 gün gibi kısa bir sürede teşhis edilirken, besi yeri kültürüne dayalı teşhis yönteminde ise 4-5 güne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu metot ile hastalık semptomu göstermeyen taşıyıcı balıklardan patojen bakteriler tespit edilebilir ve hastalıkların yayılması önlenir.

Bu çalışma kapsamında çoklu PCR sonucunda *A. hydrophila* (43), *A. salmonicida* (28), *F. columnare* (8) ve *Y. ruckeri* (55) toplamda 134 ayrı örnekten izole edilirken, aynı bakteriler biyokimyasal testler sonucunda ise *A. hydrophila* (11), *A. salmonicida* (4), ve *Y. ruckeri* (20) olmak üzere toplamda 35 farklı örnekten izole edilmiştir. Biyokimyasal testler sonucunda izole edilen bakterilerin tamamı çoklu PCR yönteminde de izole edilmiştir. Ayrıca *F. columnare*'nin PCR sonucunda izole edilmesine rağmen besi yerlerinde çoğaltılamamış olması çoklu PCR metodunun biyokimyasal yöntemlere göre çok daha hassas olduğunu göstermektedir.

Bakterilerin teşhisine yönelik PCR metodu her bir bakteri için spesifik primerlerin kullanımı ile gerçekleştirilmektedir (Altınok ve Kurt, 2003). Bu çalışmada uygulanan çoklu PCR, sadece *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *R. salmoninarum*, *Y. ruckeri* bakterileri için uygulanabilmektedir. Bu durum bahsi geçen bakteriler dışında diğer balık patojenleri için de yeni PCR protokollerinin oluşturulması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Hastalık etmeni olan bakterilere karşı uygulanacak tedavide mutlaka bakterilerin besi yerlerinde izole edilmeleri gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle PCR metoduna dayalı olarak hastalık etmeni olan bakterilerin teşhis edilmesi korunma amaçlı ve sağlık yönetimi politikaları için destekleyici önem arz etmektedir.

4.5. Antibiyotik Dirençleri

Ampisilin, eritromisin, gentamisin, kanamisin, neomisin, oksolinik asit, oksitetrasiklin, streptomisin Avrupa ve Türkiye’de yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir (Costello vd., 2001). Tetrasiklin Türkiye’de balık çiftliklerinde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler arasında yer almasına karşın yapılan denemelerde bu antibiyotiğe karşı oluşan direncin %67 olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan su ürünleri yetiştiriciliğinde son yıllarda kullanımı yaygınlaşan florfenikole ise oldukça düşük bir direnç olduğu belirlenmiştir. Bahsi geçen bu iki antibiyotik Avrupa Birliği ilaç düzenleme konseyi (EEC) tarafından yayınlanan 2377/90 sayılı yayında kullanımı yasak olmayan ilaçlar grubunda yer almaktadır.

Yapılan çalışmada *Aeromonas* türlerinin oksolinik asit ve streptomisin dışında kalan bütün antibiyotiklere karşı belirli oranda direnç kazandığı belirlenirken, Öztürk vd. (2007), *Aeromonas hydrophyla*’nın streptomisine karşı dirençli olduğunu bildirmiştir. Bakterilerin aynı antibiyotiğe karşı farklı direnç seviyelerinin belirlenmesi, izolatların bölgesel farklılığı olarak izah edilebilir.

İzole edilen bakteriler arasında balıklarda patojen etkileri belirlenmemiş olan *Burkholderia cepacia*, *Cedecea davisae*, *Chromobacterium violaceum*, *Ewingella americana* ve *Weeksella virosa* gibi bakterilerin uygulanan çoğu antibiyotiğe karşı direnç oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas* ve *Pseudomonas* türlerinin neredeyse bütün antibiyotiklere karşı farklı oranlarda direnç göstermeleri, işletmelerden izole edilme sayıları ile paralellik göstermektedir. Mevcut

durum bu bakteri türlerinin bölgede su ürünleri yetiştiriciliği yapılan işletmelerde farklı antibiyotiklere maruz kalma ihtimalini göstermektedir.

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde balıklardan izole edilen bakteriler ve antibiyotiklere karşı direnç seviyeleri ile ilgili çalışmalar yok denecek düzeydedir. Bu anlamda bölgede yapılan çalışmalar, Balta vd. (2005) ve Karataş vd. (1995)'nin gökkuşağı alabalıklarından *Yersinia ruckeri* ve Candan ve Küçüker (1994)'in somonlarda *Aeromonas* spp. izolasyonu olarak gösterilebilir. Bu durum yapılan çalışmanın bölge açısından önemini göstermektedir.

Türkiye'de balık patojenleri ile ilgili yapılan çalışmalarda aralarında *Yersinia ruckeri*, *Enterococcus seriolicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophyla*, *Aeromonas* spp., *L. garvieae*, *V. anguillarum* gibi balık patojenlerinin tetrasiklin, eritromisin, oksitetrasiklin, streptomisin ve ampisilin gibi antibiyotiklere karşı direnç oluşumu rapor edilmiştir (Kırkan vd., 2006; Öztürk vd., 2007; Akşit ve Kum, 2008). Gerçekleştirilen bu çalışmada, bakteriler tarafından antibiyotiklere karşı oluşan direnç seviyelerinin florfenikol, oksitetrasiklin, oksolinik asit, kanamisin ve gentamisin dışındaki bütün antibiyotiklerde %50'den yüksek olması, ülkemizde bakteriyel hastalıkların tedavisinin gelecekte bu günden daha da zor olacağını göstermektedir. Bu nedenle bakteriyel hastalıkların önlenmesinin gerekliliği ve tedavi edici yeni ajanların kullanımına ağırlık verilmesi gerekliliği ortaya konulmaktadır.

5. SONUÇLAR

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Trabzon ve Rize illerinde faaliyet gösteren 34 farklı alabalık işletmesinde, bakteriyel balık patojenlerinin belirlenmesi amacıyla mevsimsel olarak 558 adet alabalık örnekleme yapılmıştır.

Balık sağlığı açısından işletmelerin yeterince bilgi sahibi olmadıkları, su kriterlerinin iyileştirilmesi ve ilaç kullanımı gibi konularda yanlış uygulamaların olduğu belirlenmiştir. Hastalıkların gerek işletme bünyesinde ve gerekse diğer işletmelere bulaşması konusunda gerekli hassasiyetin gösterilmediği tespit edilmiştir. Balıkların tatlı su sistemlerinde kuluçka ve ön büyütme dönemlerini tamamladıktan sonra, denizde kafes sistemlerine taşınması sonucu patojenlerin geniş ölçüde yayılım gösterebileceği belirlenmiştir.

İşletmelerden alınan balık numuneleri, laboratuarda klasik bakteriyolojik metotlar kullanılarak incelenmişlerdir. Ayrıca aynı örneklere 5 farklı bakterinin varlığının belirlenmesi amacıyla (*Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophyla*, *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Flavobacterium columnare*) çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) metodu uygulanmıştır.

Yapılan araştırmalarda biyokimyasal testler sonucunda örneklenen 115 balıktan 40 farklı bakteri türü izole edilmiştir. Tanımlanan bakteriler içerisinde *Yersinia ruckeri* en yaygın tür olarak belirlenirken, *Aeromonas* ve *Pseudomonas* türlerinin hemen her mevsimde işletmelerde bulunduğu tespit edilmiştir. *Pseudomonas putida* Japonya dışında balıklardan ilk kez izole edilirken, *Pseudomonas loteola*'nın ise balıklarda enfeksiyon meydana getirdiği rapor edilmiştir. Genellikle denizel sistemlerde rapor edilen *Pasteurella pneumotropica* tatlı su yetiştiriciliği yapılan işletmelerden izole edilmiştir. Tanımlanan bakteriler arasında insan gıdası olarak tüketilen ürünlerde istenmeyen bakteriler grubunda yer alan *Salmonella* sp.'nin varlığı dikkat çekmiştir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde alabalık yetiştiriciliği yapan işletmelerde bulunan balıkların bakteri çeşitliliği, mevsimsel ve tür seviyesinde ayrıntılı olarak belirlenmiştir.

Aeromonas hydrophila, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin aynı anda teşhisine olanak sağlayacak çoklu PCR protokolü oluşturularak, bu bakterilerin kısa zamanda hassas bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlanmıştır. Ayrıca uygulanan farklı teşhis metotlarının kıyaslanması sonucu, PCR metodunun daha verimli olduğu ortaya konulmuştur.

Yapılan örneklemeleerde besi yerlerinde izole edilen bakterilerin 12 farklı antibiyotiğe karşı direnç seviyelerinin belirlenmesi amacıyla antibiyogram testleri uygulanmış, bakterilerin en yüksek direnci %86,67 ile neomisin ve %71,13 ile sephalothin'e karşı oluşturdukları belirlenmiştir. Uygulanan antibiyotikler içerisinde florfenikol bakteriler tarafından en az direnç gösterilen antibiyotik olmuştur. Genel olarak gentamisin, oksolinik asit, oksitetrasiklin ve kanamisin gibi antibiyotiklere karşı da bakterilerin duyarlı oldukları belirlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Doğu Karadeniz Bölgesi su ürünleri yetiştiriciliği açısından önemli bir potansiyele sahiptir. Son yıllarda bölgede denizlerde kafes balıkçılığının yaygınlaşması sonucu alabalık yetiştiriciliğinin yanı sıra levrek yetiştiriciliği de gelişim göstermektedir. Gerçekleşen yoğun yetiştiricilik faaliyetleri sonucunda hastalıkların varlığı üretimi sınırlandıran en önemli sorunların başında gelmektedir. Bu bağlamda, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yoğun bir şekilde yetiştiriciliği yapılan alabalıkların bakteriyel hastalıklarının tespit edilmesine yönelik olarak yapılan bu tez çalışması önemli sonuçları ortaya koymaktadır.

Bu sonuçlar ışığında, su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelere, konu ile ilgili bilimsel çalışmalar yürüten araştırmacılara ve yeni yasal düzenlemelere katkı sağlayabilecek öneriler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Su ürünleri yetiştiriciliği yapılacak işletmelerin projelendirilme aşamasında genellikle üretim kapasitesi ve rantabilite dikkate alınmaktadır. Bu aşamada projelerin balık sağlığı muhafazası açısından da ele alınması gerekmektedir.

2. Oluşturulan çoklu PCR protokolü sadece *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*'nin aynı anda teşhisine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle diğer bakteriyel patojenlerin teşhisine yönelik yeni protokol çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

3. Bakterilerin biyokimyasal metotlar kullanılarak teşhis edilmesinde, öncelikle balık dokularından izole edilmesi gerekmektedir. Ancak balıklarda düşük sayıda bulunan bakterilerin besi yerlerinde üretilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Ayrıca klasik teşhis metotları oldukça uzun zaman almaktadır. Bu nedenle, patojenik balık hastalıklarının teşhisinde klasik metotların yanı sıra moleküler teşhis yöntemlerinin de kullanımı yaygınlaştırılmalıdır.

4. Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı değişik seviyelerde oluşan direnç, ileride bakteriyel hastalıkların tedavisinde zorluklar yaşanacağını göstermektedir. Hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımında bakterilerin tanımlanması, antibiyogram test sonuçlarına göre ilaç seçimi, uygun doz ve süre mutlaka belirlenmelidir.

5. Her şeyden önce hastalıkların oluşumunu önleyecek tedbirlere yönelmeli, aşılama ve genel hijyen tedbirleri alınarak oluşabilecek kayıplar en aza indirilmelidir.

6. Yapılan saha çalışmalarında, işletmelerin ticari kaygıları nedeniyle örnekleme çalışmalarında, sıkıntılar meydana gelmektedir. Bu nedenle işletme sahipleri konu ile ilgili bilgilendirilmeli ve kanuni yükümlülükler getirilmelidir.

7. Gerçekleştirilen teşhis metotları ve tedaviye ışık tutacak olan tüm bu çalışmalar, bir işletmenin yıllık giderlerinin sadece %1'i gibi bir maliyeti oluşturmaktadır. Bu nedenle işletmelerin sağlık yönetimi açısından bilgilendirilerek ekonomik olarak daha verimli bir hale getirilmesi sağlanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

- Akaylı, T. ve Timur G., 2004. Yavru Alabalıklarda (*Oncorhynchus Mykiss*) Pseudomonad Septisemisi Üzerinde bir Çalışma, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Makale-13.
- Akşit D. ve Kum, C., 2008. Gökkuşuğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,19, 1-7.
- Allison, L.N., 1958. Multiple Sulfa Therapy of Kidney Disease A- Mong Brook Trout, Progressive Fish Culturists, 20, 66-68.
- Altay, K., Fatih Aydın, M.F., Uluisik, U., Aktas, M. ve Dumanli, N., 2008. *Theileria Annulata* ve *Theileria Buffeli*'nin Teşhisinde Multiplex PCR'ın Kullanılması, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32, 1-3.
- Altinok, I. ve Grizzle, J.M., 2001. Effects of Salinity on *Flavobacterium columnare* Infection of Channel Catfish, Goldfish, Striped Bass, and Gulf Sturgeon, J. Fish Dis., 24, 361–367.
- Altinok, I., Grizzle, J.M. and Liu, Z., 2001. Detection of *Yersinia ruckeri* in Rainbow Trout Blood by Use of Polymerase Chain Reaction, Dis. Aquat. Org., 44, 29–34.
- Altinok, I. and Kurt, I., 2003. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3,131-138.
- Altinok, I., 2004. Toxicity and Therapeutic Effects of Chloramine-T for Treating *Flavobacterium columnare* Infection of Goldfish, Aquaculture, 239, 47–56.
- Altinok, I., Kayis, S. and Capkin, E., 2006. *Pseudomonas putida* Infection in Rainbow Trout, Aquaculture, 261, 850–855.
- Altinok, I., Balta, F., Capkin, E. and Kayis, S., 2007. Disease of Rainbow Trout Caused by *Pseudomonas luteola*, Aquaculture, 273, 393-397.
- Amandi, A., Hiu, S.F., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L., 1982. Isolation and Characterization of *Edwardsiella tarda* from Fall Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), Appl. Environ. Microbiol. 43, 1380–1384.
- Anacker, R.L. and Ordal, E.J., 1959. Studies on The Mycobacterium, Chondrococcus, Columnaris I Serological Typing, Journal of Bacteriology, 78, 25-32.
- Andersen, S.R. and Sandaa, R.A., 1994. Distribution of Tetracycline Resistance Determinants Among Gram-Negative Bacteria Isolated from Polluted and Unpolluted Marine Sediments, Applied and Environmental Microbiology, 60, 908-912.
- Aoki, T., Hirono, I. and Hayashi, A., 1995. The Fish Pathogenic Bacterium *Pasteurella piscicida* Detected by Polymerase Chain Reaction (PCR), Asian Fisheries Society, 347-353.

- APHA, (American Public Health Association), American Water Works Association, and Water Environment Federation, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. APHA, Washington, DC.
- Argenton, F., De Mas, S., Malocco, C., Dalla Valle L., Giorgeti, G. ve Colombo, L., 1996. Use of Random DNA Amplification to Generate Specific Molecular Probes for Hybridization Tests and PCR-Based Diagnosis of *Yersinia ruckeri* Diseases of Aquatic Organisms, 24, 121-127.
- Ateşoğlu, A., 1996. Balık Hastalıkları Teşhis Laboratuvarının Kuruluşu ve Özellikleri, Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 20, 34.
- Atkinson, B.F., 1992. Atlas of Diagnostic Cytology, general Cytology principles, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Austin, B., Embley, T.M. and Goodfellow, M., 1983. Selective Isolation of *Renibacterium salmoninarum*, FEMS Microbiology Letters, 17, 111-4.
- Austin, M. and Stobie, M., 1992. Recovery of *Micrococcus luteus* and Presumptive Planococcus from Moribund Fish During Outbreaks of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry Syndrome (RFTS) in England, J. Fis. Dis., 15, 203-206.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 3rd Edition Springer Publishing, New York.
- Austin, B. and Austin, D.A., 2007. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 4. Edition Springer Publishing, New York.
- Bader, J.A. and Shotts, E.B., 1998. Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene, J. Aquat. Anim. Health, 10, 311-319.
- Balta, F., Çağırğan, H. ve Kayış, Ş., 2005. Kültürü Yapılan Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) İzole edilen *Yersinia ruckeri*'nin İdenfikasyonunda API 20E Testinin Kullanılabilirliği, Türk Sucul Yaşam Dergisi, 4, 434-237.
- Barry, A.L. and Thornsberry, C., 1985. Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures. In: Manual of Clinical Microbiology, 4 Th Edn., (Eds.: Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J., Shadamy, H. J.), Washington American Society of Microbiology, 978-987.
- Bast, L., Daly, J.G., Degrandis, S.A. and Stevenson, M.W., 1988 Evaluation of Profiles of *Aeromonas salmonicida* as Epidemiological Markers of Furunculosis Infections in Fish, J. Fish Dis, 11, 133-145.
- Becker, K., Roth, R. and Peters, G., 1998. Rapid and Specific Detection of Toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene, Journal of Clinical Microbiology, 36, 2548-2553.
- Benchimol, L.L., Souza, C.L., Garcia, A.A.F., Kono, P.M.S., Mangolim, C.A., Barbosa, A.M.M., Coelho, A.S.G. and Souza, A.P., 2000. Genetic Diversity in Tropical Maize Inbred Lines: Heterotic Group Assignment and Hybrid Performance Determined by RFLP Marker, Plant Breeding, 119,491-496.

- Benson, H.J., 1985. Microbiological Applications: A Laboratory Manual in. General Microbiology, 4th Ed. W. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- Bernardet, J.F., Campbell, A.C. and Buswell, J.A., 1990. *Flexibacter maritimus* is The Agent of 'Black Patch Necrosis' in Dover Sole in Scotland, Diseases of Aquatic Organisms, 8, 233-237.
- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, M., Kerters, K. and Vandamme, P., 1996. Cutting A Gordian Knot: Emended Classification and Description of The Genus *Flavobacterium*, Emended Description of The Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flavobacterium hydatis* Nom. Nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait, Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 128-148.
- Biosca, E.G., Marco-Noales, E., Amaro, C. and Alcaide, E., 1997. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Vibrio vulnificus* Biotype 2: Development and Field Studies, Appl. Environ. Microbiol., 63, 537-542.
- Borg, A.F., 1960. Studies on Myxobacteria Associated with Diseases in Salmonid Fishes. American Association for The Advancement of Science, Wildlife Disease. Washington, DC. 8, 1-85.
- Bouallegue, O., Mzoughi, R., Weill, F.X., Mahdhaoui, N., Salem, B.Y., Sboui, H., Grimont, F. and Grimont, P.A., 2004. Outbreak of *Pseudomonas putida* Bacteraemia in A Neonatal Intensive Care Unit, J. Hosp. Infect., 57, 88-91.
- Braun, J., 2005. The World Food Situation an Overview, International Food Policy Resear. Institute, CGIAR Annual Meeting, Marrakech, Morokko.
- Brauns, L.A., Hudson, M.C. and Oliver, J.D., 1991. Use of The Polymerase Chain Reaction in Detection of Culturable and Nonculturable *Vibrio vulnificus* Cells. Applied Environmental Microbiology, 57, 2651-2655.
- Brown, J.H., 1989. Use and Abuse of Antibiotics in Aquaculture. World Aqu., 20, 34-43.
- Brown, A.G. and Grant, A.N., 1992. Use of Amoxycillin by Injection in Atlantic Salmon Broodstock, Vet. Rec., 12, 237.
- Brown, L.L., Iwama, G.K., Evelyn, P.T.P., Nelson, W.S. and Levine, R.P., 1994. Use of the Polymerase Chain Reaction (PCR) to Detect DNA from *Renibacterium salmoninarum* within Individual Salmonid Eggs, Dis. Aquat. Org., 65, 171-199.
- Brun, R., Nougayrede, P., Chene, P., Vuillaume, A. and Crespeau, F., 1991. Bilan Sanitaire De 2 Ans D'eleveges'acipenser Baeri En Piscicultures Intensives. In: Williot, P. (Ed.), Acipenser: Actes Du Premier Colloque International Sur L'esturgeon. Centre National Du Machinisme Agricole Du Genie Rural Des Eaux Et Des Forests, Cestas, France, 429-437.
- Bruno, D.W., 1986. Histopathology of Bacterial Kidney Disease In Laboratory Infected Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., with Reference to Naturally Infected Fish, Journal of Fish Diseases, 9, 523-37.
- Bruno, D.W., 1988. The Relationship between Auto-Agglutination, Cell Surface Hydrophobicity and Virulence of Fish Pathogen *Renibacterium salmoninarum*, FEMS Microbiology Letters, 51, 135-40.

- Bullock, G.L. and Anderson, D.P., 1984. Immunization Against *Yersinia ruckeri*, Cause of Enteric Redmouth Disease, In Symposium on Fish Vaccination, Office International Des Epizooties, Paris, 66-151.
- Burgart, L.J., Robinson, R.A., Heller, M.J., Wilke, W.W., Iakoubova, O.K. and Cheville, J.C., 1992. Multiplex Polymerase Chain Reaction, Modern Pathology, 5, 320-323.
- Call, D.R., Borucki, M.K. and Loge, F.J., 2003. Detection of Bacterial Pathogens in Environmental Samples Using DNA Microarrays, Journal of Microbiological Methods, 53, 235-243.
- Candan, A., 1993. Çipura (*Sparus aurata* L.1758) Balıklarında *Vibrio anguillarum* Enfeksiyonu, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 23, 25-27.
- Candan, A. ve Küçüker, A.M., 1994. Karadeniz'de Üretilen Salmon (*Salmo salar*) Balıklarında Hareketli *Aeromonas* Septisemisi Üzerine Bir Araştırma, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 1-2.
- Candan, A., 2000. Türkiye'de Üretilen Atlantik Salmon (*Salmo salar* L.)'unda Tespit Edilen İlk Vibriosis Olgusu, Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 30, 107-108.
- Candan, A., 2002. First Report on the Diagnosis of Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) Based on Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) in Turkey, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 22, 45-48.
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N., 1992. Microbiology: A Laboratory Manual (Third Ed), Benjamin/Cummings Pub. Co., New York, 125-179.
- Cascon, A., Anguita, J., Hernandez, C., Sanchez, M., Fernandez, M. and Naharro, G., 1996. Identification of *Aeromonas hydrophila* Hybridisation Group 1 by PCR Assays, Applied Environmental Microbiology, 62, 1167-1170.
- Ceschia, G., Giorgetti, G., Giavenni, R. and Sarti, M., 1992. A New Problem for Italian Trout Farms: Streptococcosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Bull Eur Assoc Fish Pathol, 12, 71-72.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. and Caskey, C.T., 1988. Deletion Screening of The Duchenne Muscular Dystrophy Locus Via Multiplex DNA Amplification, Nucleic Acids Res., 16, 11141-11156.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. and Caskey, C.T. 1989. Multiplex PCR for The Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy, (in) Gelfand, D.H., Innis, M.A., Shinsky, J.J., and White, T.J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, California, 272-281
- Choppa, P.C., Vojdani, A., Tagle, C., Andrin R. and Magtoto, L., 1998. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in Cell Cultures and Blood Samples of Patients with Chronic Fatigue Syndrome, Molecular and Cellular Probes, 12, 301-308.
- Chopra, I., 1994. Tetracycline Analogs Whose Primary Target is Not The Bacterial Ribosome, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38, 637-640.
- Chu, W.H. and Lu, C.P., 2005. Multiplex PCR Assay for the Detection of Pathogenic *Aeromonas hydrophila*, J. Fish Dis., 28, 437-441.

- Cizman, M., 2003. The Use and Resistance to Antibiotics in The Community, International Journal of Antimicrobial Agents, 21, 297-307.
- Coquet, L., Cosette, P., Quillet, L., Petit, F., Junter, G.A. and Jouenne, T., 2002. Occurrence and Phenotypic Characterisation of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm, Appl. Environ. Microbiol. 68, 470-475.
- Cornick, J.W., Chudyk, R.V. and McDermott, L., 1969. Habitat and Viability Studies on *Aeromonas salmonicida*, Causative Agent of Furunculosis, The Progressive Fish Culturist, 31, 90-93.
- Cossarini, D., 1985. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to Titrate Rainbow Trout Serum Antibodies Against to Pathogens, *Yersinia ruckeri* and *Egtved virus*, Aquaculture, 49, 197-208.
- Costello, M.J., Grant, A., Davies, I.M., Cecchini, S., Papoutsoglou, S., Quigley, D. and Saroglia, M., 2001. The Control of Chemicals Used in Aquaculture in Europe. J. Appl. Ichthyol., 17, 4, 173-180.
- Cunningham, C.O., 2002. Molecular Diagnosis of Fish and Shellfish Diseases: Present Status and Potential Use in Disease Control, Aquaculture, 206, 19-55.
- Çağrgan, H., 1993. The First Isolation *Pasteurella Piscicida* from Cultured Sea Bream (*Sparus Aurata*) in Turkey, Hay. Araş. Derg., 3, 82-83.
- Çelikkale, S., 1991. Türkiye Balıkçılığında Sektörel Yapı ve Politikalar, Eğitiminin 10. Yılında Su Ürünleri Sempozyumu, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Kasım, İzmir.
- Çelikkale, S., Düzgüneş, E. ve Okumuş, İ., 1999. Türkiye Su Ürünleri Sektörü ve Avrupa Birliği ile Entegrasyonu, İstanbul Ticaret Odası, Yayın No: 1999-63.
- Çırak, M.Y., 1999. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sistemleri, T. Klin. Tıp Bilimleri, 19, 242-248.
- Decostere, A., Haesebrouck, F. and Devriese, L.A., 1998. Characterization of Four *Flavobacterium Columnare* (*Flexibacter Columnaris*) Strains Isolated from Tropical Fish, Vet. Microbiol., 62, 35-45.
- del Cerro, A., Marquez, I. and Guijarro, J.A., 2002. Simultaneous Detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR, App. Environ. Microbiol., 68, 5177-5180.
- Dilek, A. ve Kum, C., 2008. Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus Mykiss*, Walbaum 1792)'nda Sık Görülen Patojen Mikroorganizmaların Tespiti ve Antibiyotik Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi, Yüzüncü Yıl Veteriner Fakültesi Dergisi, 19, 1-7
- Dudley, J.W., Saghai Maroof, M.A. and Rufener, G.K., 1991. Molecular Markers and Grouping of Parents in A Maize Breeding Program, Crop Sci, 31, 718-723.
- Durborow, R. M., Mitchell, A. J. and Crosby, M. D., 1998. Ich (White Spot Disease), SRAC Publication, No: 476.
- Durborow, R.M., 2003. Protozoan Parasites, SRAC Publication, No: 4701.

- Edwards, M.C. and Gibbs, R.A., 1994. Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications, PCR Methods and Applications, 3, 65-75.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H., 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* Strains Isolated from Fish in Europe, Asia, and Australia, Applied Environmental Microbiology, 65.
- Ellis, E., 1988. Vaccination Against Enteric Redmouth Disease (ERM) in Fish Vaccination, Academic Press, London, 85-82.
- Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J. and Klapper, P.E., 2000. PCR: Multiplex Optimization and Application in Diagnostic Virology, Clinical Microbiology Reviews, 13, 559-570.
- Emre, Y. ve Kürüm, V., 1998. Havuz ve Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği Teknikleri, 4, Minpa Matbaacılık Tic. Ltd. Şti., Rüzgarlı Soydaşlar Sk. No: 4/12 Ulus-Ankara.
- Fryer, J.L. and Sanders, J.E., 1981. Bacterial Kidney Disease of Salmonid Fish, Annual Review of Microbiology, 35, 273-98.
- Fryer, J.L. ve Lannan, C.N., 1993. The History and Current Status of *Renibacterium salmoninarum* The Causative Agents of Bacterial Kidney Disease in Pacific Salmon, Fisheries Research, 17, 15-33.
- Gedik, K., Verep, B., Terzi, E. and Fevzioğlu, S., 2009. Fırtına Deresi (Rize)'nin Fiziko-Kimyasal Açidan Su Kalitesinin Belirlenmesi, XV. Ulusal Su ürünleri Sempozyumu, Temmuz, Rize.
- Ghittino, C. and Prearo, M., 1992. Segnalazione di *Streptococcosi nella* Trota Iridea (*Oncorhynchus mykiss*) in Italia: Notapreliminare, Boll Soc Ital Pathol, 8, 4-11.
- Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Cutuli, M.T., Domenech, A., Domínguez, L., and Fernández-Garayzábal J.F., 1999. Development of a PCR Assay for Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout, Appl Environ Microbiol., 65, 346-350.
- González, S.F., Krug, M.J., Nielsen, M. E., Santos, Y. and Call, D.R., 2004. Simultaneous Detection of Marine Fish Pathogens by Using Multiplex PCR and a DNA Microarray, Journal of Clinical Microbiology, 42, 1414-1419.
- Grant, A.N. and Laidler, L.A., 1993. Assessment of Antimicrobial Sensitivity of *Aeromonas salmonicida* Isolates from Farmed Atlantic Salmon in Scotland, Vet.Rec., 133, 389-391.
- Gustafson, R.H. and Bowen, R.E., 1997. Antibiotic Use in Animal Agriculture, Journal of Applied Microbiology, 83, 531-541.
- Hadse, M., Oğur, R. ve Tekbaş, Ö.F., 2002. Ankara İl Merkezinde Bulunan Askeri Birliklerdeki Kuyu Sularının Polimeraz Zincir Reaksiyon Sistemi ile Mikrobiyolojik Analizlerinin Yapılması, Gülhane Tıp Dergisi, 44, 373-377.
- Hedrick, R.P., 1998. Relationships of Host, Pathogen, and Environment: Implications for Diseases of Cultured and Wild Fish Populations, Journal of Aquatic Animal Health, 10, 107-111.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-step Protocol, Biotechniques, 23, 504-511.

- Hiney, M., Dawson, M.T., Heery, D.M., Smith, P.R., Gannon, F., and Powell, R., 1992. DNA Probe for *Aeromonas salmonicida*, Applied Environmental Microbiology, 58, 1039-1042.
- Hiney, M., Smith, P. and Bernoth, E.M., 1997. Covert *Aeromonas salmonicida* Infections. In: Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J., Olivier, G. and Smith, P. (eds.) Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research, Academic Press, London, 54-97.
- Hirono, I., Masuda, T. and Aoki, T., 1996. Cloning and Detection of The Hemolysin Gene of *Vibrio anguillarum*, Microbial Pathogenesis, 2, 293-342.
- Hoşsu, B., Korkut, A.Y. ve Fırat, A., 2001. Balık Besleme ve Yem Teknolojisi I, Ege Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Yayınları No: 50 Ders Kitabı Dizini, No: 19 Bornova/İzmir.
- Hsu, H.M., Bowser, P.R. and Chachte, J.H., 1991. Development and Evaluation of A Monoclonal-Antibody-Based-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for The Diagnosis of *Renibacterium salmoninarum* Infection, J. Aquat. Anim. Health 3, 168-175.
- Hussein, M.A. and Hatai, K., 2006. Multiplex PCR Assay for Detection of *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactia* ve *Lactococcus garvieae* in Cultured Yellowtail. Aquaculture Science, 54, 269-274.
- Inglis, V., Frerichs, G.N., Millar, S.D. and Richards R.H., 1991. Antibiotic Resistance of *Aeromonas salmonicida* Isolated from Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., in Scotland, J.Fish Dis., 14, 353-358.
- Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R., 1993. Bacterial Diseases of Fish, Halsted Pres, New York.
- Izumi, S. and Wakabayashi, H., 2000. Sequencing of GyrB and Their Application in The Identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR, Fish Pathol., 35, 93-94.
- Jeon, S.H., Han, D.C., Lee, S.G., Park, H.M., Shin, D.J. and Lee, Y.B., 2007. *Eikenella corrodens* Cervical Spinal Epidural Abscess Induced by a Fish Bone, J. Korean Med. Sci., 22, 380-382.
- Kan, N. ve Sarıeyyüpoğlu, M., 2008. Elazığ Şehir Kanalizasyonunun Keban Baraj Gölü'ne Döküldüğü Yerden Yakalanan Balıklarda Streptokokus'ların Araştırılması, Fırat Üniv.Fen ve Müh. Bil. Dergisi, 20, 271-277.
- Karataş, S., Candan. ve A., Demircan, D., 1995. Enteric Red Mouth Disease in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) on The Black Sea, The Israeli Journal of Aquaculture, 57, 225-263.
- Kettler, S., Pfeilputzien, C. and Hoffman, R., 1986. Infection of Grayling (Thymallus) with The Agent of Bacterial Kidney Disease (BKD), Bulletin of The European Association of Fish Pathologists, 6, 69-71.
- Kırkan, S., Goksoy, E.O., Kaya, O. and Tekbıyık, S., 2006. In-vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Turk. J. Vet. Anim. Sci., 30, 337-341.

- Kırkan, Ş., Göksoy, E.Ö., Kaya, O. ve Tekbıyık, S., 2006. In-vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Turk. J. Vet. Anim. Sci., 30, 377-341.
- Kinne, O., 1984. Introduction, Pisces, Diseases of Marine Animals, Hamburg, Biologische Anstalt Helgoland, IV, I, 114-179.
- Kitao, T., Aoki, T., Fukudome, M., Kawano, K., Wada, Y. and Mizuno, Y., 1983. Serotyping of *Vibrio anguillarum* from Diseased Freshwater Fish in Japan, J. Fish Dis., 6, 175-181.
- Klinger, R.E. and Floyd, R. F., 1998. Introduction to Freshwater Fish Parasites, IFAS Extension CIR 716.
- Kong, R.Y.C., Lee, S.K.Y., Law, T.W.F., Law S.H.W. and Wu, R.S.S., 2002. Rapid Detection of Six Types of Bacterial Pathogens in Marine Waters by Multiplex PCR, Water Res., 36, 1173–1177.
- Kozińska, A. and Pêkala, A., 2004. First Isolation of *Shewanella putrefaciens* from Freshwater Fish A Potential New Pathogen of Fish, Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 24, 189–193.
- Kubilay, A. and Uluköy, G., 2004. First Isolation of *Staphylococcus epidermidis* from Cultured Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) in Turkey, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 24, 137-143.
- Kurabachew, M., Enger, O., Sandaa, R., Skuce, R. and Bjorvatn, B., 2004. A multiplex Chain Reaction Assay for Genus Group and Species Specific Detection of Mycobacteria, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 49, 99–104.
- Kusuda, R. and Toyoshima, T., 1976. Characteristics of a Pathogenic *Pseudomonas* Isolated from Cultured Yellowtail, Fish Pathol. 1, 133–139.
- Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L., 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. A Fish Pathogen. Int J Systbacteriol., 41, 406–409.
- Lasee, B.A., 1995. Introduction to Fish Health Management, U.S. Fish and Wildlife Service La Crosse Fish Health Center 555, Lester Avenue Onalaska, Wisconsin, 54650.
- Lillehaug, A., Lunder, T. and Poppe, T.T., 1992. Field Testing of Adjuvanted Furunculosis Vaccines in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. J.Fish Dis., 15, 485-496.
- Luna, L.G., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edn., Mcgraw Hill Book Co. New York.
- Macfarlane, R.D., Bullock, G.L. and Mclaughlin, J.J.A., 1986. Effects of Five Metals on Susceptibility of Striped Bass to *Flexibacter columnaris*, Trans. Am. Fish. Soc., 115, 227–231.
- Mach, P.A. and Grimes, D.J., 1982. R-plasmid Transfer in a Wastewater Treatment Plant, Appl. Environ. Microbiol., 44, 1395-1403.
- Magarinos, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A.E. and Lamas, J., 2001. Effect of Temperature on The Development of Pasteurellosis in Carrier Gilthead Seabream (*Sparus aurata*), Aquaculture. 195, 17–21.

- Marshall, S., Heath, S., Henriquez, V. and Orrego, C., 1998. Minimally Invasive Detection of *Piscirickettsia salmonis* in Cultivated Salmonids via PCR, Applied and Environmental Microbiology, 64, 3066–3069.
- Marshall, S., Clark, C.G., Wang, G., Mulvey, M., Kelly, M.T. and Johnson, W.M., 1999. Comparison of Molecular Methods for Typing *Vibrio parahaemolyticus*, J. Clin. Microbiol., 37, 2473–2478.
- Martinez-Murcia, A.J., Esteve, C., Garay, E. and Collins, M.D., 1992. *Aeromonas allosaccharophila* sp. Nov., A New Mesophilic Member of The Genus *Aeromonas*. FEMS Microbiology Letters, 91, 199–206.
- Mata, A.I., Blanco, M.M., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J. F. and Gibello, A., 2004. Development of a PCR Assay for *Streptococcus iniae* Based on The Lactate Oxidase (*lctO*) Gene with Potential Diagnostic Value, Vet Microbiol., 101, 109–116.
- McCarthy, D.H. and Roberts, R.J., 1980. Furunculosis of Fish The Present State of Our Knowledge, Adv. Aquat. Microbiol.,
- McCormick, W.A., Stevenson, R.M.W. and Macinnes, J.I., 1990. Restriction Endonuclease Fingerprinting Analysis of Canadian Isolates of *Aeromonas salmonicida*, Can. J. Microbiol., 36, 24-32.
- McDaniel, D., 1979. Fish Health Section Bluebook: Procedures for The Detection and Identification of Certain Fish Pathogens. Fish Health section, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 118.
- Messmer, M.M., Melchinger, A.E., Boppenmaier, J. and Herrmann, R.G., 1993. Relationships Among Early European Maize (*Zea mays* L.) Inbred Lines: II. Comparison of Pedigree and RFLP Data, Crop. Sci., 33, 944-950.
- Mishra, S.S., 1998. Use of Dot Immunoassay for Rapid Detection of Pathogenic Bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila* from Shrimps and Fishes, Indian Journal of Marine Science, 26, 222-226.
- Miyata, M., Aoki, T., Inglis, V., Yoshida, T. and Endo, M., 1995. RAPD Analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*, J. Appl. Bacteriol., 79, 181-185.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction, Methods in Enzymology, 115, 335-350.
- Muroga, K., 1990. Bacterial Infections in Cultured Fishes in Japan, In: R. Hirano and I. Hanyu, Editors, The Second Asian Fisheries Forum, Manila, Asian Fisheries Society, 963–966.
- NCCLS., 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, Second Edition. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, Pennsylvania, USA. 2002.
- Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y. and Larsen, J.L., 2001. Is *Aeromonas hydrophila* The Dominant Motile *Aeromonas* Species that Causes Disease Outbreaks in Aquaculture Production in the Zhejiang Province of China?

- Nishizawa, T., Savas, H., Isıdan, H., Ustundag, C., Iwamoto, H. and Yoshimizu, M., 2006. Genotyping and Pathogenicity of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus from Free-Living Turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish Coastal Area of the Black Sea. Applied and Environmental Microbiology, 72, 2373-2378.
- OIE, 2003. The World Organisation for Animal Health, Bacterial Kidney Disease (*Renibacterium salmoninarum*). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003. World, Office International Des Épizooties, Paris.
- Ordal, E.J. and Earp, B.J., 1956. Cultivation and Transmission of The Etiological Agent of Bacterial Kidney Disease, Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine, 92, 85.
- Orozova, P., Chikova, V., Kolarova, V., Nenova, R., Konovska, M. and Najdenski, H., 2008. Antibiotic Resistance of Potentially Pathogenic *Aeromonas* Strains, Trakia Journal of Sciences, 6, 71-77.
- Osorio, C.R., Collins, M.D., Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Romalde, J.L. 1999. 16S rRNA Gene Sequence Analysis of *Photobacterium damsela* and Nested PCR Method for Rapid Detection of The Causative Agent of Fish Pasteurellosis, Applied and Environmental Microbiology, 65, 2942-2946.
- Önalan, S.K., 2002. Tortum (Erzurum) İlçesi ve Köylerinde Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiriciliği Yapılan Çiftliklerdeki Su Kalitesi ile Balık Ölümleri Arasındaki İlişki, (Proje) [Http://Erzurum.Vet.Gov.Tr/Biten.Htm](http://Erzurum.Vet.Gov.Tr/Biten.Htm)
- Özcelep, T., 2009. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Bazı Ekonomik Balık Türlerinde Görülen Parazitler ve Türkiye'deki Durum, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Öztürk, D., Adanır, R. ve Türütoğlu, H. 2007. Bir Sazan (*Cyprinus carpio*) İşletmesinde *Aeromonas hydrophila* İzolasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığı, XIV. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Eylül, Muğla.
- Palacios, M.A., Zamora, M.J., Velazquez, J., Zamora, E. and Duran, A., 1993. Streptococcus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Spain, Boll. Sci. Ital. Pathol., 13, 11-14.
- Patel, S., Yates, M. and Saunders, N.A., 1997. PCR-Enzymelinked Immunosorbent Assay and Partial Rrna Gene Sequencing: A Rational Approach to Identifying Mycobacteria, J. Clin. Microbiol., 35, 2375-2380.
- Pickup, R.W., Rhodes, G., Cobban, R.J. and Clarke, K.J., 1996. The Postponement of Non-Culturability in *Aeromonas salmonicida*, Journal of Fish Diseases, 19, 65-74.
- Pillay, T.V.R., 1995. Aquaculture Principles and Practices, Fishing, News Boks A Division of Blackwell Science Ltd. Osney Mead, Oxford.
- Plumb, J.A., 1999. Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes Iowa State University Press, Ames, IO, USA.
- Popovic, N.T., Coz-Rakovac, R. and Strunjak-Perovic, I., 2007. Commercial Phenotypic Tests (API 20E) in Diagnosis of Fish Bacteria: A Review, Veterinarni Medicina, 52, 49-53.
- Prichard, R. and Tait, A., 2001. The Role of Molecular Biology in Veterinary Parasitology, Veterinary Parasitology, 98, 169-194.

- Rahman, M.H., Suzuki, S. and Kawai, K., 2001. The Effect of Temperature on *Aeromonas hydrophila* Infection in Goldfish, *Carassius Auratus*, Journal of Applied Ichthyology, 17, 287-285.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A. and Luzzi, I., 1999. Occurrence of Vibrio and Other Pathogenic Bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) Harvested from Adriatic Sea, Italy, International Journal of Food Microbiology, 49, 43-48.
- Roberts, R. J. and Shepherd, C. J., 1997. Handbook of Trout and Salmon Disease, Third Edition, Fishing News Boks, A Division of Blackwell Science Ltd., 179.
- Ross, A.J. and Klontz, G.W., 1965. Oral Immunization of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Against an Etiological Agent of Redmouth Disease, Journal of The Fisheries Research Board of Canada, 22, 713-719.
- Rucker, R.R., 1966. Redmouth Disease of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*), Bull. off. Int. Epizoot., 65, 825-830.
- Saitanu, A., Chongthaleong, M., Endo, T., Umeda, K., Takami, T. and Aoki T., 1994. Antimicrobial Susceptibilities and Detection of Transferable R-Plasmids from *Aeromonas hydrophila* in Thailand, Asian Fisheries Sciences, 7, 41-46.
- Sanders, J.E., Pilcher, K.S. and Fryer, J.L., 1978. Relation of Water Temperature to Bacterial Kidney Disease in Coho Salmon (*Oncorhynchus ktiutch*), Sockeye Salmon (*O. n&a*), and Steelhead (*S&w gairdnen*), J. Fish. Res. Board Can., 35, 8-11.
- Sanders, J.E. and Fryer, J.L., 1980. *Renibacterium salmoninarum* Gen. Nov., Sp. Nov., The Causative Agent of Bacterial Kidney Disease in Salmonid Fishes, International Journal of Systematic Bacteriology, 30, 496-502.
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandin, I., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J.L. and Toranzo, A.E., 1993. Usefulness of The API-20E System for The Identification of Bacterial Fish Pathogens. Aquaculture, 116, 111-120.
- Savas, H., Altinok, I., Cakmak, E. and Firidin, S., 2006. Isolation of *Renibacterium salmoninarium* from Cultured Black Sea Salmon (*Salmo trutta labrax*) First Report in Turkey, Bull.Eur. Ass.Fish Pathol., 26, 238-246.
- Savaş, H., Yıldırım, Y., Kurtoğlu, İ.Z., Başçınar, N., Alkan, A., Gürel, M., Ergün, H., Firidin, Ş. ve Zengin, B., 2006. Ordu İli Perşembe İlçesinde Faaliyet Gösteren Yüzer Kafes İşletmelerinin Çevresel Etki ve Su Ürünleri Sağlığı Yönünden İzlenmesi Projesi, Sonuç Raporu, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon.
- Schaperclaus, W., 1992. Fish Diseases, A.A. Balkema, Rotterdam, 1398.
- Seven, İ., 2004. Rize İli Sınırları İçerisinde Alabalık Yetiştiriciliği Yapan İşletmelerin Yapısal ve Ekonomik Analizi, Lisans Tezi, KTÜ Rize Su Ürünleri Fakültesi, Rize
- Shotts, E.B. and Rimler, R., 1973. Medium for The Isolation of *Aeromonas hydrophila*, Journal of Applied Microbiology, 26, 550-553.
- Sidhu, K.S., 2003. Health Benefits and Potential Risk Related to Consumption of Fish or Fish Oil, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 38, 336-344.

- Smith, I.W., 1964. The Occurrence and Pathology of The Disease, Freshwater Salmon Fisheries Research, 34, 1-13.
- Smith, O.S., Smith, J.S.C., Bowen, S.L., Tenborg, R.A. and Wall S.J., 1990. Similarities Among A Group of Elite Maize İnbreds as Measured by Pedigree, F1 Heterosis, and Rflps, Theor Applied Genet, 80, 833-840.
- Smith, P., Hiney, M.P. and Samuelson, O.B., 1994. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents Used in Fish Farming: A Critical Evaluation of Method and Meaning, Annual Review of Fish Diseases, 4, 273-313.
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Chang, M.C. and Helinski, D.R., 1997. Plasmids Isolated from Marine Sediment Microbial Communities Contain Replication and Incompatibility Regions Unrelated to Those of Known Plasmid Groups, Applied and Environmental Microbiology, 63, 888-895.
- Sorum, H., Holstad, G., Lunder, T. and Hoestein, T., 2000. Grouping by Plasmid Profiles of Atypical *Aeromonas salmonicida* Isolated from Fish, With Special Reference to Salmonid Fish, Dis. Aquat. Org., 41, 159-171.
- Starliper, C.E., Smith, D.R. and Shatzer, T., 1997. Virulence of *Renibacterium salmoninarum* to Salmonids, Journal Of Aquatic Animal Health, 9, 1-7.
- TÜİK., 2009. T.C. Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri.
- Tanrıkul, T.T., Çağırğan, H. ve Tokşen E., 2004. Levrek'lerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) İzole Edilen *Vibrio* Türlerinin API 20E Yöntemiyle İdentifikasyonu, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21, 243-247.
- Tavolga, W.N. and Nigrelli, R.F., 1947. Studies on *Costia necatrix* Hennaguy, Transaction of American Microscopical Society, 66, 366-387.
- Tirola, M., Valtonen, E.T., Rintamaki-Kinnunen, P. and Kulomaa, M.S., 2002. Diagnosis of Flavobacteriosis by Direct Amplification of rRNA Genes, Dis. Aquat. Org., 51, 93-100.
- Timur, G. ve Timur, M., 1985. Eğirdir Gölü Sudak (*Stizostedion lucioperca* L. 1758) Balıklarında Yüksek Mortaliteye Neden Olan Bakteriyel Hemorajik Septisemi Hastalığı Üzerinde Bir Araştırma, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32, 33-41.
- Timur, G. and Timur, M.M., 1991. An Outbreak of Enteric Redmouth Disease in Farmed Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 11, 181-182.
- Timur, G., Karataş, S., Çolak, S. ve Akaylı, T., 1996. Gökkuşığı Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*, W, 1792) Yavrularında Görülen Furunkulosis Hastalığı Üzerine Bir Çalışma, II. International Symposium on Aquatic Products, İstanbul, Türkiye.
- Timur, M. ve Timur, G., 2003. Balık Hastalıkları Kitabı, TC. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Rektörlük Yayın No: 4426, Su Ürünleri Yayın No: 5, 238, İstanbul.
- Timur, G., Timur, M. and Korun, J., 2004. An Outbreak of *Flavobacterium psychrophilum* Infection in Rainbow Trout (*O. mykiss*) Hatchery in Turkey, İstanbul Üniv. Su Ürünleri Derg., 18, 21-27.

- Tokşen, E., 1999. Ege Bölgesinde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura ve Levrek Balıklarının Solungaçlarında Görülen Metazoan Parazitler ve Tedavisi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Tokşen, E., 2000. İzmir’de Bir Çipura (*Sparus autara*) İşletmesinde İlk Kez Görülen *Ichthyobodo* spp. Enfeksiyonu ve Tedavisi, 4. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 675, Erzurum.
- Toranzo, A.E., Santos, Y., Noeñez, S. and Barja, J.L., 1991. Biochemical and Serological Characteristics, Drug Resistance and Plasmid Profiles of Spanish Isolates of *Aeromonas salmonicida*, Gyobyo Kenkyu, 26, 55-60.
- Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, P., Riaza, A., Nunez, S. and Barja, J.L., 1994. Streptococcosis in Cultured Turbot Caused by an *Enterococcus*-Like Bacterium, Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol., 14, 19-23.
- Toranzo, A.E., Magariños, B. and Romalde, J.L., 2005. A Review of The Main Bacterial Fish Diseases in Mariculture Systems, Aquaculture, 246, 37-61.
- Tsoumas, A., Alderman, D.J. and Rodgers, C.J., 1989. *Aeromonas salmonicida* Development of Resistance to 4-Quinolone Antimicrobials, J. Fish Dis., 12, 493-507.
- Türkmen, G. ve Albaz, A., 2001. Türkiye’ye İthal Edilen Akvaryum Balıkları ve Sonuçları Üzerine Araştırmalar, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 18, 483-493.
- Umelo, E. ve Trust, T.J., 1998. Physical Map of The Chromosome of *Aeromonas salmonicida* and Genomic Comparisons between *Aeromonas* Strains, Microbiology, 144, 2141-2149.
- Üstündağ, E., Aksungur, M., Dal, A. ve Yılmaz, Ç., 2000. Karadeniz Bölgesi’nde Su Ürünleri Yetiştiriciliği Yapan İşletmelerin Yapısal Analizi ve Verimliliğinin Belirlenmesi, Sonuç Raporu, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon.
- Valtonen, E.T., Rintamaki, P. and Koskivaara, M., 1992. Occurrence and Pathogenicity of *Yersinia ruckeri* at Fish Farms in Northern and Central Finland, Journal of Fish Diseases, 15, 163-171.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I., Gironés, O. and Múzquiz, J.L., 2006. *Lactococcus garvieae* in Fish: A Review, Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 29, 98-177.
- Wakabayashi, H., 1993. Columnaris Disease, In: Inglis, V., Roberts, R.J. and Bromage, N.R. (Eds.), *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific, Osney Mead, Oxford, UK, 23-39.
- Wakabayashi, H., Sawada, K., Ninomiya, K. and Nishimori, E., 1996. Bacterial Hemorrhagic Ascites of Ayu Caused by *Pseudomonas* sp., Fish Pathol., 31, 239-240.
- Waltman, W.D. and Shotts, E.B., 1984. A Medium for The Isolation and Differentiation of *Yersinia ruckeri*, Can. J. Fish Aquat. Sci., 41, 804-806.
- Williams, J.G.K., Kuberlik, A.R. and Kenneth, J.L., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers, Nucleic Acids Res., 18, 6231-6235.

- Yeh, H.Y., Shoemaker, C.A. and Klesius, P.H., 2006. Sensitive and Rapid Detection of *Flavobacterium columnare* in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* by a Loop Mediated Isothermal Amplification Method, J. App. Microbiol., 100, 919–925.
- Yildiz, Y.H., Bekcan, S., Karasu, B.A.C. and Akan, M., 2005 Some Blood Parameters in The Eel (*Anguilla Anguilla*) Spontaneously Infected with *Aeromonas hydrophyla*. Israel Journal of Veterinary Medicine, 60, 91-92.
- Zabeau, M. and Vos, P., 1993. Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method for DNA Fingerprinting. European Patent Application Number 92402629.7. Publication Number 0534858A1.
- Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H., 1998. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR, J. Clin. Microbiol., 36, 983–985.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Trabzon'un Vakfıkebir İlçesinde doğdu. İlköğrenim ve Liseyi Beşikdüzü'nde tamamladı. 1995 yılında KTÜ Rize Su ürünleri Fakültesini kazandı ve 1999 yılında bu fakülteden mezun oldu.

2001 yılı içerisinde askerlik görevini tamamlayarak aynı yıl Rize Su ürünleri Fakültesi'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2006 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Halen aynı fakültede araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babası olup, iyi derecede İngilizce bilmektedir.