

**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARADENİZ BÖLGESİ'NDE KÜLTÜRÜ YAPILAN LEVREK**  
**(*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) BALIKLARINDA GÖRÜLEN**  
**VİBRİO ENFEKSİYONLARI VE TEDAVİSİ**

**HASRET YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**DOÇ. DR. FİKRİ BALTA**  
**TEZ JÜRİLERİ**  
**PROF. DR. İLHAN ALTINOK**  
**DOÇ. DR. ŞEVKİ KAYIŞ**




**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**  
**RİZE-2016**

**Her hakkı saklıdır**

T.C.  
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARADENİZ BÖLGESİ'NDE KÜLTÜRÜ YAPILAN LEVREK (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) BALIKLARINDA GÖRÜLEN VİBRİO ENFEKSİYONLARI VE TEDAVİSİ**

Doç. Dr. Fikri BALTA danışmanlığında, Hasret YILMAZ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14/12/2016 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. İlhan ALTINOK	
Üye :	Doç. Dr. Fikri BALTA	
Üye :	Doç. Dr. Şevki KAYIŞ	

  
Doç. Dr. FERHAT KALAYCI  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada, Karadeniz Bölgesi'nde kültürü yapılan levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) balıklarında görülen vibrio enfeksiyon etkenlerinin farklı yöntemler kullanılarak tanımlanması yapılarak, hastalığın tedavisinde kullanılabilecek antimikrobiyellerin tespiti için disk diffüzyon yöntemi kullanılarak hassas ve dirençli antibiyotikler tespit edilmeye çalışılmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Fikri BALTA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim. Bu çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Yusuf BEKTAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU'na laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen İsmail AKSU'ya ve Zeynep DENGİZ BALTA'ya, tez çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu güne kadar hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme en derin şükranlarımı sunarım.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 2015.53002.103.02.1 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Hasret YILMAZ

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Karadeniz Bölgesi’nde Kültürü Yapılan Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) Balıklarında Görülen *Vibrio* Enfeksiyonları ve Tedavisi” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksi ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 14/12/2016

Hasret YILMAZ

*Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.*

## ÖZET

### KARADENİZ BÖLGESİ'NDE KÜLTÜRÜ YAPILAN LEVREK (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) BALIKLARINDA GÖRÜLEN VİBRİO ENFEKSİYONLARI VE TEDAVİSİ

Hasret YILMAZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Fikri BALTA

Bu çalışmada, Karadenizde kültürü yapılan levrek balıklarındaki (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) bakteriyel enfeksiyonlardan izole edilen vibrio türlerinin tanımlanması için konvensiyonel metotlar ve API 20E test kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Bütün izolatlar bakterilerin spesifik 16S rRNA genleri kullanılarak PZR yöntemiyle doğrulandı. İzole edilen bakteriler biyokimyasal ve PZR test sonuçlarına göre *Vibrio anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ve *V. harveyi* olarak tespit edildi. *Vibrio anguillarum* için API 20E profili genellikle 3207526 olarak belirlendi. Sekensa gönderilen iki izolat hariç tüm izolatlar GenBank'da farklı kabul numarası kayıtlı *Vibrio* türlerine % 98-100 oranında benzer olduğu bulundu. Buna ilaveten vibriozis tedavisinde en etkin ajanların saptanması amaçlanmıştır. Antibiyotiklere hassasiyet test sonuçlarına göre % 94,23 ampisilin, % 42,31 streptomisin, % 13,46 oksitetrasiklin ve % 3,85 eritromisin dirençli olduğu fakat sulfametoksazol, trimetoprim+sulfametoksazol, oksolinik asit, enrofloksasin ve florfenikol hassas olduğu tespit edildi. Duyarlılık testi sonuçlarına göre, trimetoprim-sulfametoksazol, florfenikol ve enrofloksasin, vibriozis tedavisi için en etkili kemoterapötikler olarak önerildi.

2016, 90 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Vibriozis, Levrek, Biyokimyasal testler, PZR, Tedavi.

**ABSTRACT**  
**VIBRIO INFECTIONS AND TREATMENT SHOWING IN CULTURED SEA**  
**BASS (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) IN THE BLACK SEA REGION**

**Hasret YILMAZ**

**Recep Tayyip Erdoğan University**  
**Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**Master Thesis**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fikri BALTA**

In this study, identification of *Vibrio* species isolated from bacterial infections in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the Black Sea was performed by using conventional methods, and API 20E test kits. All isolates were confirmed by PCR assays specific to the 16S rRNA gene of bacterium. According to the result of biochemical and PCR tests isolated bacteria determined as *V. anguillarum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*. API 20E profile for *V. anguillarum* isolates was usually determined as 3207526. The sequenced all isolates except for two were found to be similar to *Vibrio* species at the rate of 98-100% in GenBank under different accession numbers. In addition, in the treatment for vibriosis, it was intended to detect the most effective agents. Results of the testing susceptibility to antibiotics showed that *Vibrio* isolates were resistant to 94,23 % ampicillin, 42,31 % streptomycin, 13,46 % oxytetracycline and 3,85 % erythromycin, but all strains except two were found susceptible to sulphamethoxazole, trimethoprim-sulfamethoxazole, oxolinic acid, enrofloxacin and florfenicol. According to the results of the susceptibility test, trimethoprim-sulfamethoxazole, florfenicol and enrofloxacin were suggested as the most effective chemotherapeutics for vibriosis treatment.

**2016, 90 pages**

**Keywords:** Vibriosis, Sea bass, Biochemical tests, PCR, Treatment.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Literatür Özeti.....	5
1.2.1. Vibriozis.....	5
1.2.1.1. Vibrozisin Epizootiyolojisi ve Patojenitesi.....	9
1.2.1.2. Vibrozisin Klinik Belirtileri ve Otopsi Bulguları.....	11
1.2.1.3. Vibrio 'ların İzolasyonu ve Etken Özellikleri.....	17
1.2.2. Moleküler Yöntem.....	21
1.2.2.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu.....	21
1.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	22
1.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	23
1.2.2.4. 16S rRNA ve DNA Dizi Analizi.....	24
1.2.3. Vibrozisin Kontrolü.....	26
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1. Materyal.....	29
2.1.1. Balık Numuneleri.....	29
2.1.2. Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu.....	30
2.2. Besiyerleri.....	32
2.2.1. İzolasyon Besiyerleri.....	32
2.2.1.1. Tryptic Soy Broth (TSB-Merck).....	33
2.2.1.2. Tryptic Soy Agar (TSA-Merck).....	33
2.2.1.3. Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS-Merck).....	33
2.2.1.4. Mueller-Hilton Agar (MHA-Meck).....	34

2.2.1.5.	Fizyolojik Tuzlu Su (FTS).....	34
2.2.2.	İdentifikasyon Besiyerleri.....	34
2.2.2.1.	Triple Sugar İron (TSI, Merck) Agar.....	35
2.2.2.2.	Eskülin Agar (Biolab).....	35
2.2.2.3.	Simon Sitrat Agar (HIMEDIA).....	35
2.2.2.4.	MR-VP Medium (HIMEDIA).....	36
2.2.2.5.	Üre Agar Base (HIMEDIA).....	36
2.2.2.6.	Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri.....	37
2.2.2.7.	İndol Besiyeri.....	37
2.2.2.8.	Nitrat Besiyeri.....	38
2.2.2.9.	O/F Basal Medium (HIMEDIA).....	38
2.2.2.10.	L-Arjinine (HIMEDIA).....	39
2.2.2.11.	L-Lysine Hydrochloride (HIMEDIA).....	39
2.2.2.12.	L-Ornithine Monohydrochloride (HIMEDIA).....	39
2.2.2.13.	%0 NaCl Besiyeri.....	40
2.2.2.14.	%7 NaCl Besiyeri.....	40
2.2.3.	Ayraçlar.....	41
2.2.4.	API 20E Strip Testi.....	42
2.2.4.1.	%1.5 NaCl.....	42
2.2.5.	İdentifikasyon Testleri.....	42
2.2.5.1.	Hareket Testi.....	43
2.2.5.2.	Gram Boyama.....	44
2.2.5.3.	Oksidaz Testi.....	44
2.2.5.4.	Katalaz Testi.....	45
2.2.5.5.	Triple Sugar Iron Agar (TSI) Testi.....	45
2.2.5.6.	Sitrat Testi.....	46
2.2.5.7.	Eskülin Testi.....	46
2.2.5.8.	Jelatin Hidrolizasyon Testi.....	46
2.2.5.9.	Üreaz Testi.....	47
2.2.5.10.	Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) testi.....	47
2.2.5.11.	Voges-Proskauer (VP) ve Metil Kırmızısı (MR).....	48
2.2.5.12.	İndol Testi.....	49
2.2.5.13.	Nitrat Redüksiyon Testi.....	49



2.2.5.14.	Dekarboksilaz (Arjinin, Ornithin, Lizin) Testi.....	49
2.2.5.15.	Tuzda (NaCl) Üreme Testi.....	50
2.2.6.	Hızlı Tanı Kitleri (API 20E) kullanılarak identifikasyon.....	50
2.3.	Antibiyogram Testi.....	52
2.4.	Moleküler Yöntem.....	53
2.4.1.	DNA İzolasyonu.....	53
2.4.2.	Kullanılan Pirmerler ve PZR Uygulamaları.....	55
2.4.3.	DNA İzolasyonun ve PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Kalitesinin Tayini	56
2.4.4.	DNA Dizin Analizi.....	56
2.4.5.	Gen Bank Taraması.....	57
3.	BULGULAR.....	58
3.1.	Balıklarda Görülen Hastalık Semptomları.....	58
3.2.	İzole Edilen Bakterilere Ait Özellikler.....	60
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	75
5.	ÖNERİLER.....	81
	KAYNAKLAR.....	82
	ÖZGEÇMİŞ.....	90

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b>	Api web sisteminde API 20E kitine ait pozitif ve negatif referans sonuçları.....	52
<b>Şekil 2.</b>	Hastalıklı levrek balıklarında görülen vibriozis'e ait yaygın hemorajiler..	58
<b>Şekil 3.</b>	Deride pul dökülmesi ve ülseratif lezyonlar (A), operkulum, göz çevresinde çene altında ve ventral yüzgeç kaidesinde hemorajiler (B), gözde exophthalmos (C), yügeç kaidelerinde yaygın hemorajiler (D)....	59
<b>Şekil 4.</b>	Deri üzerinde hemoraji ve karında asites (A), deride kararma ve gözde exophthalmos (B), operkulum altında (C), üzerinde yaygın hemoraji (D).....	59
<b>Şekil 5.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının TSB'de (A) ve TSA'da (B) üremesi.....	61
<b>Şekil 6.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının TCBS'de yeşil (A), sarı koloni (B) oluşturması...	61
<b>Şekil 7.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının TSA'da O/129 vibriostatik ajana duyarlılık testi (A) ve TCBS'de sarı kolonilerin görünümü (B).....	62
<b>Şekil 8.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatların TSI agar'da (A) ve Simon Sitrat agarda üremesi (B).....	62
<b>Şekil 9.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının üre agarada (A) ve O/F agarda üremesi (B).....	62
<b>Şekil 10.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının eskülin agarda (A) ve jelatin agarda üremesi (B)..	62
<b>Şekil 11.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının dekarboksilaz testine ait üreme sonuçları.....	63
<b>Şekil 12.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının MR test (A) ve VP test (B) sonuçları.....	63
<b>Şekil 13.</b>	<i>Vibrio</i> sp. izolatlarının indol test (A) ve nitrat test (B) sonuçları.....	63
<b>Şekil 14.</b>	API 20E test kitiine ayıraçlar döküldükten sonraki sonuçları.....	63
<b>Şekil 15.</b>	Antibiyogram testinde inhibisyon zon çaplarının dijital kumpasla ölçümü.....	64
<b>Şekil 16.</b>	Levrek balıklarından izole edilen <i>Vibrio</i> sp. suşları için antibiyotik direnç profilleri.....	72

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	Dünya genelindeki balıklarda görülen <i>Vibrio</i> sp. enfeksiyonlarının coğrafik dağılışı.....	6
<b>Tablo 2.</b>	Türkiye’de kültür yapılan levrekler ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )’de ve diğer balıklardaki <i>Vibrio</i> sp. enfeksiyonları ve coğrafik dağılışı.....	8
<b>Tablo 3.</b>	Balıklardaki hastalık olgularından izole edilen patojen <i>Vibrio</i> türlerinin karakteristik özellikleri.....	20
<b>Tablo 4.</b>	Hastalıklı levreklerden izole edilen <i>Vibrio</i> sp. suşlarına ait genel bilgiler.....	30
<b>Tablo 5.</b>	Antibiyoqram testinde kullanılan antibiyotik disk konsantrasyonları ve ölçülen standart inhibisyon zon çapı duyarlılık aralıkları.....	53
<b>Tablo 6.</b>	PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	55
<b>Tablo 7.</b>	Kullanılan primerler için PZR döngü koşulları.....	56
<b>Tablo 8.</b>	<i>Vibrio</i> sp. suşlarına ait morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları....	65
<b>Tablo 9.</b>	Levreklerden izole edilen <i>Vibrio</i> sp. suşlarının API 20E test sonuçları.....	68
<b>Tablo 10.</b>	<i>Vibrio</i> sp. suşlarına ait antibiyoqram test sonuçlarının hassasiyet profili.....	70
<b>Tablo 11.</b>	Dizi analizine gönderilen PZR ürünlerine ait sekans sonuçlarının GenBank veri tabanında benzerlik oranların karşılaştırılması.....	73

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Bç</b>	: Baz çifti
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>°C</b>	: Derece Santigrad
<b>Rpm</b>	: Dakika başına dönme hızı (devir/dk)
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleozit trifosfat
<b>Gr</b>	: Gram
<b>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Hidrojen sülfür
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	: Bidistile su
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum Klorür
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>sn</b>	: Saniye
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>Pmol</b>	: Pikomol
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>KOH</b>	: Potasyum hidroksit
<b>Tm</b>	: Primerlerin erime sıcaklığı
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>16S rRNA</b>	: 16S ribozomal ribonükleik asit
<b>vd</b>	: Ve diğerleri
<b>V.</b>	: Vibrio

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Ülkemizde ve dünyada, bilimsel ve teknolojik çalışmalar; yeni şeyler icat edilerek ve eski buluşların geliştirilmesiye her geçen gün büyük bir hızla artmaktadır. Nüfusta doğal, salgın hastalıklar ve savaşlardaki kitlesel ölümlere rağmen sürekli artış göstermektedir. Günlük protein ve enerji ihtiyacını karşılamak için yeme eğiliminde olan insanoğlunun bu durumu gıdaya olan gereksinimlerini de arttırmaktadır.

Modernleşen hayat şartlarına uyum sağlamaya çalışan insanların büyük çoğunluğunun şehirlerde çalışmaya başlamalarıyla karada; köy yaşamının terk edilmesi, toprakların bilinçsizce işlenmesi (yalnış ürün ekimi, ilaçlama, vs.), verimli topraklara ev, sanayi tesislerinin ve alışveriş merkezlerinin inşa edilmesi yıl içerisindeki hatta geçmiş dönemlere göre toplam hayvansal ve tarım ürün miktarını azaltmaktadır. Su ürünlerinde ise evsel, endüstriyel ve tarımsal kaynaklı (pestisit, vs.) kimyasal maddelere bağlı su kirliliği, uluslararası sularda seyreden gemilerin balast sularıyla gelen kara sularımızda bulunmayan biyolojik canlıların (*Mnemiopsis leidyi*, vs.) kendilerine yeni habitatlar oluşturmaları, bu canlılar nedeniyle ve yalnış şehircilik planlamalarıyla sularda yaşayan canlıların habitatlarının bozulması, teknolojinin gelişmesiyle beraber modern av araçlı büyük gemilerin inşa edilmesi, av filolarındaki artışa bağlı aşırı avcılık, küçülen ve kirlenen av sahaları, canlıların tür çeşitliliğini ve miktarını her geçen günde sürdürülebilirliğini azaltmaktadır.

Bu nedenle; insanların hayvansal protein ihtiyacını karşılamak için alternatif yollar aranmış ve bilimsel çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda; bünyesinde barındırdığı esansiyel aminoasitler, doymamış yağ asitleri, yüksek mineral maddeler ve fazlaca vitamin içermesinin yanı sıra, özellikle kalp sağlığına ve çocuklarda zekâ gelişimine kısacası, insan sağlığı açısından su ürünlerinin oldukça önemli bir hayvansal besin kaynağıdır. Avcılık yoluyla elde edilen su ürünleri talebi karşılayamadığından dolayı kültür balıkçılığına geçiş kaçınılmaz olmuştur.

Yetiştiricilik; su kaynağına yakın karasal alanlarda, denizlerde ve barajlarda yani yer kürenin % 75'ini oluşturan su kaynaklarında yapılabilmektedir. FAO'ya göre su fakiri olan fakat bulunduğu coğrafya da üç tarafı farklı sıcaklık ve tuzluluğa sahip denizlerle çevrili, gölleri, akarsuları, kaynak suları ve barajlarıyla su zengini sayılan ülkemizin su kaynaklarının doğru değerlendirilmesiyle sürdürülebilir kültür balıkçılığındaki üretimin artırılması kaçınılmaz olmuştur. Böylece, hayvansal protein ihtiyaçlarının karşılanmasında hızla büyüyen su ürünleri yetiştiriciliği en hızlı büyüyen endüstriyel sektör haline gelmiştir (Doğaka, 2014).

Dünyada da ülkemizdeki gibi toplam su ürünleri kültür balıkçılığı uygulamalarından önceki dönemlerde avcılık yoluyla elde edilmekteydi. Kültür balıkçılığı 1970'ler de tatlısulardan yararlanılarak karada kurulan tesislerde sazan ve alabalık üretimiyle, Ege ve Akdeniz bölgesinde 1980'lerin ortalarında çipura ve levrek balıklarının deniz ağkafeslerinde üretilmesiyle başlamıştır. Ülkemizde; Ege Denizi'nin dağlarının kırıklı yapıda ve kıyıya dik uzanışından kaynaklı girintili çıkıntılı olması doğal liman, koy, körfez gibi korunaklı alanlarının bulunması, işletme sayılarında ve işletmelerin üretim kapasitelerinde artış görülebilmektedir, Karadeniz'in dağlarının kıvrımlı yapıda ve kıyıya paralel uzandığından dolayı korunaklı alanlarının olmayışı işletme sayısını ve üretim kapasitesini belli bir miktarın üzerine çıkaramamaktadır (Doğaka, 2014).

Ege bölgesinde çipura ve levrek balığı yetiştiriciliği; doğal ortamlarında yaşayan yavru balıkların yakalanıp kuluçkahanelerde beslenip büyütüldükten sonra pazar boyuna ulaşana kadar denizdeki ağ kafeslerde besiyeye alınmasıyla başlamıştır. Doğal yaşama ortamlarındaki stok yoğunluğunda azalma meydana geldiğinden dolayı doğadan yavru toplanmasının yasaklanmasının sonra işletmeler, yumurta ve yavru üretimine başlamışlardır (Timur ve Timur, 2003).

Levrek balıkları, tüm Akdeniz'den, İngiltere'nin kuzey sahillerine ve Kanarya Adaları'na kadar yayılım gösterir. Deniz fanerogramlarının bulunduğu kumlu, çamurlu-sığ biyotoplarda, sıcaklığa ve tuzluluğa karşı gösterdiği toleransı ile nehir ağızlarında ve lagüner bölgelerde yaşayan bir littoral bölge balığıdır. Havalarda soğuması ile birlikte kıışlamak için derin sulara göç ederler (URL-1).

Levrek balığı, ülkemizi çevreleyen tüm denizlerde bulunmakla birlikte Ege ve Akdeniz balığı olarak bilinir. Ekonomik değeri çok yüksek, eti lezzetli, sevilen bir balıktır. Sıcaklığa ve tuzluluğa toleransı yüksektir. Levrek balığı, ‰ 0,5-5 tuzluluğa ve 1-34°C'deki sulara yaşamaktadır. En uygun büyüme sıcaklığı ise 22-24°C değerlerinde olduğu bildirilmiştir (URL-2).

Phlum: *Vertebrata*

Subphylum: *Pisces*

Clasis: *Osteichtyes*

Ordo: *Perciformes*

Subordo: *Percoidei*

Familya: *Serranidae*

Genus: *Dicentrarchus*

Species: *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)

Türkiye İstatistik Kurumu 2015 yılı verilerine göre toplam su ürünleri üretimi 672 241 ton olarak belirlenmiştir. Bu miktarın 397 731 ton deniz ve 34 176 ton iç sulara avcılık yoluyla elde edilirken geri kalan 240 334 tonu yetiştiricilik yoluyla elde edilmektedir. Kültür balıklarının türlere göre dağılımında en yüksek yetiştiriciliği yapılan balık iç sulara alabalık olup toplam su ürünleri yetiştiriciliğinin %44,95'ini oluşturmaktadır. Bunu %31,27 ile levrek ve %21.57 ile çipura takip etmektedir (TÜİK, 2016).

Kültür balıkçılığında işletme sayısındaki ve ürün miktarındaki artış devam etmektedir. Ülkemizde bölgesel olarak farklı iklim ve su kaynakları yönünden büyük bir potansiyele sahip olması kültür balıkçılığına uygun olan alanların geliştirmesi ve teşvikle üretime büyük önem verilmeye başlanmıştır İşletmelerin bu artışın yanında birçok sorunla karşılaşmaktadır. Yumurta, yavru ve besin üretiminde önlerine çıkanlardan biri; erken fark edilmeyen ve aniden (sulara moloz yığınlarının boşaltılması, su kaynağında sel ve taşkınları engellemek için yapılan duvar çalışmaları, enerji, sulama ve içmesuyu ihtiyacını karşılamak için baraj yapımı, su sıcaklığı ve oksijen miktarındaki ani değişimler, hijyen kurallarına dikkat edilmemesi, boylama, taşıma,

yemleme ve ortamda bulunan hastalık etmenleri, stres, vs.) meydana gelen doğru yönlendirilmediğinde büyük ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların ortaya çıkmasıdır.

Doğal ortamlarında yaşayan balıklardan farklı olarak kültür balıkçılığında ölüm oranı daha fazla yaşanmaktadır. Bunun nedeni daha fazla stres yaşamaları ve herhangi bir olumsuz durumla karşılaştıklarında kaçamamalarıdır. İşletmeler için önemli olan stres faktörlerinin, kitlesel ölümlerin olmasını, hastalıkların bir havuzdan diğerine yayılmasını engelleyerek doğru tedavinin uygulanmasıyla ekonomik kayıplar en aza indirilebilmektedir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastalıkları tedavi etmek için çeşitli antibakteriyel maddeler kullanılmaktadır. Farklı hastalık etkenleri için farklı antibiyotikler kullanılmaktadır. İşletmelerin veya işletmelerde çalışanların hastalık etkenini teşhis edilmeden, antibiyogram testi yapılmadan elinin altında bulunan ilaçları kullanması, yasal ve bilinen antibiyotiklerin kullanılmaması, yanlış kombinasyonların yapılması, eğer etken teşhis edilmişse ilaçların gereken sürede ve miktarda kullanılmaması, ilaçlı yem verilmeden önce 12-24 saat balığın aç bırakılmaması, birkaç etkenin birleşerek (sekonder enfeksiyon) oluşturduğu enfeksiyonlarda ilk etkenin (primer enfeksiyon) göz ardı edilmesi; dirençli bakterilerin sayısını arttırmakta paralel olarak hastalıkların tedavisi için kullanılan antibiyotik sayısının da azalmasına neden olmaktadır. Bu durum hastalıkların tedavisini engellemekte ve fazla sayıda balığın ölümüne neden olmakla birlikte işletme için ekonomik maliyetide arttırmaktadır. Önemli olan yetiştiricinin; balığın davranışlarını tanıması, davranışlarında meydana gelecek değişimlerde yani hastalık çıktığında; etkenin doğru teşhis edilmesi ve tedavinin doğru bir şekilde yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyada su ürünleri yetiştiriciliği yapılan özellikle deniz suyu (%30<) ve acı suda (%0,5-30) bulunan balıklarda hatta denizdeki kafeslerden tatlı suya alınan balıklarda bile görülen bir hastalık olan vibriosis enfeksiyonu'nun levrek balıklarındaki identifikasyonu, antibiyogram duyarlılığı, API 20 E testi ve moleküler yöntemler hakkında bilgi verilmektedir.



## 1.2. Literatür Özeti

### 1.2.1. Vibriozis

Vibriozis doğada ve kültürü yapılan deniz balıklarında en çok görülen hastalık olmakla beraber, nadiren pastörize edilmemiş deniz balığı atıklarıyla beslenen tatlı su balıklarında da görülen bir hastalıktır. Bu hastalık ilk olarak yılan balıklarında görülmüş ve kızıl veba olarak isimlendirilmiştir. Ancak günümüzde birçok deniz balığında görüldüğü bildirilmektedir. Normal olarak tatlı su ve acı suda bulunan balıklarda özellikle sıg ve su sıcaklığının yükseldiği yaz mevsiminin sonunda görülür (Timur ve Timur, 2003). Tuzlu sularda yetiştiriciliği yapılan balıkların en önemli ve en iyi bilinen hastalıklarından biridir. Hastalık bugüne kadar birçok literatürde red pest, red disease, pestis rubra anguillarum, cold pest, ulcer disease, eye disease, bakteriyel dermatitis ve tuzlu su furunkulosis gibi isimler verilmektedir. Hastalığın ismi listonellosis olarak değiştirilmesine rağmen birçok araştırmacı tarafından günümüzde vibriozis ismi kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 1987).

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Gammaproteobacteria*

Order: *Vibrionales*

Family: *Vibrionaceae*

Genus: *Vibrio*

Vibriozis etmeni olan vibrio ilk defa 1718 yılında yılan balıklarında görülen bir epizootiden izole edilmiştir. Etkenin identifikasyonu 1893 yılında Canestrini tarafından yapılarak *Bacterium anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra Bergam tarafından 1907'de İsveç'te kafeslerde yetiştiriciliği yapılan yılan balıklarından aynı etken izole edilmiştir ve 1909 yılında da identifikasyonu tamamlanarak bakteriye *Vibrio anguillarum* adı verilmiştir. Daha sonra yapılan ribozomal RNA analizi sonucunda *V. anguillarum*, *V. damsela*, *V. ordalii*'nin filogenetik açıdan diğer türlerden farklı olduğu ve bunların *Listonella* genusunda yer alması gerektiği bildirilmiştir (MacDonell vd., 1985). Ancak dünya literatüründe *Vibrio* adı daha fazla kullanılmakta olduğu

bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987). Amerika’da 1953 yılında Rucker ve arkadaşları tarafından chum salmon (*O. keta*) balıklarındaki hastalık olgularından *V. anguillarum* izole edilmesiyle vibriosis bildirilmiştir. Daha sonra deniz ve tatlı su balığı olan (salmonid, kalkan, levrek, çipura, ayu, morina ve kırmızı mercan gibi) 50’ye yakın türde birçok ülkede büyük kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Toranzo ve Barja, 1990; Actis vd., 2011, Güralp, 2012). Tüm dünyada gelişen su ürünleri yetiştiriciliğine paralel olarak farklı *Vibrio* türlerinin hastalık oluşturduğu görülmüştür. Dünyada genelinde hastalıklı balıklardan izole edilen vibrio türleri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Dünya genelindeki balıklarda görülen *Vibrio* sp. enfeksiyonlarının coğrafik dağılışı (Austin ve Austin, 1999; Güralp, 2012).

Etken	Balık Türü	Coğrafik Dağılımı
<i>Vibrio anguillarum</i> (= <i>Listonella anguillarum</i> )	Atlantik salmonu ( <i>Salmo salar</i> ) Kalkan balığı ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) Deniz levreği ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) Çipura ( <i>Sparus aurata</i> ) Çizgili levrek ( <i>Morone saxatilis</i> ) Yılan balığı ( <i>Anguilla anguilla</i> , <i>A. japonica</i> ) Ayu balığı ( <i>Platygllellus altivelis</i> ) Morina balığı ( <i>Gadus morhua</i> ) Kırmızı mercan ( <i>Pagrus major</i> ) Çipura ( <i>Acanthopagrus cuuieri</i> )	Amerika, Avrupa, Türkiye, Japonya, İsrail, Kuveyt
<i>V. ordalii</i>	Salmonidler ( <i>Onchorhynchus</i> sp., <i>Salmo</i> sp.) Çipura ( <i>Sparus aurata</i> )	Avrupa, Türkiye
<i>V. alginolyticus</i>	Atlantik salmonu ( <i>S. salar</i> ) Çipura ( <i>S. aurata</i> ) Kalkan balığı ( <i>Scophthalmus maximus</i> ) Yılan balığı ( <i>A. anguilla</i> )	İsrail, İskoçya, Kızıl deniz
<i>V. cholerae</i>	Ayu balığı ( <i>P. altivelis</i> )	Japonya
<i>V. fischeri</i>	Çipura ( <i>S. aurata</i> ) Kalkan balığı ( <i>S. maximus</i> )	İspanya
<i>V. splendidus</i>	Atlantik salmonu ( <i>S. salar</i> ) Çipura ( <i>S. aurata</i> ) Kalkan ( <i>Colistium nudipinnis</i> , <i>C. guntheri</i> )	İskoçya, İspanya, Yeni Zelanda, Norveç
<i>V. harveyi</i> (= <i>V. carchariae</i> = <i>V. trachuri</i> )	Çipura ( <i>S. aurata</i> ) Levrek ( <i>Lates calcarifer</i> ) Dil balığı ( <i>Dicologlossa cuneata</i> ) Common snook ( <i>Centropomus undecimalis</i> ) Cobia ( <i>Rachycentron canadum</i> )	ABD, Tayvan, İspanya
<i>V. carchariae</i>	Köpek balıkları ( <i>Carcharinus plumbeus</i> )	ABD
<i>V. parahaemolyticus</i>	Çipura ( <i>S. aurata</i> ), <i>Larimichthys polyactis</i>	Kızıl deniz, Çin

**Tablo 1. Devamı**

<b>Etken</b>	<b>Balık Türü</b>	<b>Coğrafik Dağılımı</b>
<i>V. salmonicida</i>	Atlantik salmonu ( <i>Salmo salar</i> ) Morina balığı ( <i>Gadus morhua</i> )	Norveç, Kanada, İskoçya, ABD
<i>V. pelagius</i>	Kalkan balığı ( <i>Scophthalmus maximus</i> )	İspanya, Norveç
<i>V. logei</i>	Atlantik salmonu ( <i>S. salar</i> )	Norveç, İzlanda, İskoçya
<i>V. ichthyenteri</i>	Kuluçkahanelerde	Japonya
<i>V. campbelli</i>	Levrek ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	İspanya
<i>V. marinus</i>	Kalkan balığı ( <i>S. maximus</i> )	İspanya
<i>V. vulnificus</i>	Yılan balığı ( <i>A. anguilla, A. japonica</i> )	Japonya, İspanya, ABD,
<i>V. viscosus</i> ( <i>Moritella viscosa</i> )	Atlantik salmonu ( <i>S. salar</i> ) Kalkan balığı ( <i>S. maximus</i> ) Deniz levreği ( <i>D. labrax</i> )	Norveç, İzlanda, İspanya
<i>V. vulnificus</i>	Yılan balığı ( <i>A. anguilla, A. japonica</i> )	İngiltere, Danimarka
<i>Photobacterium</i> <i>damsela</i> subsp. <i>pisicida</i> = <i>V. damsela</i> ( <i>Pasteurella</i> <i>pisicida</i> )	Çipura ( <i>S. aurata</i> ) Deniz levreği ( <i>D. labrax</i> ) Dil balığı ( <i>Solea senegalensis, S. solea</i> ) Çizgili levrek ( <i>Morone saxatilis</i> ) Sarıkuşruk ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) Ayu balığı ( <i>Platygllellus altivelis</i> ) Kefal ( <i>Mugil cephalus</i> ) Mavi kefal ( <i>Chelon labrosus</i> ) Köpek balıkları Kalkan balığı ( <i>S. maximus</i> )	ABD, Japonya, İspanya, Türkiye, Danimarka

Vibriosis etkeni olan diğer bakteriler; *V. trachuri* istavrit'te (Japonya), *V. tubiashii* ve *V. nereis* (*Moritella viscosa*) levreklerde (İspanya) (Austin ve Austin, 1999), *V. chagasii* türü *Artemia* sp.'de (İspanya), kalkan larvalarında (Norveç), rotifer ve levreklerde (Yunanistan) *V. kanaloae* hastalıklı istiridye larvasında (Fransa), karides (Çin) ve deniz suyunda (USA) ve *V. pomeroyi* çift kabuklu yumşakçalarda (Brezilya) ve kalkan balıklarında (İspanya) (Thompson vd., 2003a) ve sınıflandırmaya sonradan katılan *V. xuii* karideslerde ve çift kabuklu yumşakçalarda, *V. brazilliensis* çift kabuklu yumşakça larvalarında, *V. neptunis* hastalıklı çift kabuklu yumşakça larvalarında, rotifer ve kalkan balığı larvalarında (Thompson vd., 2003b), *V. tasmaniensis* Atlantik salmonlarından (*Salmo salar*) (Thompson vd., 2003c), *V. fortis* sp. nov. Karides larvaları, hastalıklı çift kabuklu larvaları, Atlantik salmon (*Salmo salar*) balıkları, hastalıklı istiridye larvalarından ve *V. hepatrius* erişkin doğal karideslerden (Thompson vd., 2003d) gibi türler farklı çalışmalarda rapor edilmiştir.

Ülkemizdeki ilk vibriozis olgusuna çipura balıklarındaki hastalık salgınlarından izole edilen etkenin *V. anguillarum* olduğu bildirilmiştir (Candan, 1993). Daha sonra çalışmalarda, çipura balıklarındaki hastalık vakalarından *V. ordalii*'nin izole edildiği farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Candan, 1993; Çağırğan ve Yurekliturk, 1996; Akaylı, 2001; Türk, 2002). Ülkemizde kültürü yapılan levreklerde ve diğer balıklarda görülen vibriozise neden olan etkenler Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2.** Türkiye’de kültür yapılan levrekler (*Dicentrarchus labrax*)’de ve diğer balıklarda görülen *Vibrio* sp. enfeksiyonları ve coğrafik dağılışı (Öztürk ve Altınok, 2014).

Etken	Balık Türü	Coğrafik Dağılımı	Literatür	
<i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i>	<i>Sparus aurata</i>	Muğla	Candan, (1991)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ege Denizi	Çağırğan, (1993)	
	<i>Salmo salar</i>	Kara Deniz	Candan, (2000)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İzmir, Muğla, Aydın	Tanrıkul vd., (2004)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Antalya	Korun, (2004)	
	<i>Sparus aurata</i>	Ege Denizi	Korun, (2006)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ordu	Savaş vd., (2006)	
	<i>Pagrus pagrus</i>	Muğla	Korun ve Gökoğlu, (2007)	
	<i>Aulonocara maylandi</i>	İstanbul (Aquarium)	Akaylı, (2007)	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Muğla, Aydın, Denizli	Akşit ve Kum, (2008)	
	<i>Sparus aurata</i>	İzmir, Muğla	Çanak, (2011)	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Kara Deniz	Timur vd., (2011)	
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ege Denizi	Çağırğan, (1993)
		<i>Sparus aurata</i>	Ege Denizi	Çağırğan, (1993)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		Ordu	Savaş vd., (2006)	
<i>Dicentrarchus labrax</i>		Ordu	Savaş vd., (2006)	
<i>Trachurus trachurus</i>		Mersin	Ozer vd., (2008)	
<i>T. mediterraneus</i>		Trabzon	Boran vd., (2013)	
<i>V. ordalii</i>		<i>Sparus aurata</i>	Muğla	Akaylı, (2001)
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ege Bölgesi	Türk, (2002)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	İzmir	Korun, (2004)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Çanakkale	Tanrıkul vd., (2004)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Antalya	Korun, (2004)	
<i>V. vulnificus</i>	<i>Sparus aurata</i>	Ege Bölgesi	Türk, (2002)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ege Bölgesi	Türk, (2002)	
	<i>T. mediterraneus</i>	Trabzon	Boran vd., (2013)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ordu, Trabzon	Uzun ve Oğut, (2014)	
<i>V. harveyi</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Muğla	Korun ve Akaylı, (2004)	
	<i>Sparus aurata</i>	Muğla, İzmir	Çanak, (2011)	
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ordu, Trabzon	Uzun ve Oğut, (2014)	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aydın	Aydın, (2000)	
<i>V. rotiferianus</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Ordu, Trabzon	Uzun ve Oğut, (2014)	

Deniz balıklarında büyük ekonomik kayıplara neden olan vibrio türü sırasıyla *V. alginolyticus*, *Listonella (Vibrio) anguillarum*, *V. carchariae*, *V. cholera*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* ve *V. salmonicida* sekiz tür olarak rapor edilmiştir. Ayrıca, *V. salmonicida*'nın soğuk su vibriozisinin (hitra hastalığı) etkeni olduğu bildirilmiştir. *V. anguillarum* uzun yıllardan beri deniz balıklarının yaklaşık 48 türünde başlıca dominant tür olmasına rağmen diğer vibrio türleride bu hastalıkta rol oynadığı bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Timur ve Timur, 2003). Tatlı ve acısuda kültürü yapılan yılan balığı çiftliklerinde hastalık olgularından *V. vulnificus* izole edildiği rapor edilmiştir (Dalsgaard vd., 1999, Fouz ve Amaro, 2003).

### 1.2.1.1. Vibriozisin Epizootiyolojisi ve Patojenitesi

Vibriozis balıklarda nasıl başladığı tam olarak bilinmesede, etken konakçının gastro-intestinal sisteminin posterior kısmında ve rektumda üredikten sonra iç organlara penetre olduğu ve böylece enfeksiyonun başladığı, hastalık etkeninin bağırsakların tüm bölümlerine kolonize olduğu ve 100 dakikada içinde maksimum tutunmanın meydana geldiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Yaman vd., 2003). Ölmek üzere olan balıklardan izole edilen 16 farklı serotipteki *V. anguillarum*'un hepsinin balıklar için patojen olmadığı bildirilmiştir. *V. anguillarum*'un belirlenmiş yirmiden fazla (O1-O23) farklı serotipi olduğu rapor edilmiştir (Grisez ve Ollevier, 1995). Dünya çapında özellikle morina balığı ve salmonid türü balıklarda hastalık oluşturan serotipleri O1, O2 ve O3 olarak bildirilmiştir (Pedersen vd., 1999; Noga, 2010). Levreklerde çoğunlukla serotip O1 ve O3, yılan balıklarından serotip O3, alabalıklarda serotip O1 ve O2'nin, enfeksiyonlara yol açtığı (Toranzo ve Barja, 1990; Pedersen vd., 1999; Korun ve Timur, 2008), başka bir araştırmada ülkemizde son 15 yılda levreklerden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının genellikle serotip O1 olduğu bildirilmiştir (Çağırğan, 2004).

*V. anguillarum* deniz ortamının normal mikrobiyal florasında bulunduğu, bakteri sayısı deniz suyu sıcaklığının artmasıyla yazın artmakta, kışın ise azaldığı rapor edilmiştir. Bu patojenin deniz suyunda 50 aydan daha uzun süre canlı kaldığı tespit edilmiştir. Deniz balıklarının normal bağırsak florasında da bulunduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987).

Levrek larvalarının bağırsak mikroflorası, yemleme rejimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Levrek larvaları rotiferlerle beslendiği zaman *V. anguillarum*, *V. tubiashii*, levrek yavruları artemiayla beslendiği zaman ise *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi* ve *V. natriegens* izole edilmiştir. Larval gelişim sırasında bağırsakta herhangi bir bakteri türünün dominant kolonizasyonu saptanmamış olup, larval yaşama siklusunun sonunda rotiferlerle beslenen larvaların bağırsağında *V. anguillarum* dominant hale geldiği ve hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Grisez vd., 1997).

Balık hastalıklarının çıkışında çevre, patojen ve konakçı üçgeni önemli rol oynamaktadır. Balık patojeni olan vibrio türlerinin adhezyon yetenekleri ve enfeksiyon meydana getirme kabiliyeti, iki önemli çevresel faktör olan sıcaklık ve tuzluluğa bağlı olarak gelişmekte olduğu bildirilmiştir. Tüm *vibrio* türleri için minimal adhezyon değerleri en düşük 4°C sıcaklık, % 0.10 tuzlulukta ve optimum 25°C'lik sıcaklıkta gerçekleştiği rapor edilmiştir. Balığın derisindeki mukus patojenik *vibrio* 'lar için inhibitör etkisinin varlığı bildirilmiştir. *V. anguillarum*'un 25°C'de sarıkuyruk, çipura ve sazan balıkları için virüent iken, 15°C'de sarıkuyruk dışındaki balıklarda virüent olmadığı bildirilmiştir (Yaman vd., 2003).

Hastalığın epizootiyolojisi ilişkin, su sıcaklıkları 10°C'nin üzerine çıktığı sıcak yaz aylarında, sudaki çözülmüş oksijen miktarının azaldığı ve aşırı kalabalık ve kötü hijyen şartları altındaki balıklar stresli olduğu zaman salgınların meydana geldiği bildirilmiştir. Bununla birlikte hastalığın 1-4°C sıcaklıktaki sulara yetiştirilen balıklarda da ortaya çıktığı bildirilmiştir. Etken deri, solungaçlar ve anüs yoluyla vücuda girdiğinde hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1987).

*Vibrio* türlerinin patojenik mekanizmasının doğasıyla ilgili tartışma ekzotoksinler ve/veya endotoksinlerin olası etkileşimi üzerinde odaklanmıştır. Patojenite üzerine yapılan bir çalışmada, *Vibrio anguillarum*'un 24 saatlik sıvı kültürlerinden elde edilen filtre ile sterilize edilmiş süpernatanın akvaryum balığı (goldfish)'na enjeksiyonunun ardından % 70'in üzerinde ölüm meydana geldiği bildirilmiştir. Chinook salmonlara üzerine yapılan başka bir çalışmada endoksin enjekte edildiğinde enjeksiyon bölgesinde hemorajik lezyonların varlığı saptanmıştır. Diğer bir

çalışmada önemli bir gelişme olarak "hemolitik toksinler" enfekte balıkların kansızlığın yanıtından sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür (Austin and Austin, 1987).

Kırmızı çipurada *V. alginolyticus*'un virülensi üzerine yapılan bir çalışmada; *V. alginolyticus* ile rotiferin varlığında ölümlerin arttığı, *V. alginolyticus* ile *Chlorella*'nın varlığında, *V. alginolyticus*'un tek başına bulunduğu ortama göre daha az ölüm meydana geldiği, bu üç organizmanın hepsinin varlığında ise *Chlorella*'nın rotifer tarafından tüketildiği ve *V. alginolyticus*'un sayısında artış olduğu gösterilmiştir (Yaman vd.,2003).

Vibriozisin bulaşmasında su yolu ile bulaşma esas olduğu, direkt temas ile deri, yüzgeçler, anüs ve solungaçlardan etkenin girerek invazyon yaptığı, deri ve anüs yoluyla bulaşmanın daha önemli olduğu, fakat enfeksiyonun oral yolla da bulaştığı ifade edilmiştir. Kontamine artık balıklar ve atık deniz ürünleri ile yapılan besleme sonrası vibriozisin patlak verdiği, ısı işlemi görmemiş artık balıklarla besleme yalnızca vibriozis salgınlarına değil tüberkülozis, ichthyophoniasis gibi hertürlü oral yolla bulaşan salgınların çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir. *V. alginolyticus*, deniz balığı yetiştirilen tanklardaki sulardan izole edilmiş, bu nedenle enfeksiyonun ortaya çıkmasında kontamine suyun da büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (Çağırğan, 1993).

Yılan balıklarında ve alabalıklarında yapılan deneysel çalışmalarda sublethal düzeydeki bakırın vibriozisin patlak vermesine neden olduğu, fakat klorun böyle bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Ağır metal olan bakırın solungaçlardaki mukus tabakasında koagülasyon yüzünden oksijen taşınmasını engelleyici etkisi solunum stresine bağlı olduğu bildirilmiştir (Austin and Austin, 1987)

#### **1.2.1.2. Vibriozisin Klinik Belirtileri ve Otopsi Bulguları**

Çeşitli vibrio türleri, stres veya travma gibi faktörlerin etkisi altında kalan gerek kültür yapılan ve gerekse doğal ortamdaki deniz balıklarında enfeksiyon oluşturdıkları bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

Klinik bulgular hastalığın evresine bağlıdır. Hastalık per-akut seyrettiğinde (özellikle genç balıklarda) iştahsızlık (anoraxia) ve derinin renginin koyulaşması dışında başka bir klinik bulgu göstermeden yüksek mortalite ile son bulmaktadır. Akut form konjestif ve hemorojik seyretmektedir. Anüs etrafında ve yüzgeç diplerinde kırmızı kanlı lezyonlar, bazen deride, kaslarda şişkinlikler ve ülserleşme meydana gelmektedir. Otopsi yapıldığında hastalıklı balıkların iç organlarında konjesyon (hiperemi), hemoraji ve ödem şekillenmektedir. Hastalığın kronik evresinde, enfekte balıkların kas dokusuna kadar inen geniş lezyonlar görülmektedir. Ağır anemi'nin göstergesi olarak solungaçların solgun olduğu ve peritonda ise fibrinöz yapışmaların tespit edildiği bildirilmektedir. Ağızda veya deri yüzeyinde, kaslarda, orbita ve yüzgeç diplerinde oluşan fokal nekrotik lezyonlar subepidermal olduğu zaman deri üzerinde siyah renkli bölgeler görülmektedir. Eğer bu lezyonlar ülserleşirse sığ fakat geniş dermal kollejen kaynaklı beyaz kenarlı ve siyah pigmentli bir halka ile çevrili hemorojik ülserlerin geliştiği bildirilmiştir. Bu lezyonlar *V. anguillarum* veya diğer *vibrio* türlerinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

*V. anguillarum* ile enfekte hasta yılan balıklarında deride tipik olarak renk değişikliği, karın kaslarında kırmızı nekrotik lezyonlar, yüzgeçlerin dip kısımlarında, anal bölge etrafında ve ağızın iç kısmında kırmızı lekelerin varlığı bildirilmiştir. İç organlardaki başlıca bulgular; dalakta büyüme ve erime, böbreklerde erime, karın duvarı ve viseral peritonda peteşiel kanamalar görülmektedir. Sindirim kanalı ve rektum genişlemiş ve berrak yapışkan bir sıvı ile dolu olduğu görülmektedir. Exophthalmia belirgin olduğu bildirilmiştir. Hastalığın etkeni olan bakteriler bütün dokulara eşit olarak dağıldığı halde en yoğun şekilde kanda bulunmaktadır. Hasta balıkların hareketsiz olduğu, yem alımını kestikleri ve ağır mortalite gösterdikleri rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

Hastalıklı balıklarda tipik olarak solgun deri, karın kaslarında kırmızı nekrotik lezyonlar mevcut, ağız içinde, burun deliği çevresinde ve yüzgeçlerin tabanında kızarıklık görülmektedir. Bağırsak ve rektum şişmiş olabilir, ve açık viskoz sıvı ile dolu olabilir. Eksoftalmus belirgindir. Pasifik salmon fingerlinglerinde hastalığın başlangıç safhasında bir bakteriyemi oluşmaktadır. Hsitolojik muayenede, kanda, bağ dokusunda, solungaçlar, böbrek, karaciğer (bir anemi), gastro-intestinal sistemin posteriorunda



patolojik değişikliklerin varlığı, ve dalağın şişmiş olduğu bildirilmiştir. Kandaki bakteri hücrelerinin en yüksek konsantrasyonda olmasına rağmen, enfekte dokulara eşit dağılmış olduğu görünmektedir. Genelde enfekte balıkların hareketsiz ve iştahsız olduğu rapor edilmiştir. Bu klinik belirtileri gösteren balıkların tedavisinde başarısı olunduğu ve bu yüzden ağır ölümlerin olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987).

Genç kültür salmon ve kalkan balıklarında görülen perakut vakalarda ara sıra periorbital veya abdominal ödem dışında başka klinik bulgu görülmemiştir. Ergin balıklarda akut ve kronik safha geliştiiğinde ağır kayıpların meydana geldiği bildirilmiştir. Akut safhadaki balıklarda deri koyu renkli, içinde çok sayıda bakteri bulunan nekrotik dokuya ait kırmızı renkli sıvı biriken ülserleşmiş kabarcıklar olduğu tespit edilmiştir. Derinlere kadar inmiş kas lezyonları yanı sıra dalakta büyüme ve likefaktif (yumuşama ve sulanma) nekroz geliştiiği rapor edilmiştir. Dalağın rengi kiraz kırmızısı renkte ve keskin kenarları kaybolmuş olduğu rapor edilmiştir. Enfeksiyonun kronik evresinde olan balıklarda kaslarda derin lezyonlar oluşabilmektedir. Solungaçlardaki solgunluk ağır anemiyi işaret etmektedir. Viseral organları ve karın boşluğunu örten peritonda fibrinöz adhezyonlar (yapışmalar) görülmektedir. Enfekte balıkların gözleri genellikle kanla örtülü ve opaklaşmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, gözün kornea tabakasında ülserasyon görüldüğü bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

İsrail’de kültürü yapılan çipuralarda *V. alginolyticus*’un mortaliteye gözlemlendiği bir balık patojeni olarak bildirilmiştir. Ölümler balıkların aşırı ellenmesinden sonra kaydedilmiştir. Bu nedenle *V. alginolyticus* zaten hasarlı dokuların fırsatçı bir istilacı veya stresli balıkların zayıf bir patojeni olarak hastalık oluşturduğu bildirilmiştir. *V. alginolyticus* red spot (kırmızı benek) hastalığından muzdarip deniz kefallerinde sekonder bir istilacı olarak rapor edilmiştir. (Austin ve Austin, 1987). İspanya’daki kültür yapılan çipuralarda ise *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* ve *V. splendidus*’un vibriozise neden olduğu bildirilmiştir. Çipura balıklarında hastalık tipik bir bakteriyel septisemi olarak tarif edilmektedir. Hasta balıkların durgunlaştığı, deri renginin koyulaştığı, pullarının gevşeyip yerinden düştüğü, deri üzerinde ülserlerin geliştiiği bildirilmiştir. Karaciğerde, bağırsak duvarındaki kapilar damarlarda, hava kesesinde ve peritonda hiperemiler görüldüğü bildirilmiştir. Bağırsağın temiz olduğu görülmektedir. Safra kesesi artan safra nedeniyle

genişmiş ve bağırsak boyunca uzamış olduğu belirlenmiştir. Solungaçlarda anemi ve nekrozun varlığı bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

Atlantik salmon balıklarında Hitra hastalığı olarak bilinen “soğuk su vibriozisi” hastalığın etkeni *V. salmonicida* olduğu rapor edilmiş ve Kanada, Norveç ve İskoçya’da coğrafik dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1999). Norveç’te Atlantik salmon üretiminde muazzam bir artış ile belkide aynı zamanda yeni ve tehlikeli bir hastalık endüstride tahribata sebep olacağı kaçınılmazdı. 1979 yılında Norveç’in güneyinde Hitra adası çevresinde yerleşmiş salmon çiftliklerinde yeni bir hastalık ortaya çıktığı bildirilmiştir. Hastalık özellikle ilkbahar başından sonbaharın sonuna kadar olan sürede ağırlıklı olarak meydana geldiği bildirilmiştir. Hastalığın bugün Norveç’teki bütün çiftliklere yayıldığı, Kanada ve İskoçya’da hastalık olgularına ait bazı raporların varlığı bildirilmiştir. Hastalık generalize bir hemorajik septisemie benzemektedir. Dış hemorajiler karın çevresinde belirgin olabilir. İç belirtiler, iç organlar, yüzme kesesi, karın duvarı ve gastrointestinal sistemin posterioründeki kanamalar aneminin genellikle kanıtının olduğu rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1999). Norveç’te 1970 yılından beri özellikle kış aylarında bu hastalık nedeni ile yüksek ölümlere bağlı büyük ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Hastalığın nedeni önceleri beslenme bozukluğuna bağlı, selenyum ve vitamin E eksikliğinden ileri geldiği sanıldığı rapor edilmiştir (URL-1). Hitra hastalığının ilk klinik belirtisi iştahsızlık ve düzensiz yüzme hareketleri olarak bildirilmiştir. Balıklar hastalığın perakut safhada hiçbir belirti göstermeden ölebildikleri tespit edilmiştir. Genel dış bulgular; solungaçların solgun olması, yüzgeç diplerinde hemoroji, rektumda kızarıklık, şişkinlik, ara sıra prolapsus ve karın altı duvarında peteşil kanamaların varlığı rapor edilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

*V. damsela* ilk olarak damsel balıklardan biri olan *Chromis punctipinnis*’in yan tarafı boyunca ülseratif lezyonlarla ilişkiliydi. Bu ülserler güney California’nın sahil sularındaki balık popülasyonları arasında yaz ve sonbaharda varlığı rapor edilmiştir. Etken pektoral ve kaudal yüzgeç çevresinde 5-20 mm çapında ülserlerle karakterize bir hastalık olarak tarif edilmiştir. Kaslarda tipik olarak ülseratif erimeler meydana getirdikleri tespit edilmiştir. Hastalığın sarı kuyruk, kalkan, kahverengi köpek balıklarında ve çipuralarda da görüldüğü bildirilmiştir. İnsanlardaki ülserli yaralardan

da izole edildiği için zoonoz bir hastalık olarak önemli olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Noga, 2010).

*V. cholerae* (non-01) bu etken ilk defa 1997 yaz mevsiminde Japonya'daki Amano nehrindeki yabancı ayu balıklarından ve Avustralya'daki goldfish balıklarından balık patojeni olarak izole edilmiştir. Balıkların vücut yüzeyinde peteşiyel kanamalar ve iç organların kanlı olduğu görülmüştür. Ayu ve yılan balıklarında hastalık etkeni ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda yüksek patojeniteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ölümler su sıcaklığına bağlı olarak şekillendiği bildirilmiştir. Ayu balıklarında su sıcaklığı 21-26°C'de 2-7 günde ölümler başlamış, fakat 16°C'de ölüm görülmemiştir. Yılan balıklarında ise 21°C'de 5 gün içinde % 10 mortalite şekillenirken, 26°C'de 3-7 gün içinde % 30'luk bir mortalite gözlemlendiği bildirilmiştir. *Vibrio cholerae* (non-01) insan için zoonoz bir patojen olan *Vibrio cholerae* biyotip "El tor" 'dan ornitin dekarboksilaz ve mannoz testinin negatif olması ile ayrılır. (Austin ve Austin, 1987; Noga, 2010).

Önceleri *V. anguillarum* biyotop 2 olarak isimlendirilen etken, *V. ordalii* olarak yeniden isimlendirilerek yeni bir tür oluşturulmuştur. *V. ordalii* tarafınan oluşturulan hastalık Japonya'da ve Amerika'da kuzey pasifiğin batısında deniz balıklarında görüldüğü kaydedilmiştir. Hastalık hemorajik septisemi ile katagorize edildiği rapor edilmektedir. Hastalıklı balıkların kas, solungaçlar ve gastrointestinal sistemden izole edilen *V. ordalii*'nin farklı biyokimyasal özellikler gösterme eğilimindedir. Klinik bulguları *V. anguillarum* ile aynı olduğu bildirilmiştir. Fakat *V. anguillarum* ve *V. ordalii* 'nin sebep olduğu hastalığın patolojisinde çok az bir farklılığın olduğu da bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Noga, 2010).

*Vibrio vulnificus* enfeksiyonu, Japonya'da 1975-1977 yılları arasında 6 bölgede kültürü yapılan yılan balıklarındaki ciddi hastalık vakalarından izole edilen etkenin *Vibrio anguillarum* tip B olduğu sanılmış, daha sonraki çalışmalarda laktozu fermente eden vibrio etkeninin *Vibrio vulnificus* biogroup 2 olduğu anlaşılmıştır. Hastalık balıkların dış yüzeyi, yüzgeç ve kuyrukta dikkate değer bir şekilde kızarıklık ile karakterize kanama mevcuttur. İlaveten sindirim sistemi, solungaçlar, kalp, karaciğer ve dalakta patolojik değişikliklerin varlığı tespit edilmiştir. Hastalık klasik vibriozise

benzerlik gösterdiği, ancak hastalığın etkeni konunun uzmanı araştırmacılar tarafından mikroskopik olarak ayırt edilebildiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987). Deniz ortamından izole edilen asıl insan vibrio patojeni olan *Vibrio vulnificus* biogroup 1 balık patojeni olmadığı rapor edilmiştir (Noga, 2010).

*V. parahaemolyticus* Çin’de orfoz ve sarı şarlatan gibi tropikal balık türlerinde ciddi hastalıklara sebep olan bir etken olduğu rapor edilmiştir. Acı sulardaki killifish balıklarında hastalığa sebep olduğu bildirilmiştir (Noga, 2010). Bir balık patojeni olarak *V. parahaemolyticus* rolü üzerinde tartışma olduğu bildirilmiştir. Bir makalede *V. parahaemolyticus* ile tilapiada deneysel enfeksiyon testlerinden bahsedilmiş, fakat etkenin izolasyonu doğruluğu hakkında yeterli bir bilginin olduğuna rastlanılmamıştır. Ancak, Filipinlerde hastalıklı milkfishlerden *V. alginolyticus* ve *V. parahaemolyticus* arasında ara özelliklere sahip organizmaların varlığı kaydedilmiştir. Kontamine deniz ürünlerini tüketen insanlarda gıda zehirlenmesine neden olduğu için zoonoz bir bakteri olarak bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1999). *V. parahaemolyticus* çipuralardan izole edildiği fakat “Koch Postülatları” teyit edilememiştir. Ayrıca, birçok deniz balığından hastalık etkeni olarak *V. parahaemolyticus* izole edildiği bildirilmiştir (Çağırğan, 1993).

*V. carchariae* (*V. harveyi*) göz lezyonlarına, deri ülserlerine ve sistemik hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. ABD’nin Baltimore şehrindeki ulusal akvaryumda ölmüş sandbar köpek balığından (*Carcharhinus plumbeus*) ve limon köpek balığından (*Negaprion brevirostris*) hastalık etkeni olarak ilk kez izole edildiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Noga, 2010). Daha sonraki yıllarda ABD, Japonya ve Avrupa’da (özellikle İspanya) çipurada, levrek, common snook (*Centropomus undecimalis*), istavrit (*Trachurus japonicus*), süt balığı (*Sciaenops ocellatus*) ve köpek balıklarında (*Carcharhinus plumbeus*, *Negaprion brevirostris*), dil balığı (*Solea senegalensis*), pisi balığı (*Paralichthys dentatus*), kaplan kirpi balığı (*Takifugu rubripes*) göz hastalığı (körlük) ve vaskulitis “kan damarların yangısı” hastalığı olan balıklardan izole edilmiştir (Austin ve Austin, 2007). Hastalık etkeni *V. alginolyticus* çok benzerse de bazı biyokimyasal özellikleri ile ondan ayrıldığı bildirilmiştir. Hastalık bir vaskulitis “kan damarlarının yangısı” olarak tanımlanmıştır. Enfekte hayvanlar letarjik “uyuşuk”, iştahsız, bilinç kaybı görüldü ve nekrotik deri altı kistler geliştiği

bildirilmiştir. Postmortem muayenede beyin iltihabı, menenjit, böbrekte nekroz, vaskulitis, karaciğer ve dalakta hasar tespit edilmiştir (Austin ve Austin, 1987).

Vibriozis'e ait genel bulgular; operkulum'da ve sırtta hemorojik ülserasyon ve koyu lekelerin varlığı bildirilmiştir. İç belirtiler olarak anemiden dolayı balık solgun olduğu gözlenmiştir. Hava kesesinde, abdominal yağ kitlesi, karaciğer ve diğer viseral organlarda hemoroji ve ascites varlığı bildirilmiştir. Dalak solgun renkte ve karaciğerin rengi gri-kahverengi ile sarı arasında değiştiği bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003).

### 1.2.1.3. *Vibrio*'ların İzolasyonu ve Etken Özellikleri

Hastalıklı balıkların enfekte dokularından % 0,5-3,5 NaCl (tuz) ilave edilmiş triptik soy agar (TSA), nutrient agar (NA), brain heart infusion agar (BHIA) ve seawater agar (SWA) kullanılarak ekim yapılan besi yerleri 15-25°C'deki inkübatörlerde en az 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Austin and Austin, 1987).

*Vibrio* türleri, gram negatif, hareketli, kıvrık basil, 0,5-0,8 X 1,4-2,6 µm boyutlarında besi yerinde krem renğinde, yuvarlak, kenarları düzgün koloniler oluşturan, fermentatif, oksidaz pozitif, genellikle O/129'a hassas bakterilerdir. Optimum 20-30°C'de üreme özelliği göstermesine rağmen (Noga, 2010; Actis vd., 2011) tatl sularda 1-4°C'de hastalık oluşturduğu da rapor edilmiştir (Austin and Austin, 1987).

*V. anguillarum*; vibrionaceae familyasının halofilik grubuna ait, gram negatif, tek polar flagelası olan, 0,5 X 2 µm boyutlarında kıvrık çomak şeklinde, fakültatif anaerob, guanin ve sitozin (G+C) içeriği % 43-46 olan, 25-30°C'de, %1,5 NaCl içeren TSA, BHIA gibi genel besi yerlerinde rahatça üreyebilen bir bakteridir. Katı besi yerinde yuvarlak düzgün, krem renkli koloniler oluştururlar (Austin and Austin, 1987; Timur ve Timur, 2003; Actis ve diğ., 2011). Sitokrom oksidaz, katalaz, ONPG (β-galaktosidaz), indol, nitrat, jelatin, amilaz, arjinin dihidrolaz, glukoz, mannitol, sakaroz, mannoz, sorbitol, fruktoz testleri pozitif; lüminisans, üre, ornitin ve lizin dekarboksilaz, glukozdan gaz oluşumu, laktoz, ksiloz, ramnoz ve melibioz testlerine negatif olarak sonuç verdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 2007). Metil red (MR), Voges-proskauer (VP), sitrat, üçlü şeker testi (triple sugar iron= TSI),

eskülin, arabinoz, maltoz, inostol ve galaktoz testleri için bu araştırmacılar farklı sonuçlar bildirmiştir. Diğer taraftan O/129'a duyarlılık testi, TCBS agarda sarı ve yeşil koloni oluşturma, VAM (*V. anguillarum* Medium) seçici besiyerinin rengini sarıya çevirerek sarı koloniler oluşturma, 37°C'de ve % 3-5 NaCl içeren besiyerinde üreyebilme özellikleri aynı araştırmacılar tarafından verilen benzer özellikler Tablo 3'de verilmiştir. Ayrıca, Serotip O1 suşunun arabinoz test sonuçlarının pozitif verme eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Toranzo ve Barja, 1990).

Japonya'da ayu balıklarından elde edilen 52 adet *V. anguillarum* izolatının 27 tanesinin O/129'a duyarlı olmadığı bildirilmiştir. *Aeromonas* sp. ve *V. anguillarum* arasında ara karakter gösteren bir bakterinin izole edildiği tespit edilmiştir. *Aeromonas* grubu bakterilerin de O/129'a duyarlı olmasının identifikasyonu güçleştirdiğini ancak *V. anguillarum*'da O/129 için minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MIC) 1-5 µg/ml olduğunu bildirmiştir (Yaman vd., 2003).

*V. harveyi*; düzgün omak şeklinde, sitokrom oksidaz, katalaz, indol, MR, nitrat, amilaz, lizin dekarboksilaz, maltoz, glukoz, mannoz testlerine pozitif; eskülin, arjinin dehidrolaz, glukozdan gaz oluşumu, inostol, ksiloz, ramnoz ve milibioz testlerine negatif; ONPG, üre, VP, sitrat, jelatin, ornitin dekarboksilaz, arabinoz, sakaroz, sorbitol, galaktoz, laktoz testlerine değişken sonuç verdiği bildirilmiştir. Lizin ve ornitin dekarboksilaz testinin pozitif, arjinin dehidrolaz testinin negatif olduğu rapor edilmiştir (Güralp, 2012). TCBS agarda sarı ve yeşil renkte gelişebilen suşlarının olduğu, VAM seçici besiyerinde sarı ve mavi gelişme gösterdiği rapor edilmiştir (Biosca vd., 1991; López vd., 2009). *V. harveyi*'nin O/129'a duyarlılık testlerinde değişkenlik gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Liu vd., 2004; Gomez-Gil vd., 2004; López vd., 2009). *V. harveyi*'nin diğer dirençli *vibrio* türleri olan *V. cholerae* ve *V. parahaemoliticus* gibi O/129'a karşı direnç kazanmış olabileceği rapor edilmiştir. Zargana balıklarında yapmış oldukları çalışmada fırsati patojen olan *V. harveyi*'nin tüm suşlarının O/129'a hassas olduğunu rapor etmişlerdir (Güralp, 2012). Hastalıklı karideslerden izole edilen virülensi yüksek ve limünisans özellik göstermeyen *V. harveyi* suşlarının O/129'a hassas oldukları tanımlanmıştir (Zhou vd., 2012). Tayvan'da kültürü yapılan deniz balığı olan *Rachycentron canadum* juvenillerinde büyük oranda mortalite nedeni olan *V. harveyi* (*V. carchariae*)'nin O/129'a hassas olduğu ve TCBS

agarda sarı koloniler oluşturduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2004). Filipinler’de yetiştiriciliği yapılan *Lates calcarifer* türü levreklerde strese bağlı sekonder etken olarak bildirildiği *V. harveyi* suşlarının O/129’a hassas olduğunu, fakat referans olarak aldığı literatürdeki suşların 10 µg etken madde içeren O/129’a dirençli olduklarını rapor etmiştir (Tendencia, 2002). İspanya’da kültür çipuralarında primer vibriosis etkeni olarak izole edilen *V. harveyi* suşlarının 150 µg etken madde içeren O/129’a duyarlı oldukları bildirilmiştir (Balebona vd., 1998). *V. harveyi* ve yakın türlerinin moleküler teşhisinde kullanılan tüm suşların 150 µg etken madde içeren O/129’a duyarlı olduğu bildirilmiştir (Gomez-Gil vd., 2004). Hastalıklı dil balıklarından izole edilen ve vibrio etkeni olarak teşhis edilen *V. harveyi* suşlarının tamamının O/129’a (10µg ve 150µg) dirençli oldukları rapor edilmiştir (López vd., 2009).

*V. alginolyticus* ile *V. harveyi* birbirinden güçlükte ayırt edilmektedir. VP testi ile ayırt edilebileceği ve ek olarak glukuronat fermentasyon testinin yapılması gerektiği bildirilmiştir. *V. alginolyticus* MSA-B (deniz tuzu içeren kanlı agar) besi yerinde 25°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda yayılarak ürediği, 42°C’de gelişebildiği, D-Glukronat ve üre testine negatif sonuç verdiği, *V. harveyi*’nin ise daha yavaş geliştiği ve üre testine genellikle (%50) pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir (Güralp, 2012).

*V. ordalii*; TSA ve TCBS besi yerlerinde 15-25°C inkübasyonda 7 günün üzerinde primer olarak izole edilebilir. *V. ordalii* SWA’da primer izolasyonu 22°C’de 4-6 gün içinde oldukça yavaş üreyen 1-2 mm çapında, sirküler, konveks ve beyaz koloniler oluşturduğu bildirilmiştir. *V. ordalii*’nin üreyebilmesi için besi yerlerine % 0,5-% 3 sodyum klorüre ihtiyaç gösterdikleri rapor edilmiştir (Austin and Austin, 1987).

*V. cholerae* non-01; Gr(-),fermantatif çubuk şeklinde ve tek polar flagellası ile hareketli olan bir bakteridir. Etkenin % 0-6 sodyum klorüre, pH7-10 arasında ve 10-42°C’deki sıcaklık aralığında üreyebildiği bildirilmiştir. Kanlı agarda üretildiğinde hemolis oluşturduğu tespit edilmiştir. Hastalıklı balıkların böbreklerinden steril swabla alınan numunelerin nutrient agara ekilmesi ile 25°C’de 2-5 gün içinde üreyebildiği rapor edilmiştir. İnsan için patojen olan *V. cholerae* biyotop ‘el tor’ dan ornitin dekarboksilaz ve mannoz t estinin negatif olması ile ayrılmaktadır (Austin and Austin, 1987).

*V. vulnificus*; Japonya’da 1975-1977 yılları arasında 6 ayrı bölgede kültürü yapılan yılan balıklarında ciddi hastalık vakalarından izole edilen *V. anguillarum* tip B olduğu rapor edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar organizmanın aslında laktozu fermente eden yeni bir biyotip olan *V. vulnificus*, yani biyogrup 2 olduğu rapor edilmiştir. Etken 20-37°C’ler arasında % 0,5-5 sodyum klorür içeren TSA ve SWA’da üremesine karşın 5 ve 42°C’de üreyemediği bildirilmiştir (Austi and Austin, 1987).

*V. parahaemolyticus*; Gr(-), hareketli (flagella hareket), oksidaz ve katalaz pozitif, O/129’a duyarlı, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif-anaerob, kıvrık-düz ve halofilik (tuza ihtiyaç gösteren) çomakçılar olduğu, %0 tuzda üremediği fakat % 10 tuzlu ortamda üreyebildikleri bildirilmiştir. Etken % 3 NaCl ilave edilmiş TSA’da ve TCBS agarda 25°C’de 24 ve 48 saat sonra koloni oluşturdıkları rapor edilmiştir. TCBS agarda üreyen kolonilerin yeşil renkte olduğu bildirilmiştir. Glikozdan asit oluşturmaya karşın laktozu etkilemediği tespit edilmiştir. İndol pozitif, VP, H<sub>2</sub>S, sitrat ve üre negatif olduğu tespit edilmiştir. Yılan balıkları ve sarı kuyruk balıkların eritrositlerini hemoliz ettikleri veya tavşan kanlı jelozda hemoliz yapar (Alcaide vd., 1999 ).

*V. splendidus*; Gr (-), hareketli, fermentatif, metil red (MR), katalaz ve oksidaz tesleri pozitif, fakat indol, VP, H<sub>2</sub>S, kitin ve jelatin tesleri ise negatif olduğu bildirilmiştir. O/129’a duyarlı olduğu, % 3 NaCl’de ve 37°C’de ürediği, fakat % 0 ve % 7 NaCl’de üremediği tespit edilmiştir. Hastalıklı çipura ve kalkan balıklarının böbrek, karaciğer, dalak, ve periton boşluğundaki bakterial populasyon içeren sıvıdan %2 NaCl ilave edilmiş TSA’da ve TCBS agarda 22°C’de 48 saat sonra koloni oluşturdıkları rapor edilmiştir. DNA’sının guanin ve sitozin (G+C) oranı % 45,7-47,8 mol olduğu rapor edilmiştir (Austi and Austin, 1999; Austi and Austin, 2007).

Çipura ve levrek balıklarındaki hastalık olgularından izole edilen *vibrio türlerine ait* fenotipik karakterleri aşağıdaki Tablo 3’de verilmiştir.



**Tablo 3.** Balıklardaki hastalık olgularından izole edilen patojen *Vibrio* türlerinin karakteristik özellikleri (Austin and Austin, 1987).

Özellikleri					Özellikleri				
	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. ordalii</i>		<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. ordalii</i>
Hareket	+	+	+	+	Nitrat redüksiyonu	+	+	+	d
Yaygın koloni	+	-	-	-	VP	+	+	+	-
FM	+	+	+	+	O/129'a duyarlılık	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	37°C'de üreme	+	+	?	-
Oksidaz	+	+	+	+	% 0 NaCl'de üreme	-	-	-	-
ADH	-	+	+	-	% 7'de NaCl'de üreme	-	-	-	-
β- galaktosidaz	-	+	-	-	Sitrat kullanımı	?	+	-	-
H <sub>2</sub> S	+	-	-	-	Malonat Kullanımı	?	+	-	?
İndol	+	+	-	-	Şekerden asit üretimi				
LDK	+	-	-	-	Arabinoz	-	+	-	-
ODK	+	-	-	-	İnositol	-	-	-	-
FAD	?	-	-	-	Laktoz	-	-	-	-
Eskulin hidrolizi	-	-	?	-	Maltoz	+	+	+	+
Kitin hidrolizi	+	+	+	d	Mannitol	+	+	-	+
Jelatin erime	+	+	-	+	Mannoz	+	?	+	?
Lipit hidrolizi	+	+	-	-	Salisin	+	-	-	-
Nişasta hidrolizi	+	+	+	-	Sakkaroz	+	+	+	+
Üreaz	+	-	+	-	G+C (% mol)	45-47	46,3	43,0	43-44
Metil red	+	-	+	-					

FM: Fermentatif metabolizma, ADH: Arjinin dihidrolaz, LDK: Lizin dekarboksilaz, ODK: Ornitin dekarboksilaz, FAD: Fenilalanin deaminaz, VP: Voges - Proskauer, (+): Pozitif, (-): Negatif, (d): Değişken, (?): Bilinmiyor

## 1.2.2. Moleküler Yöntem

### 1.2.2.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Canlı organizmadaki genetik yapının temelini oluşturan hücrelerin moleküler düzeydeki nükleik asitlerin iki türü olan DNA ve RNA nükleotitlerin polimeridir. Bu nükleotitler heterosiklik halka şeklinde 5 karbonlu bir şekerden, azot atomları içeren organik baz olan pürin ve pürimidinler'den ve fosfat grubu olmak üzere üçlü bir yapıdan meydana gelmektedir. DNA canlıların büyük çoğunluğunda çift zincirli olup

birbirlerine kovalent olmayan hidrojen bağıyla bağlı ve zıt yönde uzanan paralel iki iplikten oluşmaktadır. Organik bazlar olan adenin (A) ile timin (T) ve guanin (G) ile sitozin (C) arasında hidrojen bağları bulunmaktadır (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Temizkan vd., 2008).

Hücrede DNA, RNA ve bazı proteinler kompleks bir halde bulunurlar. DNA'nın izolasyonu için farklı yollar kullanılsada, temel olarak üç aşamada meydana gelmektedir;

1. Hücre duvarının parçalanmasıyla yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın açığa çıkartılması,
2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin çözülmesi,
3. Enzimatik ve kimyasal yöntemlerle DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden (RNA ve protein) ayrılması ile gerçekleştirilmektedir (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Temizkan vd., 2008).

Çalışılacak molekül grubunun elde edilebilmesi için hücre duvarının ve zar yapısının parçalanması gerekmektedir. Bunun için öncelikle hücre çeperini zayıflatmak ve sonrasında parçalamak suretiyle iki aşamada oluşabildiği gibi tam parçalama işlemi fiziksel ve kimyasal (SDS, vs.) yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Bakterinin hücre duvarındaki glukoprotein yapı, lizozim ve proteinaz K gibi enzimler kullanılarak şeker molekülleri arasındaki bağları kopararak hücre duvarının yapısı bozulabilmektedir. DNA-protein kompleksinin çözülebilmesi için denatürasyona dayalı ve daha çok fenol ekstraksiyonuyla gerçekleştirilmektedir. DNA'nın ortamdaki diğer moleküllerden (RNA ve protein) ayrıştırılabilmesi için; DNA kimyasal (ethanol, izopropanol, vs.) olarak çöktürülebilmekte ve çöken DNA'yı sıvı çözücülerden ayırabilmek için fiziksel (santrifüj) etkiye maruz bırakılmaktadır (Newton ve Graham, 1994; Kornberg ve Baker, 2005; Temizkan vd., 2008).

#### **1.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

DNA parçasının laboratuvar koşullarında DNA polimeraz enzimi ve uygun iki primerle tarafından sentezlenmesini sağlayan bir yöntem olduğu rapor edilmektedir (Newton ve Graham, 1994; McPherson ve Møller 2006; Pelt-Verkuil vd., 2008). Bu

yöntem günümüzde balık hastalıkları etkenlerinin direk teşhisi ve etken mikroorganizmanın karakterizasyonunun doğrulanması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. RAPD, PZR-RFLP, AFLP, Real Time PZR, RT-PZR (reverse transcription PZR) gibi farklı PZR yöntemleri kültürü zor olan bakteri ve virüslerin direk teşhisi için sıklıkla kullanılmaktadır (Altınok ve Kurt, 2003).

PZR testi tekrarlanan üç basamakla gerçekleşmektedir;

1. DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (94°C),
2. Primerlerin DNA üzerindeki hedef bölgelere özgü verilecek sıcaklıkla birleşme reaksiyonu,
3. Taq DNA polimeraz eniminin yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C'de primerlerin uzaması,

Böylece DNA dizilerinin replikasyonları istenilen miktarda tekrarlanan döngüyle hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Yöntemde temel olan, çoğaltılmak istenilen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz sıralarının tamamlayıcısı olan 18-20 baz uzunluğunda oligonükleotid primer kullanılarak, sınırlandırılan bölgenin iki primer ile enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

Bir PZR döngüsü için gereken beş ana madde;

1. Genomik DNA
2. Bir çift sentetik primer
3. dNTP
4. Yüksek ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi
5. Uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışım (MgCl<sub>2</sub>) (Newton ve Graham, 1994; McPherson ve Møller, 2006).

### **1.2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi**

Elektriksel bir alanda çözülmüş durumdaki moleküllerin kitlelerine oranı ile hızda hareket etmeleri (ilerlemeleri) prensibine dayanmaktadır (Temizkan vd., 2008).

Bu sistemde analizi yapılacak DNA örneğinin uygun tampon kullanılarak işlem gerçekleştirilmektedir. Hafif moleküller hızlı ilerlerken, ağır olanlar daha yavaş ilerleyebilmektedir. Kuyucuklara yerleştirilen farklı DNA parçalarına ait bantları saptamak için flouresan bir boya (edityum bromür) kullanılmaktadır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra UV ışığında gözlem yapılmaktadır. Kullanılan edityum bromür elektroforez işlemimin tamalanmasının ardından çift iplikli DNA'nın baz çiftlerine bağlanır ve kırmızı flouresan yayarak DNA'nın görüntülenmesi sağlamaktadır. Jel ve edityum bromür arasındaki etkileşimler nedeniyle zeminde flouresan oluşumu sonucunda hatalı pozitif bir sonuç da oluşabilmektedir (Temizkan vd., 2008).

Elektroforez tiplerinin arasındaki temel fark destek ortamının tipi ve konumu olduğu bildirilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı (karbonhidrat, aminoasit, vs.) maddeler için selüloz jel, yüksek molekül ağırlıklı (nükleikasit, protein, vs.) maddeler için agaroz ya da poliakrilamid jel destek ortamı olarak kullanılmaktadır. Jellerin konumu dik veya yatay olarak tercih edilebilir. Nükleik asit molekülleri olan DNA ve RNA'nın saflaştırılabilmesi için en uygun yöntem yatay tipte olan agaroz jel elektroforez tekniği olduğu rapor edilmektedir (Temizkan vd., 2008).

#### **1.2.2.4. 16S rRNA ve DNA Dizi Analizi**

Bakterilerin sınıflandırılmasında 1880'lerden günümüze kadar geliştirilmiş morfolojik, metabolik, fizyolojik ve kimyasal karakterlerin belirlenmesine yönelik klasik yöntemler filogenetik ilişkiyi ortaya koymaya yeterli olmadığı bildirilmiştir. Bakterilerin farklı gruplarının tanımlanmasında sorunlar yaşanmıştır. Kimya, moleküler biyoloji ve bakteriyel taksonomi alanlarında son on yılda yaşanan gelişmeler, bakterilerin moleküler olarak teşhisi yapılmakta olup yakın akrabalarıyla olan ilişkilerini de ortaya koymaktadır. 1980'lerden bu yana erişime açık olan veri tabanlarına binlerce rDNA (rRNA) dizisi eklenmiş ve en geniş nükleotit dizisine sahip GenBank 2 818 654 adet 16S rRNA dizi bilgisine sahip olduğu bildirilmiştir (Nascimento, 2011).

Günümüzde yaygın olarak kullanılan 5S, 16S ve 23S rRNA dizileri ile bakterilerin genetik olarak teşhisi yapılmaktadır. Fakat bakterilerin 16S rRNA gen dizisi

bütün canlılarda yüksek derecede korunmuşluk gösterdiği ve türelere göre değişken olan dizileri de bünyesinde barındırdığından PZR'la bakterilerin teşhisi için primer bölgelerinin tasarlanmasında tercih edilmektedir (Martinez-Picado vd., 1994; Bader ve Shotts, 1998). Çoğaltılan bölgeler agaroz jelde ayrılarak karşılaştırılabilir ve bu bölgenin restriksiyon veya dizi (sekans) analizi, yöntemin yanı gücünde yükseltmektedir (Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Dizi analizi, bir DNA molekülünün nükleotit kompozisyonunun belirlenebilmesini sağlamaktadır. DNA dizisinin kullanılması izolatların ayrılabilmesi için en ideal yöntemlerden bir olduğu bildirilmiştir. Her izolatın tüm genomunun dizilenmesi çok pratik olmadığı için, bundan dolayı yüksek derecede korunmuşluk gösteren 16S rRNA dizileri tercih edilmektedir. GenBank veri tabanında bu diziler karşılaştırılmasıyla bakterilerin teşhisi ve filogenetik ilişkileri tanımlanabilmektedir. DNA dizilerinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntem klasik “dideoksi” veya “Sanger” yöntemi olarak bilinmektedir. Çoğu laboratuvar için bu teknik uygulanabilir durumda olmadığı bildirilmiştir (Üstek vd., 2011; Kıran ve Osmanağaoğlu, 2011).

Otomatik DNA dizileme yöntemi, floresan işaretli dideoksi nükleotitler kullanılarak zincir sonlandırma yaklaşımına dayalı Sanger dizi yaklaşımının kapiler elektroforez teknolojisiyle kombine edilip çeşitli genetik analiz çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır. Dizilecek DNA fragmanları primer adı verilen, çoğaltılması istenilen bölgeye özgü başlatıcı DNA parçacıkları yardımıyla PZR reaksiyonuyla çoğaltılmaktadır. Dizileme cihazında anot ve katot gruplar arasında uzanan kapiller, polimerle doldurulduktan sonra negatif yüklü saflaştırılmış PZR ürünü DNA örneğini elektrokinetik yöntemle çekerek pozitif yüklü anota doğru yürütülmektedir. Kapillerin anot ucuna yakın bir bölgede bulunan lazer lambasından gelen ışıkla uyarılan floresan boya'nın geri yansıttığı ışık dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen verler dizileme cihazının yazılımı ile matematiksel olarak değerlendirilerek grafiğe dönüştürülerek görüntülenmektedir. PZR reaksiyonları ve 250-800 nükleotid baz streçleri tek bir dizi reaksiyonu içinde dizilenebilmektedir. DNA dizileme filogenetik yakınlığı ve popülasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmakta, floresan tabanlı dizileme makinası daha kolay ve hızlı bir teknolojiyle çalışmakta olup, pahalı olması nedeniyle kullanımı kısıtlı olduğu bildirilmiştir (Sanger vd., 1977; Jayasankar, 1998).

*V. anguillarum*'un 16s rRNA dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen bilgiler ışığında 24 bazlık olgunükleotidler dizayn edilmiş ve radyoaktif madde ile işaretli sentetik spesifik problemler kullanılmıştır. Kullanılan problemlerin çevresel suşlar ve diğer bakteri türleri ile çapraz reaksiyon göstermediği ve yakın türlerin elenmesine olanak sağladığı bildirilmiştir (Martinez-Picado vd., 1994). Birçok kimyasal ve immünojenik yöntem balıktan bakterinin izolasyonuna ve kültürüne ihtiyaç duyulmasına rağmen, bu teknikle saf kültüre gerek olmadığı bildirilmiştir (Actis vd., 2011).

*V. harveyi* ile yakın türlerin farklı tekniklerle moleküler teşhisinin yapıldığı çalışmalarda 16S rRNA'nın *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. natriegens*, *V. rotifex* ve *V. harveyi* gibi yakın türlerden oluşan *Vibrio* grubunu ayırt ederken kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Thompson vd., 2007). 16S rRNA sekans analizleri sonucunda *V. carchariae*'nin, *V. harveyi*'nin bir sinonimi olduğu ortaya çıkmıştır (Pedersen vd., 1998). *V. harveyi* ve *V. campbellii* türleri 100den daha fazla fenotipik özellikleri ile fenotipik olarak ayırt edilmiştir. Otuz dokuz deneysel suş *V. harveyi* fenotipik olarak tanımlandı, fakat FAFLP, REP-PZR, IGS-PZR ve DNA-DNA hibridizasyon testleri ile bu türlerin aslında *V. campbellii* olduğu kanıtlanmıştır. *V. harveyi* ve *V. campbellii* genetik olarak DNA-DNA benzerlik değeri % 69 olan ilişkili türler olduğu bildirilirken, 16S rRNA benzerlik oranı ise % 97 daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Gomez-Gil vd., 2004). *V. alginolyticus* teşhisini % 99,9 benzerlik oranı ile 16S rRNA dizi analizi sonucunda yapmış olduklarını bildirmişlerdir (Liu vd., (2004). İspanya'da dil balıklarında farklı yıllarda meydana gelen hastalık vakalarında hastalık etkeni olarak izole edilen bakteriler 16S rRNA spesifik primerleri ile dizi analizi sonucuna göre *V. harveyi* teşhis edildiği rapor edilmiştir (Lopez vd., 2009).

### 1.2.3. Vibriozisin Kontrolü

Diğer bakteriyel hastalıklarda olduğu gibi kaliteli suyun kullanılması, iyi beslenme ve düşük stoklama yoğunluğu ile sağlanabilmektedir. Bunun mümkün olmadığı durumda hastalığın çıkmasının kaçınılmaz olduğu bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003). Balıklarda sağaltım amacıyla kullanılan antimikrobiyel maddeler, kemoterapötikler ve dezenfektanlar olarak gruplandırılmaktadır. Kemoterapi'nin balıklarda uygulaması oral, banyo ve enjeksiyon yöntemiyle yapılmaktadır. Bu metodlar

içinde en uygun olan oral yol olduğu bildirilmiştir. Banyo yoluyla emilen kemoterapötikler kanda etkili yoğunluğa ulaşmamaktadır. İştahsız balıklara oral yolla verilen kemoterapötik maddeler tedavi şansı azalmaktadır. Bu nedenle balıkta hastalık başlar başlamaz yüksek dozda ve semptomlar kaybolduktan 3-5 gün sonrasına kadar tedavinin sürdürülmesi gerektiği rapor edilmiştir (Çağırğan vd., 1996).

Vibriozis vakalarının tedavisinde sulfamerazin 200 mg/kg, oxytetracylin 50-75 mg/kg canlı ağırlık dozunda 10 gün süreyle kullanılmıştır. Diğer antibiyotiklerden trimethoprim 30 mg/kg, piromidic asit 10-40 mg/kg, furanace 25 mg/L ve ikame edilmiş kinolon türevi olan halquinol 75 mg/kg canlı ağırlık dozunda kullanabileceği bildirilmiştir (Bullock, 1987). Hastalık vakalarından izole edilen 132 *V. anguillarum* izolatıyla yapılan bir çalışmada, bu izolatların O/129 ve trimethoprim'e dirençli oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar R plazmitlerinin türler arasında taşınmış olabileceği şüphesini uyandırmış ise de, kesin bir sonuca ulaşamadığı ve hastalık etkenlerinin antibiyotiklere karşı direnç kazanabildiği belirtilmiştir (Austin ve Austin, 1987; Jun vd., 1999).

Potasyum dikromatın banyo yöntemiyle 1/10000 doz ve 1 saat süre ile uygulanmasında bakteriyel ve bazı paraziter enfeksiyonların elemine edildiği, böylece yaraların kapanmasını hızlandırdığı için yararlı olacağı bildirilmiştir. Çipura ve levrek yetiştiriciliği yapılan işletmelerde formalin, malahit yeşili kombinasyonu veya bakır sülfat banyoları yaygın olarak kullanılmaktadır. Formalin iritan bir maddedir ve solungaçlarda tahribat bulunan balıklar için kontrendike olduğu bildirilmiştir. Malahit yeşili ise bakterilere etkisiz olduğu, ayrıca balıkta birikim yapması nedeniyle her iki maddenin antibakteriyel olarak kullanımı uygun olmadığı rapor edilmiştir. Bakır sülfat ise alabalık ve yılan balıklarında vibriozisin patlak vermesine neden olduğu tespit edilmiştir. Balıkların kendilerine özgü bağışıklık sistemlerine sahiptirler. Su koşullarının uygun olduğu ortamlarda balık, doğal çevrede bulunan patojen mikroorganizmaları kendi bağışıklık sistemiyle yok edilebilmektedir. Ancak hastalığın fazla ilerlediği veya su koşullarının uygun olmadığı durumlarda balığa çeşitli yollarla müdahale etmek gerekmektedir. Bu problemlerin kimyasal ilaçlarla birlikte su koşullarının öncelikle düzeltilmesi ile bildirilmiştir. Ayrıca balığın hastalıklara karşı

direnci, enjeksiyon, banyo veya yemle birlikte verilen aşılar ile de artırılabilceği rapor edilmiştir (Yaman vd., 2003).

Ticari aşıların uygulanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta aşı suşunun üniversal olmadığıdır. Bu nedenle yurtdışında balığa vibriozise karşı immünize etmede kullanılan bir aşı, başka bir ülkedeki hastalık etkeni olan *Vibrio* türünün antijenik yapıları farklı olabileceği için başarılı olmayabilir. Sonuç olarak, yurtdışında kullanılan inaktif aşıların test edilmeden kullanılması sakıncalı olabilir (Çağırgan, 1993). Aşılama yöntemleriyle de vibriozis enfeksiyonlarının kontrol edildiği bildirilmiştir. Vibriozise karşı *V. anguillarum* ve *V. ordalii* ile monovalan ve bivalan aşılar başarıyla kullanılmıştır (Austin ve Austin, 1987). Balıklarda aşılar banyo, enjeksiyon, sprey, oral veya anal yolla uygulanmaktadır. Bu metotlar içerisinde oral yolla uygulama en pratik, stressiz metot olmasına karşın, meydana gelen spesifik koruyuculuk kısa süreli olduğu bildirilmiştir. Enjeksiyon ile aşılama en etkin korumayı sağlasa da uygulaması zor ve masraflı olup, balıkta strese neden olmaktadır. Günümüzde balıklarda uygulanan ticari aşıların büyük çoğunluğu banyo yoluyla yapılmakta olduğu rapor edilmiştir (Dec vd., 1990). Oral aşının uzun süre yedirilmesinin bağışıklık süresine etkisini incelemek için yapılan denemelerde, chinook salmonlara 2 mg/g yem dozunda kurutulmuş aşının 15 gün süreyle 3,9°C'den daha düşük sıcaklıktaki suda beslenen balıklara verilerek elde edilen bağışıklık, aşılama süresinin artırılmasıyla artmadığı ifade edilmiştir (Austin ve Austin, 1987). *V. anguillarum*'a karşı yapmış olduğu aşılamada kontrol grubunda % 0, oral olarak aşılı grupta % 6, immersiyon metodu ile aşılanmış grupta % 47, enjeksiyonla aşılanan grupta % 93 yaşama oranı belirlenmiştir (Horne vd., 1982). Hastalığı tedavisi esnasında kemoterapötik maddelerle birlikte balığın direncini arttırmak için vitamin komplekslerinin verilmesinin oldukça faydalı olduğu bildirilmiştir (Candan, 1991).



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Balık Numuneleri

Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Rize ve Trabzon illeri açıklarında denizdeki balık çiftliklerinde yüzer ağ kafeslerde yetiştirilen farklı boylardaki toplam 520 adet levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) balıklarında 2010-2015 yılları arasında 5 çiftlikten görülen bakteriyel hastalık vakalarından örneklemeler yapılarak hastalık etkenlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hastalığın patlak verdiği işletmelerden tipik hastalık semptomları gösteren hasta balıklardan her seferinde 10'ar adet balık incelenmek üzere Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvara canlı olarak getirilen balıkların deri ve solungaçlarından lamel yardımı ile alınan kazıntı örnekleri bir damla deniz suyu konulmuş lam üzerine kapatılarak ışık mikroskopu altında 10x ve 40x büyütme objektifleri ile parazit muaynesi yapılmıştır. Bu işlemin ardından balıkların ölmeleri beklendi, % 70'lik alkolle batırılmış pamukla dış yüzeyleri silindikten sonra bir bir ucu küt makas yardımıyla otopsi yapılarak iç organlara zarar verilmeden açılmış ve yapısı incelenmiştir. Tipik hastalık belirtileri gösteren balıkların dış ve iç semptomları kayıt edilmiştir.

#### 2.1.2. Bakterilerin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Fakültemiz hastalıklar laboratuvarına Karadeniz'de kültürü yapılan levrek çiftliklerinden getirilen hastalıklı balıkların tipik hastalık semptomu gösterenlerden ve vibriosis şüpheli balıklardan ekim yapılacak besi yerleri belirlenmiştir. Önceden hazırlanıp otoklavda steril edilmiş ve +4°C'de tutulan % 1,5 NaCl (tuz) ilave edilmiş tuzlu triptik soy agar (T-TSA) ve tuzlu triptik soy brothlar (T-TSB) tercih edilmiştir. Ayrıca vibriolar için selektif bir besi yeri olan thiosulphate citrate bile salts sucrose agara (TCBS) günlük olarak hazırlanarak kullanılmıştır. Tipik hastalık semptom gösteren balıkların böbrek, dalak ve karaciğer gibi iç organları kor haline getirilmiş pastör pipeti yardımı ile dağlanmış ve steril öze yardımıyla iç organların dağlanmış bölgesinden alınan örnekler T-TSA, T-TSB ve TCBS agarlara sürmek suretiyle primer

ekim hatları oluşturulmuştur. Katı besiyerlerin kenarları parafilmle kapatılarak 20±1°C de 48 saat soğutmalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Tipik vibriosis vakalarından izole edilen saf bakterilerin biyokimyasal testleri ve antibiyotik testleri yapılarına kadar T-TSB’de üretilip % 15-20 gliserol içeren 1,5 ml’lik ependorf tüplerde -80°C’de derin dondurucuda stoklanmıştır.

Bu çalışmada, Fakültemiz Hastalık laboratuvarına getirilen tipik hastalık belirtileri gösteren balıklardan izole edilen bakteri izolatlarına ait bilgiler Tablo 4’de verilmiştir.

**Tablo 4.** Hastalıklı levreklerden izole edilen *Vibrio* sp. suşlarına ait genel bilgiler.

<b>Suş No</b>	<b>Çiftliğin lokalizasyonu</b>	<b>İzolasyon organı</b>	<b>İzolasyon Tarihi</b>
<b>LV01</b>	Rize/İyidere	Böbrek	20.07.2010
<b>LV02</b>	Rize/İyidere	Böbrek	20.07. 2010
<b>LV03</b>	Rize/Ardeşen	Böbrek	28.03. 2012
<b>LV04</b>	Rize/Ardeşen	Böbrek	28.03. 2012
<b>LV05</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	31.05. 2012
<b>LV06</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	31.05. 2012
<b>LV07</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	03.06. 2012
<b>LV08</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	05.09. 2012
<b>LV09</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	05.09. 2012
<b>LV10</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	05.09. 2012
<b>LV11</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	05.09. 2012
<b>LV12</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	05.09. 2012
<b>LV13</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	08.09. 2012
<b>LV14</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV15</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV16</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV17</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV18</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV19</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV20</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV21</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012
<b>LV22</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	10.11. 2012

**Tablo 4. (Devamı)**

<b>Suş No</b>	<b>Çiftliğin lokalizasyonu</b>	<b>İzolasyon Organı</b>	<b>İzolasyon Tarihi</b>
<b>LV23</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	25.09. 2012
<b>LV24</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	25.09. 2012
<b>LV25</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	25.09. 2012
<b>LV26</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	21.11. 2012
<b>LV27</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	27.06. 2013
<b>LV28</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	27.06. 2013
<b>LV29</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	07.07. 2013
<b>LV30</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	07.07. 2013
<b>LV31</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	17.08. 2013
<b>LV32</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	17.08. 2013
<b>LV33</b>	Trabzon/omega	Böbrek	07.06. 2014
<b>LV34</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	07.06. 2014
<b>LV35</b>	Trabzon/omega	Böbrek	10.08. 2014
<b>LV36</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	10.08. 2014
<b>LV37</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	28.09. 2014
<b>LV38</b>	Trabzon/Yomra	Böbrek	28.09. 2014
<b>LV39</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	25.05. 2015
<b>LV40</b>	Trabzon/Arsin	Dalak	25.05. 2015
<b>LV41</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	25.05. 2015
<b>LV42</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	25.05. 2015
<b>LV43</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	25.06. 2015
<b>LV44</b>	Trabzon/Darıca	Dalak	25.06. 2015
<b>LV45</b>	Trabzon/Darıca	Karaciğer	25.06. 2015
<b>LV46</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	23.07. 2015
<b>LV47</b>	Trabzon/Arsin	Dalak	23.07. 2015
<b>LV48</b>	Trabzon/Arsin	Karaciğer	23.07. 2015
<b>LV49</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	23.07. 2015
<b>LV50</b>	Trabzon/Darıca	Böbrek	23.07. 2015
<b>LV51</b>	Trabzon/Arsin	Böbrek	08.08. 2015
<b>LV52</b>	Trabzon/Darıca	Dalak	08.08. 2015

İç organlardan (böbrek, dalak ve karaciğer), deri ve solungaç ülserlerinden aseptik olarak alınan doku parçaları lam üzerinde tuşe preparatlar hazırlanarak gram boyama yöntemiyle boyandıktan sonra bakteriyoskopisi yapılmıştır. Ayrıca bakterilerde hareket muayenesi yapmak için lam üzerinde alınan bir damla % 0,85'lik fizyolojik tuzlu su ile iç organlardan öze yardımıyla alınan örneklerin süspansiyonları hazırlanarak ışık mikroskobunda 40x büyütmele objektifte kontrol edilmiş ve bu preparatlar havada kurutulup alevde tespit edildikten sonra Gram boyama yöntemi ile boyanmış ve sonuçlar kayıt edilmiştir.

## **2.2. Besiyerleri**

### **2.2.1. İzolasyon Besiyerleri**

Bakterilerin primer izolasyonlarını gerçekleştirmek için kullanılan besi yerleri ve hazırlanışlarına ait bilgiler aşağıda verilmiştir. Tuzlu suda kültürü yapılan balıklarda görülen hastalıkların doğru teşhisini yapabilmek için hastalık etken olan mikroorganizmaların izolasyonu şarttır. Bu bağlamda, hastalıklı levrek balıklarındaki hastalık etkeni olan vibrioların primer izolasyonları ve identifikasyon testleri için tuza gereksinim duymaktadırlar. Bu amaçla, çalışmada kullanılan besiyerlerine medikal amaçlı kullanılan tuz (mikrobiyolojik sodyum klorür, Merck) ilave edilerek hazırlanmıştır.

Besiyerlerin hazırlanmasında kullanılan saf su, balık hastalıkları laboratuvarındaki şebeke suyunun saf su cihazından (Şimşek labroteknik) geçirilmesi ile elde edilmiştir. Besiyerlerin hazırlanmasında 0,0001 mg hassasiyette tartım yapabilen Precisa XB 220A model hassas terazi, pH'sını ayarlama Hanna 221 model ve Orion 230A tipi pH metreler, besiyerini içinde hazırlandığı erlenmayerler (100 ve 250 ml) ve 100 ml mezür (İsolab) kullanılmıştır. Tek kullanımlık steril plastik petri kutuları katı besiyeri, burgu kapaklı 10 cm (10 ml) ve 16 cm (20 ml) boyundaki tüpler sıvı besi ortamları hazırlamak için kullanılmıştır. Besiyerlerinin ve diğer ekipmanın sterilizasyonunda diktip otovlav (Trans Medikal Aletler Sanayi ve Ticaret A.Ş) kullanılmıştır. Bazı biyokimyasal testlerin yapılabilmesi için hazırlanan besiyerleri universal 10 ml ve 20 ml sarı renkli burgu kapaklı cam şişeler kullanılmıştır.

### 2.2.1.1. Tryptic Soy Broth (TSB, Merck)

Tryptic soy broth	30 gr
Distile su	1000 ml

Deniz balıklarından izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gereksinim duyduklarından dolayı 100 ml'ye 1,5 gr sodyum klorür (NaCl = tuz) ilave edilmiştir. Çalkalanarak homojen hale getirilen besiyerinin pH'sı  $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlanıp otomatik pipet yardımıyla 2 ml olacak şekilde tüplere aktarıldıktan sonra 121°C'de 1 atmosfer basıncında 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. TSB kullanılana kadar 1 ay süresince +4°C'de buzdolabında tutulmuştur.

### 2.2.1.2. Tryptic Soy Agar (TSA, Merck)

Tryptic soy agar	40 gr
Distile su	1000 ml

Deniz balıklarından izole edilen vibriolar için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml hazırlanan besiyerine 1,5 gr tuz ilave edilerek kaynatılarak çözülüp homojen hale getirildikten sonra 45-50°C'ye kadar soğutulan besi yerinin pH'sı  $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Besi yeri 121°C'de 1 atmosfer basıncında 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Besi yeri otoklavlandan çıkarılıp 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril plastik petrilere yaklaşık 10 ml olacak şekilde dökülmüştür. Besiyerleri katılaştıktan sonra üzerine ismi ve hazırlanma tarihi yazıldı. TSA kullanılmak üzere 1 ay süresince +4°C'de buzdolabında stoklanmıştır.

### 2.2.1.3. Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS, Merck) Agar

Thiosulphate citrate bile salts sucrose agar	88 gr
Distile su	1000 ml

Vibriolar için selektif besiyeri olan TCBS agardan 8,8 gr hassas terazide tartılarak 100 ml saf suya ilave edilmiştir. Alevde kaynatılarak çözülmüştür. Besiyeri

45-50°C'ye soğutulup pH'sı  $8,6\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra otoklavlanmadan steril tek kullanımlık plastik petrilere hızlıca dökülmüştür. Katılaştıktan sonra petrilere üzerine besiyerinin ismi ve hazırlanma tarihi yazıldıktan sonra kullanılmak üzere 1 ay süresince +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

#### **2.2.1.4. Mueller Hinton Agar (MHA, Meck)**

Mueller hinton agar	34 gr
Distile su	1000 ml

Vibriolar için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz ilave edilerek kaynatılarak hazırlanan besiyerinin pH'sı  $7,3\pm 0,2$ 'ye ayarlanıp otoklavlanıldıktan sonra 45-50°C'ye kadar soğutulup steril plastik petrilere dökülmüştür. Katılaştıktan sonra petrilere üzerine gerekli bilgiler yazıldıktan sonra kullanılmak üzere 1 ay süresince +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

#### **2.2.1.5. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)**

NaCl	0,85 gr
Distile su	100 ml

Medikal olarak satın alınan mikrobiyolojik sodyum klorür (tuz) hassas terazide tartıldıktan sonra karışımın erimesi için iyice çalkalanarak homojen hale getirip pH'sı  $7,3\pm 0,2$ 'ye ayarlanıp 5 ml'lik otomatik pipet yardımıyla tüplere 2 ml ilave edilerek bölündükten sonra 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Hazırlanan bu FTS'ler Mueller Hinton agarda antibiyogram testinin yapılabilmesi için bakteri yoğunluğunun McFarland 0,5 göre ayarlanması amacıyla kullanılmıştır.

#### **2.2.2. İdentifikasyon Besiyerleri**

Bakterilerin identifikasyonu (tanımlanması) için kullanılan besiyerleri aşağıda bildirilen şekillerde hazırlanmıştır. Deniz balıklarından izole edilen bakteriler (vibrio)

tuza gereksinim duydukları için identifikasyon testlerinde kullanılan besiyerlerine medikal amaçlı kullanılan sodyum klorür (NaCl=tuz) her bir besiyerine % 1,5 oranında ilave edilerek hazırlanmıştır.

#### **2.2.2.1. Triple Sugar İron (TSI, Merck) Agar**

Triple sugar iron agar	65 gr
Distile su	1000 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz ilave edilerek kaynatılarak hazırlanan besiyerinin pH'sı  $7,4\pm 0,2$ 'ye ayarlanıp, 10 ml olacak şekilde otomatik pipetle tüplere ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan tüpler yarı yatık olacak şekilde bir eğim verilerek donması sağlanmıştır. Katılaştıran tüplerin üzerine gerekli bilgiler yazıldıktan sonra kullanılmak üzere 1 ay süresince  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabına kaldırılmıştır.

#### **2.2.2.2. Eskülin Agar (Biolab)**

Eskülin agar	35 gr
Distile su	1000 ml

Vibriolar için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz ilave edilerek kaynatılarak hazırlanan besiyeri  $47-50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulup pH'sı  $7,2\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra otomatik pipetle tüplere 5 ml olacak şekilde bölündükten sonra  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınc altında 20 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklavdan çıkartılan tüpler yarı yatık olacak şekilde bir eğimle katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaştıran besiyerlerin üzerine gerekli bilgiler yazılmış ve kullanılmak üzere 1 ay süresince  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklanmıştır.

#### **3.1.2.3. Simmon Sitrat Agar (HIMEDIA)**

Simon sitrat agar	24,28 gr
Distile su	1000 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakterileri için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz ilave edilerek kaynatılarak hazırlanan besiyeri soğutulup pH'sı  $7,4\pm 0,2$ 'ye ayarlanıp otomatik pipetle burgu kapklı tüplere 10 ml olacak şekilde ilave edildikten sonra otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınç altında 20 dk steril edilmiştir. Otoklavdan sonra yarı yatık olacak şekilde bir eğimle katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaşan besiyerleri kullanılmak üzere en fazla 1 ay süresince  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında tutulmuştur.

#### **2.2.2.4. MR-VP Medium (HIMEDIA)**

MR-VP medium	17 gr
Distile su	1000 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz ilave edilmiştir. Erlen çalkalanarak homojen hale getirilen besiyerinin pH'sı  $6,9\pm 0,2$ 'ye ayarlanıp otomatik pipetle burgu kapklı tüplere 10 ml ilave edilmiştir. Tüpler otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınç altında 20 dk steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besiyerleri kullanılmak üzere 1 ay süresince  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabına kaldırılmıştır.

#### **2.2.2.5. Üre Agar Base (HIMEDIA)**

Üre agar base	2,5 gr
Distile su	95 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz, üre agar base ve distile su'ya oluşturulan karışım kaynatılıp  $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra pH'sı  $6,8\pm 0,2$ 'ye ph metre yardımıyla ayarlanmış ve otoklavda  $115^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dk steril edilmiştir. Erlendeki besiyeri  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride soğutulduktan sonra laminar flow (üfler) kabinde steril % 40'luk üre çözeltisinden 5 ml ilave edilmiştir. Çalkalanarak homojen hale getirilen besiyeri steril uç takılı 5 ml'lik otomatik pipete önceden otoklavda steril edilmiş tüplere 10 ml aktarılmıştır. Hazırlanan tüpler yarı yatık olacak şekilde bir eğimle katılaşmaya



bırakılmıştır. Katılaşan besiyerleri üzerine gerekli bilgiler yazıldıktan sonra kullanılmak üzere 1 ay süresince +4°C’de buzdolabında tutulmuştur.

#### 2.2.2.6. Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri

Jelatin	12/14 gr
Beef extract	1 gr
Pepton	1 gr
Distile su	100 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml saf su ile hazırlanan besi yerine 1,5 gr tuz ilave edilmiştir. Besiyerine çalışmanın yapıldığı döneme göre yaz aylarında 14 gr, kış aylarında 12 gr jelatin katılarak besiyeri kaynatılmış ve 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra pH’sı 7,2±0,2’ye ayarlanmıştır. Besiyeri 5 ml otomatik pipetle burgu kapaklı 20 ml şişelere 10 ml olacak şekilde bölünmüş ve 121°C’de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dk steril edilmiştir. Biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere 1 ay +4°C’de buzdolabında tutulmuştur.

#### 2.2.2.7. İndol Besiyeri

Pepton	1 gr
Distile su	100 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı erlenmayerdeki 100 ml saf suya 1,5 gr tuz ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen erlendeki pepton ve tuz manyetik bar yardımıyla karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Besiyerin pH’sı pH metre yardımıyla 7,2±0,2’ye ayarlanmıştır. Besiyeri 5 ml’lik otomatik pipet ile 10 adet burgu kapaklı tüpe 5 ml olacak şekilde bölünmüştür. Otoklavda 121°C’de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dkda steril edilmiştir. Besiyeri otoklavdan çıkartılıp oda sıcaklığında soğutulmuş ve +4°C’deki buzdolabında biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere 1 ay tutulmuştur.

### 2.2.2.8. Nitrat Besiyeri

Beef extract	0,3 gr
Pepton	0,6 gr
KNO <sub>3</sub>	0,1 gr
Distile su	100 ml

Hassas terazide tartılan besiyeri bileşenlerine % 1,5 tuz ilave edildikten sonra içinde manyetik bar bulunan 250 ml'lik erlen manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş ve manyetik bar yardımı ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Besiyerin pH'sını  $7,0\pm 0,2$ 'ye ayarladıktan sonra 5 ml otomatik pipet ile 10 ml olacak şekilde burgu kapaklı tüplere ilave edilmiştir. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınç altında 15-20 dk steril edilmiştir. Besiyeri biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabında 1 ay süresince tutulmuştur.

### 2.2.2.9. O/F Basal Medium (HIMEDIA)

O/F Basal medium	0,94 gr
Distile su	90 ml

Tuzlu ortamdan izole edilen bakteriler için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz, O/F basal medium ve distile suya ilave edilmiştir. Isıtıcı manyetik karıştırıcıda manyetik bar yardımı ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Besiyeri  $47-50^{\circ}\text{C}$  soğutulduktan sonra pH'sı  $6,8\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınç altında 15-20 dk steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılıp  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra önceden  $0,22\ \mu\text{m}$  enjektöre takılabilen membran filtreden geçirilen % 10 glikozdan 10 ml besiyerine flow (üfler) kabin altında ilave edilmiştir. Besiyeri çalkalanarak homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan O/F besiyeri hızlıca katılaşmadan önceden steril edilmiş 10 ml'lik tüplere 5 ml olacak şekilde steril uçlu otomatik pipet yardımıyla otoklavda bölünmüştür. Her hangi bir kontaminasyon riskine karşılık bir gece üfler kabinin içinde tutulmuştur. Herhangi bir kontaminasyon olmadığı belirlenen besiyerleri biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabında 1 ay süresince stoklanmıştır.

#### **2.2.2.10. L-Arjinine (HIMEDIA)**

Decarboxylase broth base	1,05 gr
L-Arjinine	1 gr
Distile su	100 ml

Vibriolar için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml olarak hazırlanan besi yerine 1,5 gr tuz ilave edilmiştir. Hassas terazide tartılan kimyasal maddeler 100 ml erlende manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş ve manyetik bar yardımı ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Besiyerinin pH'sı  $6,0\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Besiyeri 5 ml otomatik pipet yardımı ile 5 ml'lik burgu kapaklı şişelere 2,5 ml miktarında ilave edilmiştir. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dk steril edilmiştir. Besiyeri biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki 1 ay süresince stoklanmıştır.

#### **2.2.2.11. L-Lysine Hydrochloride (HIMEDIA)**

Decarboxylase broth base	1,05 gr
L-Lysine hydrochloride	1 gr
Distile su	100 ml

Vibrioların üremesi için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml olarak hazırlanan besi yerine 1,5 gr tuz ilave edilmiştir. Besiyeri çalkalanarak homojen hale getirilmiş ve pH'sı  $6,0\pm 0,2$ 'ye ayarlanıp otomatik pipetle şişelere 2,5 ml olacak şekilde bölünmüştür. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dk steril edilmiştir. Besiyeri identifikasyon testlerinde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki en fazla 1 ay süresince tutulmuştur.

#### **2.2.2.12. L-Ornithine Monohydrochloride (HIMEDIA)**

Decarboxylase broth base	1,05 gr
L-Ornithine monohydrochloride	1 gr
Distile su	100 ml

Vibrioların üremesi için tuzlu bir ortam gerektiğinden dolayı 100 ml'ye 1,5 gr tuz ilave edilmiştir. Besiyeri çalkalanarak homojen hale getirildikten sonra pH'sı  $6,0\pm 0,2$ 'ye ayarlanmış ve otomatik pipetle şişelere 2,5 ml olacak şekilde bölünmüştür. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dk steril edilmiştir. Besiyeri biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki 1 ay süresince stoklanmıştır.

#### **2.2.2.13. % 0 NaCl Besiyeri**

Pepton	1 gr
Deistile su	100ml

Hazırlanan besiyeri çalkalanarak homojen hale getirildi ve pH'sı  $7,2\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 5 ml'lik otomatik pipet yardımıyla tüplere 2 ml olacak şekilde bölünmüştür. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dk steril edilmiştir. Besiyeri biyokimyasal testlerde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki en fazla 1 ay süresince stoklanmıştır.

#### **2.2.2.14. %7 NaCl Besiyeri**

NaCl	7 gr
Pepton	1 gr
Distile su	100 ml

Hazırlanan besiyeri manyetik karıştırıcı üzerinde bar yardımı ile homojen hale getirilmiş ve pH'sı  $7,2\pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 5 ml'lik otomatik pipet ile tüplere 2 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basınc altında 15-20 dk steril edilmiştir. Besiyerleri testlerde kullanılmak üzere  $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki en fazla 1 ay süresince tutulmuştur.

Bazı biyokimyasal testlerde özel besi vasatlarına ekilen bakterilerin oluşturduğu reaksiyonların belirlenmesi için çeşitli kimyasal maddelerden hazırlanmış ayıraçlar kullanılmaktadır. Bunlarda aşağıda bildirildiği gibi hazırlanılmaktadır.

### 2.2.3. Ayraçlar

**Kovacs ayraçı:** İndol besiyerine bakteri ekiminden sonra üremenin ikinci gününde tüplerin her birine 0,5 ml kovacs ayıracı (HIMEDIA) ilave edilerek oluşan reaksiyon sonucuna bakılır. Eğer tüpün üst kısmında pembe (kırmızı/mor) bir renk halkası oluşursa bakteri besiyerinde bulunan triptofan'ı indole dönüştürebildiği için reaksiyon pozitif olarak kabul edilir. Eğer iki dakika içerisinde kırmızı/mor renk yerine açık sarı halka gölenir ise test negatif olarak değerlendirilir.

**Metil Red (MR) ayraçı:** Besiyerinde bulunan glikozun bakteriler tarafından fermentatif metabolize olması sonucu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. MR-VP besiyerine bakteri ekiminden sonra üremenin ikinci gününde her tüpten ayrı ayrı olacak şekilde 1 ml boş tüplere bölünür ve her birinin üzerine 6-7 damla metil red ayıracı eklenir. Kırmızı renk oluşursa reaksiyon pozitif olarak değerlendirilir.

**Voges Proskauer (VP) ayraçı:** Bazı mikroorganizmaların glikozu fermente ederek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır. MR-VP besiyerine bakteri ekiminden sonra üremenin ikinci gününde MR için alınan 1 ml'nin dışında tüpte kalan kısım için her birine önce 0,6 ml VP ayraçı (% 5 alfa-naftol solüsyonu) sonrasında 0,2 ml KOH (% 40'lük KOH çözeltisi) ilave edilir. Tüpler iyice çalkalanır ve 15-20 dk sonunda kırmızı halka oluşursa reaksiyon pozitif olarak kabul edilir.

**Nitrat ayraçı:** Mikroorganizmaların nitratları redükte edebilme yeteneğini belirlemede kullanılır. Nitrat besiyerine bakteri ekiminden sonra üremenin ikinci gününde her bir tüpe Nitrat-A'dan (alfa naftilamin % 0.5) ve Nitrat-B'den (sulfanilik asit % 0.8) ard arda her bir tüpe 0,5 ml otomatik pipet yardımıyla ilave edilir. Eğer besiyerindeki nitrat, bakteriler tarafından nitrite indirgense oluşan pembe-kırmızı renk pozitif reaksiyon olarak kabul edilir.

**Katalaz ayraçı:** Temiz bir lam üzerine % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu damlatılır. Saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril pasteur pipeti yardımıyla alınan bakteri lam

üzerinde bulunan ayraça temas ettirilip karıştırılma esnasında beya köpük şeklinde oksijen gazı çıkışı gözlemleniyorsa reaksiyon pozitif olarak kabul edilir.

**Oksidaz ayracı:** Kurutma kağıdına damlatılan oksidaz ayracı (bioMerieux) üzerine besiyerinde saf olarak üreyen bakterileri kolonilerinden steril pasteur pipeti yardımıyla sürülerek 5-10 saniye içinde oluşan renk değişimine göre karar verilir. Eğer test sonucunda mor renk oluşur ise oksidaz testi pozitif olarak kabul edilir, bu süre zarfında renk değişimi yoksa test negatiftir. Eğer mor bir renk 10-15 saniyeden sonra oluşur ise pozitif olarak değerlendirilmez.

#### **2.2.4. API 20E Strip Testi**

Tuzlu besiyerlerinde saf olarak üremiş olan vibrioların API 20E hızlı test kitlerindeki besiyeri içeren kuyucuklarda üretilebilmesi için % 1.5 NaCl tuzlu ortama ihtiyaç vardır. Bu amaçla % 1,5 tuzlu suda bakteri yoğunluğunu ayarlamak ve test kitindeki kuyucuklardaki besi ortamlarını sulandırmak için kullandığımız tuzlu ortamın hazırlanışı aşağıda bildirilmiştir.

##### **2.2.4.1. % 1.5 NaCl**

NaCl	1,5 gr
Distile su	100 ml

Karışımı çalkalayarak homojen hale getirip pH'sını  $7,3\pm 0,2$ 'ye ayarlayıp otomatik pipetle burgu kapaklı tüplere 5 ml olacak şekilde bölünmüştür. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1 atmosfer basıncı altında 15-20 dk steril edilmiştir.

#### **2.2.5. İdentifikasyon Testleri**

Fakültemiz Balık Hastalıkları Laboratuvarına gönderilen tipik vibriosis semptomları gösteren hastalıklı levrek balıklarından izole edilen ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de stoklanmış bakteri izolatları derin dondurucudan çıkarılmıştır. Stok izolatlar tam çözündürülmeden bakteriler suşlarını canlandırmak için T-TSB'ye steril bir şekilde ekilmiş ve  $25^{\circ}\text{C}$ 'de

inkübasyona bırakılmıştır. T-TSB’de üreyen bakterilerin saflık kontrolleri için T-TSA’ya ekilmiştir. Kontaminasyondan şüphe edilen suşlar saflaştırılmıştır. Saf olduğuna inanılan bakteriler TCBS agara ekilmiş ve 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

Hastalıklı levrek balıkların böbrek, dalak ve karaciğer gibi iç organlardan izole edilen ve saflaştırılan suşlardan yeni stok için % 15-20 gliserol içeren ependorf tüplerde homojen hale getirilerek -80 C’de derin dondurucuda tekrar stoklanmıştır. Ayrıca saflaştırılan ve TCBS agarda üreyen vibrio olduğu düşünülen bakterilerin biyokimyasal testleri yapılmak üzere canlı tutulmuştur. Bu amaçla, bakteri suşları belirli sürelerde pasajlanarak canlı kalması sağlanmıştır.

Bakteri izolatların saflığını, morfolojik karakterleri ve Gram boyama testlerin yapılabilmesi için % 1,5 tuz ilave edilmiş T-TSA besiyerlerine ekilerek gerçekleştirilmiştir. Bu besiyerleri 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. T-TSA’da üreyen izolatların saflığına, koloni yapısına, koloni büyüklüğüne ve rengine bakılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. Saf olarak üremeyenler vibrio izolatları T-TSA’ya tekrar ekilerek saflaştırılana kadar bu işlemler birkaç kez tekrarlanmıştır. Bazen saflaştırma işlemleri için T-TSA’dan T-TSB’ ekilen bakteriler vibriolar için selektif besiyeri olan TCBS agarda saflaştırılmaya çalışılmıştır. Bu işlemler sonucunda saflaştırıldığına inanılan bakteri suşlarına aşağıdaki fiziksel ve biyokimyasal testler uygulanarak identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### **2.2.5.1. Hareket Testi**

İçerisine % 1,5 tuz ilave edilmiş TSA’da üreyen 24 saatlik taze kültürlerdeki saf kolonilerden hareket muayenesi mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Temiz bir lam üzerine steril öze yardımıyla bir loop steril % 0,85’lik fizyolojik tuzlu su (FTS) konulduktan sonra T-TSA’da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril öze yardımıyla alınarak lam üzerindeki FTS ile karıştırılmıştır. Işık mikroskopunda önce 4 büyütme sonra 10 ve 40 büyütme objektif yardımıyla büyütülerek incelenmiş ve sonuçları hareket pozitif veya negatif olarak kaydedilmiştir. Ayrıca aynı test T-TSB’de üretilen 18-24 saatlik besiyerlerinde yapılmıştır. T-TSB’den bir loop dolusu steril öze

yardımı ile alınan örnek temiz lam üzerine konulmuş ve ışık mikroskopunda aynı şekilde kontrol edilmiştir.

### **2.2.5.2. Gram Boyama**

Mikroorganizmaların anatomik yapısı gereği Gr (+) ve Gr (-) bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan ve lipopolisakkarit yapısının farklı miktarlarda bulundurması nedeniyle bakterileri ayırt etmek amacıyla yapılmaktadır. Gram boyama testi, T-TSA'da üreyen 24 saatlik saf kolonilerden örnek alınarak yapılmıştır. Bu amaçla; temiz bir lam üzerine steril bir öze yardımıyla bir loop steril % 0,85'lik FTS konulmuş ve T-TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril bir öze yardımıyla alınarak lam üzerindeki FTS ile karıştırılmıştır. Hazırlanan preparatlar oda sıcaklığında kurutulmuş ve kuruyan preparat alev üzerinden üç kez geçirilmek suretiyle fiske edilmiştir.

Hazırlanan preparatın soğuması beklendikten sonra üzerine sırasıyla; kristal viyole solüsyonu damlatılmış ve bir dakika bekletildikten sonra saf sudan geçirilmiştir. Hemen ardından lügol solüsyonu damlatılmış ve bir dakika bekletildikten sonra tekrar saf sudan geçirilmiştir. Daha sonra absolut alkolde dekolere edildikten sonra saf sudan geçirilmiştir. En son olarak safran solüsyonu damlatılmış ve bir dakika bekletildikten sonra saf sudan geçirilerek kurutmaya bırakılmıştır. Bu işlemde önemli olan basamaklardan biri de kimyasalların hazırlanan preparattaki örneklerin her yerine eşit olarak dağıtılmasıdır. Kuruyan örnekler ışık mikroskobu altında immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifde incelenmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Gram boyama testinde kullanılan solüsyonlar ticari bir firmadan gram boyama kiti (bioMérieux, Fransa) olarak satın alınmıştır. Gram boyama kitinde her bir şişede 250 ml kristal viyole, stabilie edilmiş iodin (lugol) solüsyonu, deklorize solüsyonu ve safraninden oluşmaktadır.

### **2.2.5.3. Oksidaz Testi**

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve intraselüler olan oksidaz enziminin (sitokrom-C-oksidad) varlığını ortaya koymak için kullanılmaktadır. Bir parça beyaz filtre kâğıdı üzerine oksidaz ayracı (bioMérieux, Fransa) damlatılmıştır. Daha sonra T-



TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden steril pasteur pipeti yardımıyla bir miktar taze kültürden alınarak filtre kağıdına yayılarak test sonuçları değerlendirilmiştir. Negatif kültürlerde renk değişimi görülmezken, pozitif kültürlerde ise 5-10 sn içerisinde mavi renk oluşumu belirlenmiştir. Uygulamadan 10 sn sonra oluşan renk değişimi negatif olarak değerlendirilmiştir. Test sonucunda oluşan renk değişimleri pozitif veya negatif olarak değerlendirilip sonuçlar Tablo 8'de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.4. Katalaz Testi**

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz enzimini (Hidrojen peroksit oksidoredüktaz) saptamak amacıyla yapılmaktadır. Katalaz enzimi sahip olan bakteriler hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ), su ( $H_2O$ ) ve serbest oksijene ( $O_2$ ) ayırabilmektedirler.

Temiz bir lam üzerine bir damla % 3'lük  $H_2O_2$  damlatıldıktan sonra T-TSA'da saf olarak üreyen taze kültürdeki kolonilerinden steril pasteur pipeti yardımıyla bir miktar alınan bakteri % 3'lük  $H_2O_2$  karıştırılmıştır. Bu işlem sonucunda serbest kalan oksijen ( $O_2$  gazı) kabarcık oluşması bakterinin katalaz enzimine sahip olduğunu göstermektedir. Bu da katalaz test sonucunun pozitif olduğunu gösterirken, kabarcık oluşmaması durumu ise testin negatif olduğunu göstermiştir. Test sonuçları kabarcık oluşup oluşmamasına göre değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 8'de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.5. Triple Sugar Iron Agar (TSI) Testi**

Enterik bakterilerin tanımlanmasında kullanılan üç şekerli-demirli bir besiyeridir. Testin amacı besiyerinin birleşiminde bulunan hidrojen sülfür ( $H_2S$ ), glikoz, laktoz ve sukroz'un mikroorganizmalar tarafından kullanılıp kullanılmadığının ve glikozdan gaz ( $CO_2$ ) oluşumunun meydana gelmesini tespit etmek için yapılmaktadır.

T-TSA'da saf olarak üreyen taze bakteri kolonilerinden sivri uçlu steril bir öze yardımıyla besiyerine dibine kadar daldırıldı ve yatık kısmına yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan TSI agar  $25^\circ C$ 'de inkübasyona bırakılmış ve bir hafta süresince her gün kontrol edilmiştir. TSI agarda siyah renk oluşumu  $H_2S$  varlığını, dip kısmı sarıysa glikoz, eğik kısmı sarıysa laktoz, tamamı sararmış ise sakaroz ve eğer

besiyerinde kabarcık veya besiyerinin yukarıya doğru çıkışı gözlemlenmiş ise CO<sub>2</sub> gazından kaynaklandığı tespit edilmiş ve test sonuçları Tablo 8’de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.6. Sitrat Testi**

Bazı bakteriler karbonu enerji kaynağı olarak kullanır. Bu test bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığı, aynı zamanda bakterilerin cins ve türlerini belirlemek için yapılır. Bakteriler tarafından sitratın metabolizması, sitritaz veya sitrat demolaz adı verilen enzimleriyle gerçekleşir.

T-TSA’da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden sivri uçlu steril bir öze yardımıyla besiyerine dip kısmına kadar daldırdıktan sonra geri çekilip yatık kısmına yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan simmons sitrat agarlar 25°C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hafta boyunca her gün kontrol edilmiştir. Test sonucunda eğer besiyerinin rengi yeşilden maviye dönüşmüş veya besiyeri yüzeyinde üreme meydana gelmiş ise test sonucu pozitif, besiyerinde üreme ve renk değişimi yoksa ise test negatif olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 8’de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.7. Eskülin Testi**

T-TSA’da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden sivri uçlu steril bir öze yardımıyla besiyerine dip kısmına kadar batırıldıktan sonra öze geri çekilip eskülin agarın yatık kısmına yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan eskülin agarlar 25°C’de inkübasyona bırakılmış ve besiyeri bir hafta boyunca her gün takip edilmiştir. Test sonucunda besiyerinin rengi siyah-kahverengi ise pozitif, renk değişimi olmuyor ise negatif olarak değerlendirilmiş ve test sonuçları Tablo 8’de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.8. Jelatin Hidrolizasyon Testi**

Jelatin bir protein olup kollagenin hidrolizasyonundan elde edilmiştir. Jelatin patojenik mikroorganizmaların üremelerini genellikle artırıcı özelliğe sahip değildir. Mikroorganizmaların jelatini hidrolize eden jelatinaz enzim tarafından eski katı özelliğini kaybederek sıvı hale dönüştürme yeteneğinin ölçümünde kullanılmaktadır.

T-TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden sivri uclu steril bir öze yardımıyla besiyerine dibe daldırma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan jelatin agarlar 25°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hafta boyunca her gün kontrol edilmiştir. Test sonucunda jelatin agarın üst kısmından erime görülüyor ise test sonucu pozitif, eğer jelatin agar katı ise test sonucu negatif olarak değerlendirilmiş ve izolatlara ait test sonuçları Tablo 8'de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.9. Üreaz Testi**

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enziminin varlığını belirlemek için yapılmaktadır. Üre, karbonik asit'in bir diamid'idir. Bütün amidler de kolayca hidrolize olurlar. Ürenin hidrolizasyonu spesifik bir enzim olan üreaz tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimi bulduran bakteriler üreyi üreaz enzim sayesinde parçalayarak karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve iki molekül amonyak (NH<sub>3</sub>) meydana getirmektedirler.

T-TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden sivri uclu steril bir öze yardımıyla üre'li agarın dip kısmına kadar batırıldıktan sonra öze geri çekilip besiyerin yatık kısma yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan üre'li agarlar 25°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hafta boyunca her gün kontrol edilmiştir. Test sonucunda üre'li besiyerlerinde pembe renk pozitif, sarımsı bir renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmiştir ve suşlara ait test sonuçları Tablo 8'de kayıt edilmiştir.

#### **2.2.5.10. Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) testi**

Bazı mikroorganizmalar glikozu oksidatif karakterde metabolize edebilmektedir. Bu reaksiyonda oksijen, en son hidrojen alıcısı olarak görev yapmaktadır. Böyle reaksiyonlar aerobik koşullarda meydana gelebilmektedir (oksidasyon). Bir kısım mikroplar da glikozu oksijenin bulunmadığı durumlarda ayrıştırabilmektedir (fermantasyon). Anaerobik şartlarda oluşan bu tür reaksiyonlarda hidrojen alıcısı olarak oksijenden başka diğer maddeler kullanılmaktadır. Hugh ve Leifson bazal besiyerinde aerobik ve anaerobik şartlarda glikoz metabolizmasından asit üretiminin ölçülmesi olarak bildirilmektedir. Tüplerden sadece parafinsiz tüpte sarı renk oluşumu oksidatif,

her iki tüpte oluşan sarı renk fermentatif, sadece parafinli tüpte sarı renk oluşması anaerobik, her iki tüpte renk değişiminin olmaması glikozun metabolize olmadığını ifade etmektedir.

T-TSA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerinden sivri uclu steril bir öze yardımıyla Hugh ve Leifson (1953) bazal besiyerinin dip kısmına kadar dik olarak batırılarak her izolat için iki tüpe ekim yapılmıştır. Tüplerden bir tanesinin üzerine 1 cm kalınlığında olacak şekilde steril sıvı vazelin veya parafin dökülerek havayla teması kesilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 25°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hafta boyunca her gün takip edilmiştir. Test sonucunda besiyerinin orjinal mavi-yeşil (menekşe moru) rengi sarıya dönmesi pozitif, renk değişimi meydana gelmemesi negatif olarak değerlendirilmiş ve test sonuçları Tablo 8'de kayıt edilmiştir.

#### **2.2.5.11. Voges-Proskauer (VP) ve Metil Kırmızısı (MR)**

Voges-Proskauer (VP) testi; mikroorganizmaların glikozu fermente ederek nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetion) meydana getirme yeteneğinin tayininde kullanılmaktadır. Metil Kırmızısı (MR) testi; glikozun fermentatif metabolize olması sonucu besiyerinde organik asitlein meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılmaktadır.

T-TSA'da saf olarak üreyen taze bakteri kolonilerinden steril bir öze yardımıyla besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin ikinci günü (48 saat sonra) hem MR testi, hem de VP testi için ayrı ayrı steril tüplere steril pipet yardımı 1 ml olacak şekilde aktarıldı. MR testi için her bir tüpün içerisine 6-7 damla olacak şekilde ayraç damlatılarak çalkalandıktan sonra oluşan pembe renk pozitif, herhangi bir renk oluşumu görülüyor ise negatif olarak değerlendirilmiş ve izolatlara ait test sonuçları Tablo 8'de kaydedilmiştir.

VP testi için ayrılan her bir tüpe önce steril pipet yardımı ile 0,6 ml VP ayracından damlatıldıktan sonra üzerine 0,2 ml % 40'luk potasyum hidroksit (KOH) damlatıldıktan sonra çalkalanmıştır. Tüplerde 15-20 dk (dk) bekletildikten sonra pembe

renk oluşmuş ise pozitif, renk oluşumu görülüyor ise negatif olarak değerlendirilmiş ve izolatlarla ait test sonuçları Tablo 8’de bildirilmiştir.

#### **2.2.5.12. İndol Testi**

İndol, nitrojenli bir birleşik olup bazı bakteriler tarafından triptofanın enzimatik hidrolizasyonu sonucu meydana getirilmektedir. Bakterilerin triptofanı ayrıştırarak indol oluşturma yeteneğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

T-TSA’da saf olarak üreyen taze bakteri kolonilerinden steril öze yardımıyla besiyerine ekim yapılarak 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin ikinci günü (48 saat sonra) 0,5 ml kovacs ayracı dökülerek çalkalanıp, üst kısımda kırmızı bir halka görülmesi pozitif, halkanın görülmemesi negatif olarak değerlendirilmiş ve izolatlarla ait test sonuçları Tablo 8’de kaydedilmiştir.

#### **2.2.5.13. Nitrat Redüksiyon Testi**

T-TSA’da saf olarak üreyen taze bakteri kolonilerinden steril öze yardımıyla besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 25°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Üremenin ikinci günü (48 saat sonra) üzerine Griess- Ilosvay ayrıçalarının [ $\alpha$ -naftilamin % 0,5 (A), sulfalinik asit % 0,8 (B)] her bir besiyeri tüpününe ikisinden de ayrı ayrı olacak şekilde 0,5 ml dökülerek çalkalanmıştır. Besiyerinde birkaç dakika içinde kırmızı renk değişimi pozitif reaksiyon, eğer kırmızı renk gözlenmiyorsa negatif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Ayrıca renk değişimi olmayan tüplerin içine enzim aktivitesini hızlandırmak için çinko (Zn) ilave edilerek tekrar değerlendirilmiş ve izolatlarla ait test sonuçları Tablo 8’de verilmiştir.

#### **2.2.5.14. Dekarboksilaz (Arjinin, Ornithin, Lizin) Testi**

Bakterilerin amino asitlerdeki karboksil grubunu enzimatik olarak ayrıştırarak amin ve karbondioksit meydana getirme yeteneğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. T-TSA’da saf olarak üreyen taze bakteri kolonilerinden steril öze yardımıyla besiyerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri üzerine 1 cm olacak

şekilde sıvı vazelin ilave edilerek anaerobik bir ortam sağlanmıştır. Besiyerleri 25°C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hafta boyunca her gün kontrol edilmiştir. Test sonucunda mor renk görülüyorsa reaksiyon pozitif, eğer sarı renk gözlenirse reaksiyon negatif olarak değerlendirilmiş ve izolatlara ait tespit edilen test sonuçları Tablo 8’de verilmiştir.

#### **2.2.5.15. Tuzda (NaCl) Üreme Testi**

T-TSA’da saf olarak üreyen taze bakteri kolonilerinden steril bir öze yardımıyla her bir bakteri iolatu için % 0 ve % 7 NaCl içeren besiyerlerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 25°C’de inkübasyona bırakıldıktan sonra bir hafta boyunca her gün takip edildi. Test sonucunda besiyerinde bir bulanıklık görülüyorsa üreme pozitif, besiyerinde bulanıklık yok ise üreme negatif olarak değerlendirilmiştir. Besiyerlerinde meydana gelen normal ve şüpe üremenin doğruluğu teyit etmek için her izolata ait tüplerden TCBS agara ekim yapılarak vibrio’nun tuza toleransı belirlenmiş ve izolatlara ait test sonuçları TCBS agarada üreme durumuna göre Tablo 8’de bildirilmiştir

#### **2.2.6. Hızlı Tanı Kitleri (API 20E) Kullanılarak İdentifikasyon**

Bakterilerin identifikasyonunda hızlı tanı yöntemi olarak API 20 E test kitleri (bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. Kutusundan çıkarılan API 20 E test kitleri içerisine yerleştirilen şeffaf kutunun altta kalan kısmına saf su dökülüp nemlendirilmiş 3-4 katlı havlu kâğıt yerleştirilmiştir. API 20 E test stripleri seffaf kap içindeki nemlendirilmiş havlu kâğıt üzerine yerleştirilmiştir.

T-TSA’da saf olarak üretilen taze bakteri kolonilerden alınarak daha önceden hazırlanıp steril edilen % 1,5 NaCl içeren 5 ml tüplere ilave edildikten sonra vorteks yardımı ile bakteri yoğunluğu McFarland No: 4 bulanıklığına ayarlanmıştır. Steril uçlu otomatik pipet yardımıyla API 20 E test kitindeki kuyucukları hava kabarcığı oluşturulmadan dikkatlice prosedüre uygun bir şekilde doldurulmuştur.

Kısaca, kuyucukların alt kısmında ismi yazılı olan test kutucuk içerisine alınmış ise (CIT, VP ve GEL) hazırladığımız bakteri kültürü ile kuyucuk tamamen

doldurulmuştur. Eğer test kitinin alt kısmında ismini yazılı olan testin altı çizili ise (ADH, ODH, LDH, H<sub>2</sub>S ve URE) kuyucuğun kapalı kısmına kadar hazırlanan bakteri kültürüyle doldurulmuş ve kuyucukta boş kalan kısma besiyerinin hava almasını engellemek amacıyla steril mineral yağ 5-6 damla damlatılarak anaerobik bir ortam oluşturulmuştur. Geriye kalan kuyucukların tamamı kapalı kısmına kadar hazırladığımız bakteri kültürüyle doldurulmuştur. Test kitinin kapağını kapatılmış ve kitlerin yerleştirildiği kutunun kenar kısmına testin hangi bakteri suşuna ait olduğu stok no, testin yapıldığı tarih ve saati yazıldıktan sonra 25°C'deki soğutmalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Her bir bakteri izolatına ait kültürü için ayrı steril pipet uçları kullanılmış ve kontaminasyon riskine karşı çok dikkatli çalışılmıştır. API 20E test sonuçları inkübasyondan 24 ve 48 saat sonra meydana gelen renk değişimleri test kutusundan çıkan prospektüsteki (tarife) talimatlara göre pozitif (+) veya negatif (-) olarak sonuç şemasına kaydedilmiştir. Test kitine inokülasyon yapılmasından 48 saat geçtikten sonra renk değişimi olup olmadığı kontrol edilmiştir.

TDA testi; TDA kuyucuğuna bir damla TDA reaktifi damlatılıp sonra hemen oluşan kırmızımsı kahverengi renk pozitif, sarı renk negatif olarak değerlendirilmiş ve sonuç şemasına + veya – olarak kaydedilmiştir.

IND testi; IND kuyucuğuna bir damla JAMES reaktifi ilave edildikten sonra hemen oluşan pembe renk pozitif reaksiyon, renksiz, zayıf yeşil/sarı negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiş ve sonuç şemasına + veya – olarak kaydedilmiştir.

VP testi; VP kuyucuğuna VP1 ve VP2 reaktiflerinin her birinden bir damla eklendikten en az 10 dk beklendikten sonra pembe veya kırmızı renk pozitif, renksiz veya açık pembe renk negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiş ve sonuç şemasına artı (+) veya eksi (-) olarak kaydedilmiştir.

Ayrıca, glikoz kuyucuğu (GLU) üzerine NIT1+NIT2 ayıraçları 1'er damla damlatıldıktan sonra nitratlar nitritlere indirgenirse 2-5 dk beklemenin ardından oluşan kırmızı renk poitif (NO<sub>2</sub>) reaksiyon, nitrojenin indirgenmesine bağlı (bazen hava kabarcıkları olabilir) olarak oluşan sarı renk negatif reaksiyon olarak sonuç şemasına kaydedilmiştir. Eğer tüp glikoz kuyucuğ (GLU) üzerine 2-3 mg Zn (çinko) testine

eklendikten 5 dk sonra test sarı renk olarak kalırsa (N<sub>2</sub>) pozitif reaksiyon, testin rengi turuncu-kırmızı rene dönüşür ise reaksiyon negatif olarak kabul edilmiştir.

API 20E test kitlerine inokülasyondan 24 ve 48 saat sonra apiweb sistemindeki referans pozitif ve negatif reaksiyon sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Apiweb sistemindeki API 20E test kitlerine ait pozitif ve negatif sonuçların görünümü Şekil 1’de verilmiştir. Test edilen bakteri izolatların sonuç şemasındaki testlere ait reaksiyon sonuçları + ve – değerlere göre üçlü gruplar halinde (1, 2 ve 4 puanları) puanlandırılmış ve izolatlara ait oluşan test sonuçları apiweb sisteminden değerlendirilmeye çalışılmıştır.



Şekil 1. Api web sisteminde API 20E test kitine ait pozitif ve negatif referans sonuçları.

### 2.3. Antibiyogram Testi

Vibrio olduğu tespit edilen iolatların her biri T-TSA ekildi ve saf olarak üreyen taze kültürlerden steril bir öze yardımı ile alınan bir miktar bakteri % 0,85 NaCl içeren 2 ml’lik burgu kapaklı tüplerde McFarland No: 0,5 bulanıklığındaki yoğunluğa vorteks yardımı ile homojenize edilerek ayarlanmıştır. Bu bakteri süspansiyonu 37°C’deki etüvde 30 dk nemi alınan % 1.5 NaCl ilave edilmiş Müller Hilton agar’nın (T-MHA) üzerine döküldükten sonra petri kutusu bilek hareketi ile besiyerinin yüzey kısmının her yerine temas edecek şekilde 15-20 saniyede yayılması sağlanmıştır. İzolatlara ait bakteri süspansiyonun fazlası içerisinde dezenfektan madde bulunan bir behere boşaltılmış 48 saat süreyle bekletilmiştir. Besiyerindeki nemin hafifce kuruması beklendikten sonra antimikrobiyel diskler otomatik dispenser (Biyoanaliz) aracıyla T-MHA üzerine dağıtılmıştır. Biyoanaliz marka otomatik dağıtıcı 8 adet antibiyotik disk dağıtabildiği için eritromisin diski steril bir pens yardımıyla T-MHA’ın tam orta yerine



yerleştirilmiştir. Antibiyogram testinde sırasıyla; oksitetrasiklin (T-30 µg), oksolinik asit (OA-2 µg), sülfametoksazol (RL-25 µg), ampisilin (AM-10 µg), florfenicol (FFC-30 µg), streptomisin (S-10 µg), trimetoprim+sülfamethoksazol (SXT-25 µg), enrofloksasin (ENR-5 µg) ve eritromisin (E-15 µg) kullanılmış ve antibiyotikleri etki değerlikleri Tablo 5’de verilmiştir. Petri kutuları 25°C’de inkübasyona bırakıldıktan 18 saat sonra antibiyotik disklerin etrafında oluşan zon çapları dijital kumpas yardımı ile ölçülerek antibiyogram test sonuçları Tablo 5’de verilen standart inhibisyon zon çapı aralıkları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 5.** Antibiyogram testinde kullanılan antibiyotik disk konsantrasyonları ve ölçülen standart inhibisyon zon çapı duyarlılık aralıkları

Antimikrobiyel ajanlar	Disk Konsantrasyonu	Ölçülen standart inhibisyon zon çapı (mm)			
		D	O	H	Referanslar
Oksitetrasiklin	T-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	CLSI, 2008
Oksolinik asit	OA-2 µg	≤ 10	11-12	≥ 13	CLSI, 2004
Sülfametoksazol	SMZ 100 µg	≤ 12	13-16	≥ 17	CLSI, 2003
Ampisilin	AM-10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17	CLSI, 2003
Florfenicol	FFC-30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	CLSI, 2008
Streptomisin	S-10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15	CLSI, 2003
Enrofloksasin	ENR-5 µg	≤ 16	17-20	≥ 21	CLSI, 2008
Eritromisin	E-15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23	CLSI, 2008
Trimetoprim+Sulfamethaksazol	SXT-25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16	CLSI, 2008

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfamethoksazol, AM: Ampisillin, FFC: Florfenicol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, SXT: Trimetoprim+Sulfamethaksazol.  
D: Dirençli, O: Orta hassas, H: Hassas, R: Referans

## 2.4. Moleküler Yöntem

### 2.4.1. DNA İzolasyonu

Hastalıklı balıklardan izole edilen suşların T-TSA’da üremiş saf kolinilerden T-TSB’e ekilerek 25°C’de 18-20 saat üretilen kültürlerden 1,5 ml’lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Ependorf tüpler 9 000 devir/dk.’da (rpm) 5 dk santrifüj edilerek üst kalan süpernatant içinde dezenfektan bulunan bir şişeye dökülmüştür. T-TSB tüpünde kalan kültür dibinde kalan bakteri kültürü varsa üzerine ilave edilmiş ve tekrar 9 000 rpm’de 5

dk santrifüj edilerek sıvı kısmı (süpernatant) aynı şekilde uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bakteriler (dibe çöken pellet), Gr (-) bakterilerde DNA izolasyonu için Promega Wizard Genomik DNA İzolasyonu Prosedürü'ne göre işleme tabi tutulmuş ve prosedürdeki işlem basamakları aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır.

1. İçerisinde pellet bulunan ependorf tüplere her birine 600 µl Nuclei Lysis Solution ilave edilmiş ve pellet kısmı tamamen homojen hale getirilene kadar vortekslenmiştir.
2. Örnekler 80°C'de 15 dk thermo shaker inkübatörde bekletilmiştir.
3. Thermo shaker inkübatörden çıkarılan örnekler 2-3 dk buzda soğutulmuştur.
4. Her birinin üzerine 4 µl RNAaz ilave edilerek karıştırılmış ve 37°C'deki etüvde 30-45 dk bekletilmiştir.
5. Ependorf tüplerin her birine 200 µl Protein Precipitation Solution eklenerek, yaklaşık 25 sn vortekslenmiştir.
6. Ependorf tüplerde bulunan örnekler 6-7 dk buzda bekletilmiştir.
7. Ependorf tüplerdeki örnekler 14 000 rpm'de 4 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür.
8. Eppendorflarda bulunan sıvı kısımdan 500 µl steril ependorf tüplere alınmış ve arta kalan kısım eppendorf tüpleri ile birlikte atılmıştır.
9. Eppendorf tüplerdeki örneklerin üzerine 600 µl isopropanol alkol eklenerek ters düz edilerek içerisinde şeffaf bir yapı (DNA'nın varlığı) oluşması sağlanmıştır.
10. Örnekler, santrifüjde 14 000 rpm'de 4 dk DNA'lar dibe çöktürülmüştür.
11. Eppendorf tüplerin üst kısmında kalan süpernatant kısmı dökülmüş ve bu esnada DNA'nın düşürülmemesine özellikle dikkat edilmiştir.
12. Örneklerin üzerine 600 µl % 96'lık ethanol (soğuk) alkol ilave edilmiş ve eppendorf tüplerin iç yüzeyin her yerine değmesine özen gösterilmiştir.
13. Santrifüj yardımıyla 13 000 rpm'de 3 dk içinde ependorf tüplerdeki DNA'lar dibe çöktürülmüştür.
14. Eppendorfların üst kısmındaki süpernatant kısmı dökülmüş ve bu esnada DNA'nın düşürülmemesine özellikle dikkat edilmiştir.
15. Eppendorf tüpler 55°C'e ayarlanmış etüvde peçete kağıdı üzerine yatırılmış ve kurumaya bırakılmıştır.
16. Eppendorf tüplerdeki örneklerin içine 120 µl DNA Rehydration Solution ilave edilerek thermo shaker inkübatörde 65°C'de 1 saat bekletilmiştir.

17. bu süre sonunda thermo shakerdan alınan eppendorf tüpler buzdolabında (+4°C’de) çözülmeye bırakılmıştır.

**Not:** İzole edilen DNA bir sonraki çalışmamıza kadar -20°C’de saklanılmıştır.

#### 2.4.2. Kullanılan Pirmerler ve PZR Uygulamaları

Örneklerin izolasyonundan elde edilen total DNA’ların 16S rRNA geninin çoğaltılması için polimeraz zincir reaksiyonu’nda (PZR) tablo 6’da gerekli olan kimyasal maddeler ve konsantrasyonları tablo 6’da verilmiştir. PZR testindeki reaksiyonları gerçekleştirmek için Techne® TC-3000G (Bibby Scientific, Cambridge, İngiltere) model gradient özellikliğe sahip PZR cihazı kullanılmıştır.

**Tablo 6.** PZR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

<b>Kimyasallar</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>16S rRNA</b>
10X Go Taq Buffer		5 µl
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	4 µl
dNTP karışımı	25 mM	5 µl
Primer 1492R	10 pmol	1 µl
Primer 27F	10 pmol	1 µl
Total DNA	50 (ng/ml)	2 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	5 (U/µl)	2,5 µl
ddH <sub>2</sub> O		29,5 µl
Toplam		50 µl

Bu çalışmada bakterilere ait 16S rRNA geninin artırılması için tablo 6’daki 27F ve 1492R primerleri (LaneDJ, 1991) kullanılmıştır. Primerlerin erime sıcaklıkları (T<sub>m</sub>) önceden yapılan benzer çalışmalarda uygun bağlanma sıcaklığı 46°C olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada da aynı sıcaklığı kullanılmıştır. Bu çalışmada uygulanan PZR döngü koşulları tablo 7’de verilmiştir.

PZR’dan çıkan DNA’ların kalitesinin kontrolünü gerçekleştirmek için % 1’lik agaroz jeli hazırlanarak istenilen görüntü oluşana kadar bu işlemler tekrarlanmıştır. PZR ürünleri 100 bç’lik DNA Leader (Promega) ile yürütülerek büyüklükleri belirlenmiştir. Bütün işlemlerin basamakları tamamlandıktan sonra istenilen konsantrasyon ve büyüklükte

olduğu belirlenen PZR ürünleri, DNA dizin analizine gönderilene kadar +4°C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.

**Tablo 7.** Kullanılan primerler için uygulanan PZR döngü koşulları

<b>PZR Basamakları</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
İlk Ayrılma	94	3 dk	1
Ayrılma	94	45 sn	
Yapışma	46	1dk	36
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	5 dk	1
Bekleme	4	Sonsuz	

#### **2.4.3. DNA İzolasyonun ve PZR Ürünlerinin Agaro Jelde Kalitesinin Tayini**

DNA izolasyon yöntemiyle elde edilen genomik DNA ve PZR tekniği ile çoğaltılan gen ürünlerinin kalitesini etidyum bromür (3,5 mg/ml) içeren, genomik DNA için % 0,8'lik ve PZR ürünleri için ise % 1'lik TAE-Agaroz jeli hazırlanarak elektroforezde yürütölmüş ve jel görüntülenerek bilgisayarda incelenmiştir. PZR örneklerinin yürütöldüğü agaroz jelin görüntüsünü tespit etmek için Quantum-Capt ST4 sistem (Vilber Lourmat, France)'deki ultraviyole (UV) transillüminatörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan DNA gen ürünleri boyutlarını belirlemek amacıyla birlikte yürütöldüğü bir marker (DNA Leader) ile karşılaştırılarak büyüklükleri tespit edilmiştir.

#### **2.4.4. DNA Dizini Analizi**

Elde edilen PZR ürünlerinden kısmi 16S rRNA geninin doğrudan DNA dizini analizi 27F/1492R primerleri kullanılarak ticari bir firma olan Macrogen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'den hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. PZR ürünlerin temizlenmesini takiben DNA dizini analizleri BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) kullanılarak ABI PRISM 3730x1 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir.

#### **2.4.5. Gen Bank Taraması**

Çalışmada kullanılan 16S rRNA gen dizisi ve GenBank taramasında kullanılmak üzere uygun hale getirilmek için BioEdit versiyon 7.1.3 (Hall, 1999) yardımıyla düzenlenmiştir. Gen dizilerini çalışabilmek için BioEdit içerisinde yer alan Clustal W seçeneği kullanılmıştır. Gerek durumlarda kromotogramlar incelenerek gen dizilerinin kontrolü yapılmıştır.

Genbank taraması için NCBI sitesinin 'BLAST' seçeneği kullanılarak, düzenlenmiş gen dizileri GenBank'ın veri tabanına girilerek tarandı ve sonuçlar sistemdeki mevcut veriler ile karşılaştırılmış ve yüzde benzerlik oranları belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Balıklarda Görülen Hastalık Semptomları

Bu çalışmada, Karadenizde kültürü yapılan levrek balıklarında ilk vibriozis vakasına su sıcaklığının yükseldiği 2010 Temmuz ayında rastlanılmıştır. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi İyidere Araştırma Merkez'inde fiberglas tanklarda araştırma amaçlı stoklanmış 150 gr ağırlığındaki levreklerde ilk kez gözlenmiştir. Balıkların ticari levrek yemi ile beslendiği bildirilmiştir. Enfeksiyonun patlak verdiği su sıcaklığı 18 °C ve 25±2°C olarak ölçülmüştür. Tanklardan alınan su örnekleri Fakültemiz Su Kimyası Laboratuvarında analizi yapılmış ve su kalitesinde ölüme neden olacak herhangi bir olumsuz değişkenliğin varlığına rastlanılmamıştır. Balıkların örneklendiği çiftliklerde ölçülen su sıcaklığı 18,5-28,5°C arasında, pH 6,98 ile 7,82 aralığında ve oksijenin ise 7,25-8,45 mg/l değerleri arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

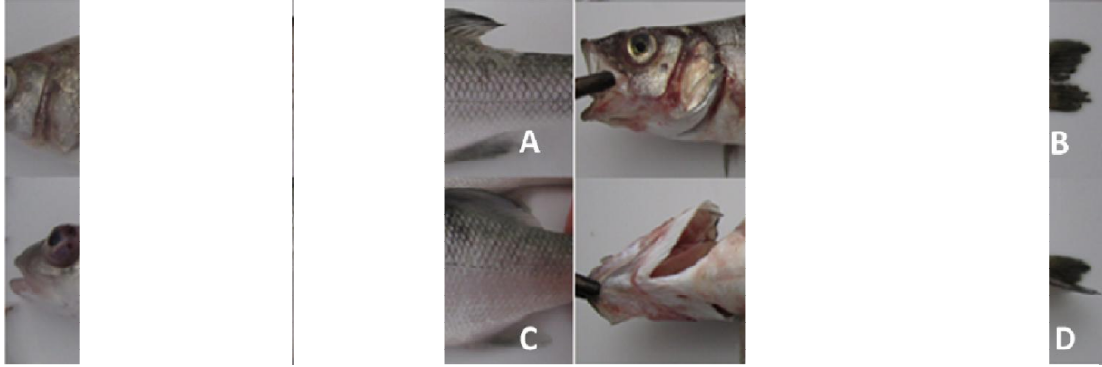
Yapılan klinik muayenelerde tipik hastalık semptomları gösteren levrek balıklarında genel bir durgunluk, hasta olan levreklerin su yüzeyinde sürüden ayrı yüdüğü, bazı balıkların renginde kararma, yem almada isteksizlik ve vücut yüzeyinde yaygın kanamaların olduğu tespit edilmiştir ve resim olarak Şekil 2'de verilmiştir.



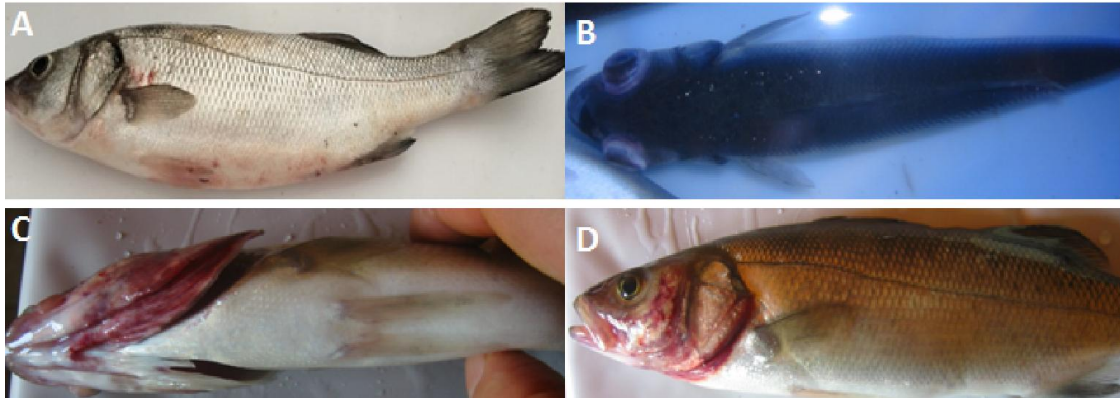
**Şekil 2.** Hastalıklı levrek balıklarında görülen vibriozis'e ait yaygın hemorajiler.

Ölen ve ölmek üzere olan levreklerin dış muayenesinde, operkulum, ağız çevresinde, gözün etrafında, ventral ve abdominal yügeçler kaidesinde yaygın hemorajiler görülürken diğer yüzgeçlerin kaidelerinde hemorajilere rastlanılmıştır. Bazı levreklerin gözünde tek ve çift taraflı exophthalmos varlığı tespit edilmiştir. Balıklarda pul dökülmesi, kuyruk ve diğer yüzgeçlerin uç kısımlarında erezyonlara rastlanırken,

deri üzerinde line lateralisin altında ve özellikle üst kısımda 0,5-1 cm capındaki ülser oluşumuna rastlanmıştır. Levreklerin bazılarında bu ülserlerin derin altındaki kas tabakasına kadar ulaşmış olduğu görülmüştür ve Şekil 3 ve 4’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.** Deride pul dökülmesi ve ülseratif lezyonlar (A), operkulum, göz çevresinde çene altında ve ventral yüzgeç kaidesinde hemorajiler (B), gözde exophthalmos (C), yügeç kaidelerinde yaygın hemorajiler (D).



**Şekil 4.** Deri üzerinde hemoraji ve karında asites (A), deride kararma ve gözde exophthalmos (B), operkulum altında (C) ve üzerinde yaygın hemoraji (D).

Tipik hastalık semptomları gösteren ve ölmek üzere olan levrek balıklarından yapılan otopside; operkulumlar bir makas yardımıyla uzaklaştırıldığında solungaç lamalarının üzerinde küçük hemorajik odaklar ve uc kısmında lamel epitelinde erozyonların varlığı görülmüştür. Hastalıklı balıkların otopsisinde midenin boş, karaciğeri solgun, dalağın büyümüş olduğu ve normal görünümünü kaybetmiş olduğu, plorik çekumların gergin, bağırsak şişkin ve sarı içerikle dolu olduğu belirlenmiştir.

Deri ve solungaçların ülserli bölgelerinden hazırlanan tuşe preparatlarda gram yöntemiyle boyandıktan sonra bakteriyoskopde immersiyon (100x) objektifi ile yapılan muayenede Gram negatif, kıvrık veya basil (düz çubuk) şeklinde bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. Böbrek, dalak ve karaciğer gibi iç organlardan hazırlanan preparatların Gram yöntemiyle boyandıktan sonra immersiyon yağı damlatılarak yapılan bakterioskopide ise mikroskop sahasında basil şeklinde uçları kıvrık ya da virgül şeklinde Gram negatif (pembe renkli) bakteriler görülmüştür.

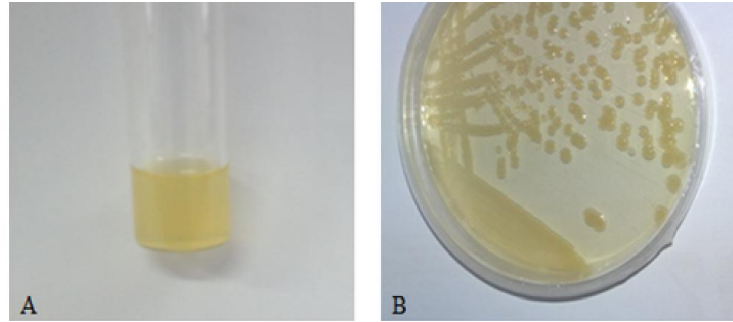
Organ tuşe preparatlarının FTS ile yapılan süspansiyonların ışık mikroskopunda natif olarak yapılan bakterioskopisinde uzun çubuk şeklinde hareketli bakterilerin varlığı belirlenmiştir. Ayrıca böbrek, dalak ve karaciğer gibi iç organlardan öze yardımıyla alınan örneklerin lam üzerinde bir damla FTS ile hazırlanan süspansiyonları ışık mikroskopunda 40x büyütme objektifte kontrol edildiğinde mikroskop sahasında basil şeklinde hareketli bakterilerin varlığı görülmüştür. Hazırlanan preparat havada kurtulup alevde tespit edildikten sonra immersiyon (100x) objektifinde Gr (-) basil şeklindeki bakterilerin varlığına rastlanılmıştır.

### **3.2. İzole edilen bakterilere ait özellikler**

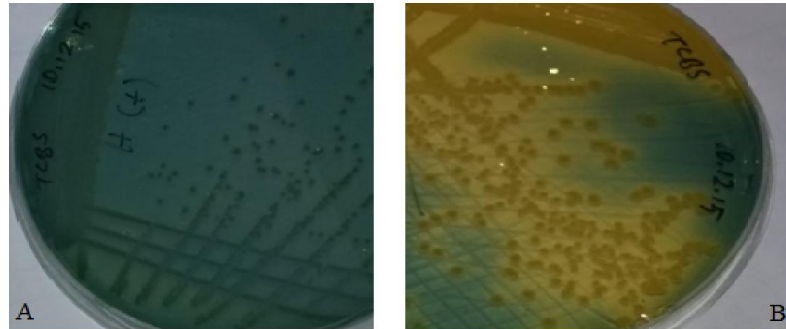
Tipik hastalık semptomları gösterenen levreklerin deri ve solungaç lamellerinden lamelle kazıntı alınmış ve bir damla FTS ile karıştırılarak hazırlanan preparatlar paraziter yönden incelenmiştir. Mikroskopik muayenede herhangi bir parazitere rastlanmadığı tespit edilmiştir. Hastalığın semptomları göz önüne alındığında hastalık etkeninin bakteriyel olabileceği düşünülmüştür. Hastalıklı balıkların böbrek, dalak ve karaciğer gibi iç organların dış yüzeyi kor haline getirilmiş pastör pipeti ile dağlandıktan sonra öze yardımı ile organlardan dağlanmış bölgeden girilerek alınan örnekler T-TSA, T-TSB ve TCBS agar'a inokülasyonlar yapılmış ve en geç 48 saat içinde besiyerinde kolonilerin varlığı gözlenmiştir. Hastalıklı levreklerin iç organlarından izole edilen bakteri suşlarına ait bilgiler Tablo 4'de verilmiştir. Ayrıca hasta levrek balıklarından izole edilen hareketli, Gr (-) özellik gösteren, oksidaz ve katalaz testleri pozitif olan *Vibrio* izolatlarına ait bazı test sonuçları aşağıda verilmiştir.



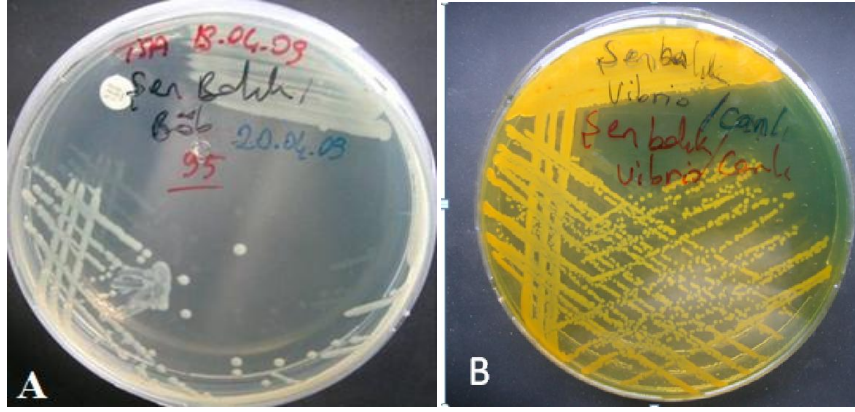
1. Stoktan açılan suşlar T-TSB'de üredikten sonraki görüntüsü Şekil 5 A'de ve T-TSA'da saf olarak üreyen krem renkli koloni oluşturan suşlar Şekil 5 B'de verilmiştir.
2. TCBS agar'a ekildi, burada sarı veya yeşil koloni oluşturanları Şekil 6'da verilmiştir.
3. T-TSA'ya ekilen ve çizim hattı üzerine 150 µg O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine) diski yerleştirilen petrilerde etrafında vibrio pozitif olanların inhibisyon zonlarının görünümü ve TCBS agarda sarı kolonilerin varlığı Şekil 7'de verilmiştir.
5. Üçlü şeker testi TSI agarda ve Simon sitrat testi Şekil 8'de verilmiştir. Üre testi ve O/F testine ait sonuçlar Şekil 9'da gösterilmiştir. Eskülin ve Jelatin kullanım testleri Şekil 10'da verilmiştir. Dekarboksilaz (Arjinin-Ornithin-Lizin) testine ait pozitif ve negatif sonuçlar Şekil 11'de gösterilmiştir.
6. MR-VP testine ait pozitif ve negatif sonuçlar Şekil 12'de verilmiştir. İndol ve Nitrat testlerine ait pozitif ve negatif sonuçlar Şekil 13'de gösterilmiştir.
7. İzolatlara yapılan API 20 E testine ayrıraçları damlatıldıktan sonraki görünümü 14'de verilmiştir.
8. Antibiyogram testi yapılarak 18 saat sonunda oluşan zon çapları dijital kumpas yardımı ile ölçülerek sonuçlar kaydedilmiş ve test sonucuna ait görüntü Şekil 15'de verilmiştir.



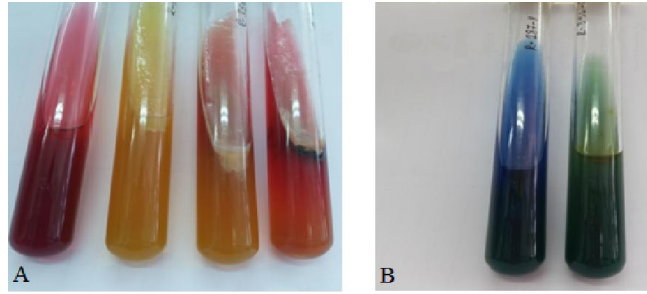
**Şekil 5.** *Vibrio* sp. izolatlarının TSB'de (A) ve TSA'da (B) üremesi.



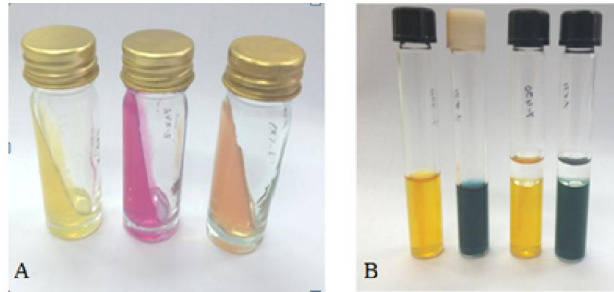
**Şekil 6.** *Vibrio* sp. izolatlarının TCBS agar'da yeşil (A) ve sarı koloni (B) oluşturmaları.



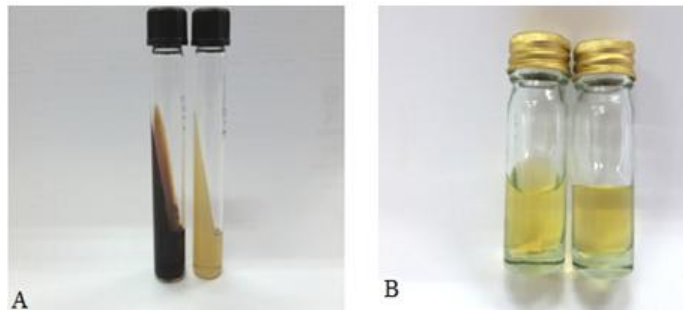
Şekil 7. *Vibrio* sp. izolatlarının TSA'da O/129 vibriostatik ajana duyarlılık testi (A) ve TCBS'de sarı kolonilerin görünümü (B).



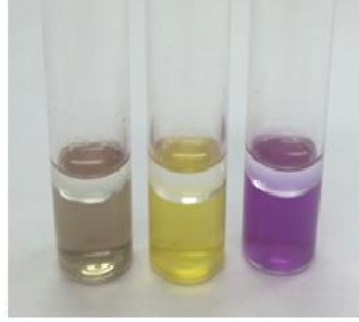
Şekil 8. *Vibrio* sp. izolatların TSI agar'da (A) ve Simon Sitrat agarda üremesi (B).



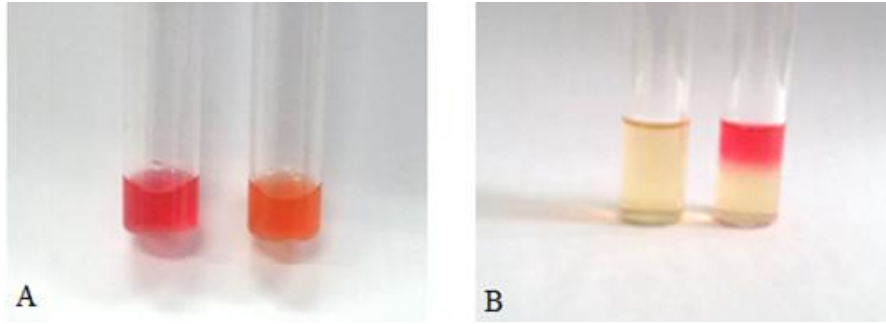
Şekil 9. *Vibrio* sp. izolatlarının üre agarda (A) ve O/F agarda üremesi (B).



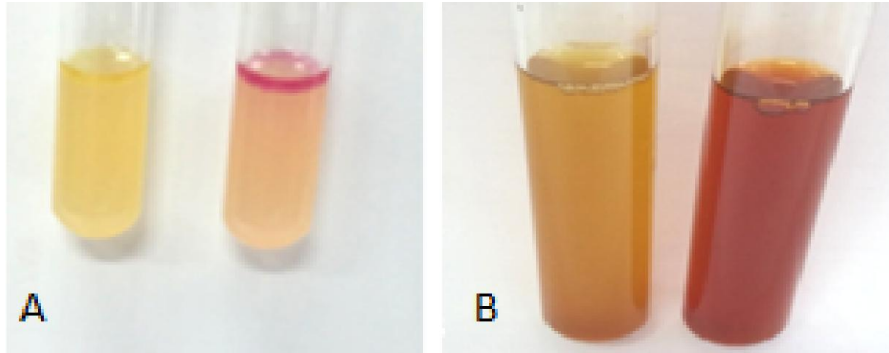
Şekil 10. *Vibrio* sp. izolatlarının eskülin agarda (A) ve jelatin agarda üremesi (B).



**Şekil 11.** *Vibrio* sp. izolatlarının dekarboksilaz (Arjinin-Ornithin-Lizin) testine ait üreme sonuçları; 1. Tüp kontrol, 2. Tüpte oluşan sarı renk negatif ve 3. Tüpte oluşan mor renk pozitifdir.



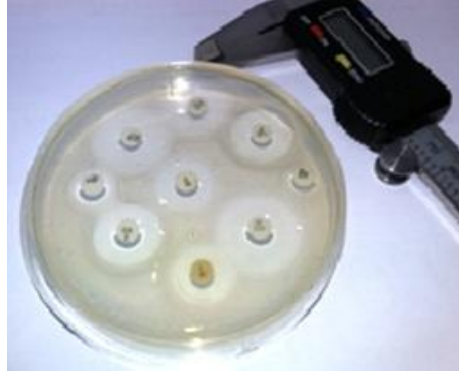
**Şekil 12.** *Vibrio* sp. izolatlarının MR test (A) ve VP test (B) sonuçları.



**Şekil 13.** *Vibrio* sp. izolatlarının indol test (A) ve nitrat test (B) sonuçları.



**Şekil 14.** *Vibrio* sp. izolatlarının API 20E test kitine ayıraçlar döküldükten sonraki sonuçları (48 saat sonra).



**Şekil 15.** Antibiyogram testinde inhibisyon zon çaplarının dijital kumpasla ölçümü.

Hastalıklı balıkların iç organlarından farklı besiyerlerine yapılan ekimlerde izole edilen bakteri suşlarından 52 adet izolatin fiziksel ve klasik biyokimyasal test sonuçlarına göre vibrio türlerinden biri olma ihtimal göz önünde tutularak çalışılmıştır. Bu çalışmada yapılan klasik test sonuçlarına ait elde edilen veriler Tablo 8’de verilmiştir.

Morfolojik ve biyokimyasal testlere göre suşların hareketli, Gr (-), kıvrık, pleomorfik basil şeklinde olduğu, katalaz ve oksidaz testlerinin pozitif olması, OF test sonuçlarına aerobik ve anaerobik olarak üreyebilmesi. Vibrioların üzerine üremeyi engelleyici vibriostatik ajana (O/129, 150 µg) duyarlılık testinin pozitif olması ile izolatınların vibrio türlerinden biri olma ihtimalinin çok yüksek bir ihtimal olabileceği düşünülmüştür. Tuza tolerans (%0 ve %7 NaCl) tolerans testinde tuz içermeyen (%0) izolatlardan dört izolat hariç negatif iken, bütün izolatlar % 7 tuz içeren besi yerlerinde ürediği tespit edilmiştir. İndol testinin biri hariç 51 izolatin pozitif olduğu belirlenmiştir. Jelatin testinde iki izolat hariç (LV09 ve LV46) diğer 50 izolatin pozitif olduğu tespit edilmiştir. TSI agarda yapılan üçlü şeker test sonuçlarına göre 6 izolatin H<sub>2</sub>S pozitif olmasına karşın 46 izolatin negatif olduğu belirlenmiştir. Bakteri izolatlarından 52 suşa yapılan üre test sonuçların görer 10 testin pozitif olduğu, fakat klasik test sonuçlarına göre 42 suşun negatif olduğu tespit edilmiştir. Toplam 52 izolattan 11’de sitrat, 35’de eskülin, 37’de nitrat, 10’da üre, 33’de MR ve 20’de VP testi pozitif iken diğerlerinin negatif olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada 52 izolata yapılan dekarboksilaz test sonuçlarına göre arjinin dekarboksilaz (ADH) tetinde 27 suşun pozitif, Lizin dekarboksilaz (LDC) testinde 26 suşun pozitif, ornithin dekarboksilaz (ODC) testinde 25 suşun pozitif sonuç vermiştir. Toplam 52 izolattan TCBS agara yapılan ekim sonrası

oluşan koloni morfolojisinde 34 suşun sarı koloni oluşturmasına karşın, 18 suşun ise yeşil koloni oluşturduğu belirlenmiştir. Bu durum ise *Vibrio parahaemolyticus* olabilme ihtimalini akla getirmiştir. Klasik yöntem ile yapılan fiziksel ve biyokimyasal testlere ait sonuçlar Tablo 8’de verilmiştir. izolattan 18 suşun yeşil koloni oluşturmasına karşın 34 izolattan ise sarı koloni oluşturduğu belirlenmiştir.

**Tablo 8.** *Vibrio* sp. suşlarının ait morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	Levrek balıklarından izole edilen vibrio suşlarına ait stok numarası																										
	LV01	LV02	LV03	LV04	LV05	LV06	LV07	LV08	LV09	LV10	LV11	LV12	LV13	LV14	LV15	LV16	LV17	LV18	LV19	LV20	LV21	LV22	LV23	LV24	LV25	LV26	
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Şekil	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
TCBS	s	Y	s	s	Y	s	s	s	s	s	s	s	s	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	s	
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F Üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	S	S	S	S	S	S	S	S	L	S	S	L	S	S	S	G	S	L	S	S	-	-	G	G	S	S	
TSI’da H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	
TSI’da Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sitrat	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Eskülin	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MR	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nitrat	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LDH	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODH	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Üre	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/129 (150µg)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
% 0 NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 7 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B: Basil, (+): Pozitif, (-): Negatif, s: Sarı, Y: Yeşil, S:Sukroz, L: Laktoz, G: Glikoz, H: Hassas, ADH: Arjinin dekarboksilaz, LDH: Lizin dekarboksilaz, ODH: Ornithin dekarboksilaz, TCBS: Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TSI: Triple Sugar Iron Agar, O/F: Oksidasyon ve/veya Fermentasyon testi.

**Tablo 8.** (Devamı).

Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	Levrek balıklarından izole edilen vibrio suşlarına ait stok numarası																									
	LV27	LV28	LV29	LV30	LV31	LV32	LV33	LV34	LV35	LV36	LV37	LV38	LV39	LV40	LV41	LV42	LV43	LV44	LV45	LV46	LV47	LV48	LV49	LV50	LV51	LV52
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Şekil	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
TCBS	s	s	s	s	s	s	s	Y	Y	Y	s	s	s	s	s	s	s	s	s	Y	s	s	s	s	s	s
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F Üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	S	S	S	S	S	G	G	S	S	S	S	S	G	S	S	G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
TSI'da H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
TSI'da Gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sitrat	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
Eskülin	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
MR	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
İndol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
LDH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ODH	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Jelatin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Üre	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
O/129 (150µg)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
% 0 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
% 7 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

B: Basil, (+): Pozitif, (-): Negatif, s: Sarı, Y: Yeşil, S: Sukroz, L: Laktoz, G: Glikoz, H: Hassas, ADH: Arjinin dekarboksilaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornithin dekarboksilaz. TCBS: Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar, TSI: Triple Sugar Iron Agar, O/F: Oksidasyon ve/veya Fermentasyon testi.

API 20E hızlı test kitine izolatların inokübasyonundan 48 saat sonra kuyucukların üzerine ayıraçlar birer damla damlatıldıktan sonra meydana gelen renk değişimleri apiweb<sup>TM</sup> sistemindeki örnek sonuçlar ile karşılaştırılarak sonuçlar api test sonuç şemasına kaydedilmiştir. İzolatlara ait API 20E test sonuçlarına ait test sonuç şemasındaki veriler üçerli gruplar halinde kodlanmıştır. İzolatlara ait kodlar apiweb<sup>TM</sup> veri tabanına girildiğinde sistemde balıklarda hastalık oluşturan *Vibrio* türlerine ait

veriler yer almadığı için kodlar genellikle *V. fluvialis* ve/veya başka bir tür olarak yanlış tanımlanıldığı belirlenmiştir. Levrek balıklarından izole edilen toplam 52 adet bakteri suşlarının tanımlanması için kullanılan API 20E hızlı test kitlerine inoküle edilerek 25°C’de 48 saat süreyle soğutmalı inkübatörde bekletildikten sonra prosedüre uygun bir şekilde damlatılan ayıraçlardan sonra oluşan reaksiyon sonuçlarına ait renk değişimleri göre değerlendirilerek sonuçlar Tablo 9’da ve Tablo 9’un devam tablosunda verilmiştir. Bu bağlamda oluşan sonuçlar;

API 20E test sonuçlara göre izolatlarla yapılan karbonhidrat testlerinden sadece glikoz testi bütün suşlarda pozitif olmasına karşın diğer şeker testleri değişiklik göstermiştir.  $\beta$ -galaktosidaz (ONPG) 29 suшта pozitif iken, arjinin (ADH) 25 suшта, lizin (LDH) 29 suшта ve ornitin (ODC) 33 suшта pozitif reaksiyon vermesine karşın diğer suşların negatif reaksiyon verdiği ve test sonuçlarına ait veriler Tablo 9’da ve devamı tablosunda verilmiştir.

Bu çalışmada toplam 52 suş kullanılarak yapılan API 20E test kiti sonuçlarına göre sitrat testi 14 suшта pozitif olmasına karşın diğer suşların negatif olduğu tespit edilmiştir. Hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) ve triptofan deamiraz TDA testlerinde sadece tek bir izolatın pozitif olmasına karşın diğer izolatlarında negatif olduğu tespit edilmiştir. Üre testi (URE) sadece iki izolatın pozitif olmasına karşın, diğer 50 suşunun ise negatif sonuc vermiş olduğu belirlenmiştir. Teste kullanılan toplam 52 suştan indol (IND) testi 49 suшта pozitif olmasına karşın sadece üç suшта negatif bir reaksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Vages-Proskauer (VP) test sonuçlarına göre 24 suşun pozitif olmasına karşın 28 suşun negatif olduğu belirlenmiştir. Jelatin (GEL) testi 52 suşun 50 suшта pozitif olmasına karşın sadece 2 suşun (LV09 ve LV46) negatif olduğu tespit edilmiştir.

API 20E kitlerindeki karbonhidrat test sonuçları irdelendiğinde, glikoz (GLU) tüm izolatlarda pozitif olmasına karşın diğer şeker test sonuçları oldukça farklılık göstermiştir. Mannitol (MAN) testi 49 suшта pozitif iken 3 suşun negatif, inostol (INO) testi üç suшта pozitif iken 49 suшта negatif, sorbitol (SOR) testi 23 suшта pozitif iken 29 suşun negatif, rhamnoz (RHA) testi 6 suшта pozitif olmasına karşın 46 suşun negatif, sakkaroz (SAC) testi 34 suшта pozitif iken 18 suшта negatif, melibioz (MEL) testi 5 suшта pozitif olmasına karşın 47 suşun negatif, amigdalin (AMY) testi 31 suшта pozitif iken 21

sušta negatif ve arabinoz (ARA) testi 20 sušta pozitif reaksiyon vermesine karşın 32 sušta test sonuçlarının negatif negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada tanımlama testleri için kullanılan API testlerindeki şeker testleri sarı renk oluşturanlar pozitif olduğu gibi kalanlar negatif olarak değerlendirilmiş ve Tablo 9’da verilmiştir.

**Tablo 9.** Levreklerden izole edilen *Vibrio* sp. suşlarının API 20E test sonuçları.

Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	<i>Vibrio</i> sp. suşlarına ait stok numarası																										
	LV01	LV02	LV03	LV04	LV05	LV06	LV07	LV08	LV09	LV10	LV11	LV12	LV13	LV14	LV15	LV16	LV17	LV18	LV19	LV20	LV21	LV22	LV23	LV24	LV25	LV26	
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR*	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MEL*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AYM*	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA*	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ONPG: β-galaktosidaz, ADH: Arjinin dihidrolaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornitin dekarboksilaz, CIT: Sitrat, H<sub>2</sub>S: Hidrojen sülfür, URE: Üre, TDA: Triptofan deamilaz, IND: İndol, VP: Voges-proskauer, GEL: Jelatin, GLU: Glikoz, MAN: Mannitol, INO: İnostol, SOR: Sorbitol, RHA: Rhamnoz, SAC: Sakkaroz, MEL: Melibioz, AYM: Amigdalın, ARA: Arabinoz, \*: Karbonhidrat, (+): Pozitif, (-): Negatif, d: Değişken, ?: Bilinmiyor.



**Tablo 9.** (Devamı).

Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	<i>Vibrio</i> sp. suşlarına ait stok numarası																									
	LV27	LV28	LV29	LV30	LV31	LV32	LV33	LV34	LV35	LV36	LV37	LV38	LV39	LV40	LV41	LV42	LV43	LV44	LV45	LV46	LV47	LV48	LV49	LV50	LV51	LV52
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CIT	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
GLU*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
INO*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR*	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
RHA*	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
SAC*	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
MEL*	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AYM*	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ARA*	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

ONPG:  $\beta$ -galaktosidaz, ADH: Arjinin dihidrolaz, LDC: Lizin dekarboksilaz, ODC: Ornitin dekarboksilaz, CIT: Sitrat, H<sub>2</sub>S: Hidrojen sülfür, URE: Üre, TDA: Triptofan deamilaz, IND: İndol, VP: Voges-proskauer, GEL: Jelatin, GLU: Glikoz, MAN: Mannitol, INO: İnostol, SOR: Sorbitol, RHA: Rhamnoz, SAC: Sakkaroz, MEL: Melibioz, AYM: Amigdalın, ARA: Arabinoz, \*: Karbonhidrat, (+): Pozitif, (-): Negatif, d: Değişken, ?: Bilinmiyor.

Hastalıklı balıklardan izole edilen *Vibrio* sp. suşlarının tanımlanmasında kullanılan klasik geleneksel biyokimyasal testleri ile API 20E testlerinin sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında farklılıklar tespit edilmiştir. Klasik yöntemde sitrat testiin pozitif olanlarından LV29 ve LV44 API 20E test sonuçlarından farklılık göstermesine karşın API 20E testinde pozitif olan suşlardan LV09, LV12, LV27, LV47 ve LV48 klasik yöntemin sonuçlarından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan API 20E test sonuçları göre VP testi LV05, LV06, LV10 ve LV48 suşlarında pozitif olması klasik test sonuçlarından farklılık göstermiştir. İndol test sonuçları irdelendiğinde Klasik yöntemde bir suş (LV09) negatif olmasına karşın API 20E testinde LV44, LV45 ve

LV46 suşlarının negatif reaksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Üre test sonuçları klasik yöntemle göre 9 suşun (LV06, LV07, LV08, LV09, LV11, LV30, LV32, LV35 ve LV45) pozitif olması ile API 20E test sonuçlarından farklılık gösterirken API 20E testinde pozitif olan suşlardan sadece birinin (LV10) farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Dekarboksilaz testlerinden ADH testi klasik yöntemde LV26, LV34 ve LV35 suşlarında pozitif olmasına karşın, API 20E testinde LDC testi LV29, LV34 ve LV35 suşlarında, ve ODC testi LV29, LV30, LV31, LV32, LV33 ve LV35 suşlarında pozitif olması ile klasik yöntem testlerinden farklılık göstermiştir. Klasik ve API 20E test sonuçlarına göre jelatin testi LV12 ve LV46 suşlarının negatif sonuç vermesi paralellik göstermesine karşın *Vibrio* sp. türlerinde jelatin testinin pozitif olması gerekmektedir. Bu bağlamda bu iki suşun *vibrio* olmama olasılığı çok yüksektir. Bu testleri desteklemek için yapılan PZR test sonuçları değerlendirildiğinde bu iki suşun *Vibrio* sp. olmadığı ortaya konulmuştur.

Hastalıklı levrek balıklarından izole edilen 52 adet bakteri suşlarına ait antibiyogram test sonuçları MHA'da meydana getirmiş olduğu zon çapları dijital kumpas yardımı ile ölçülmüştür. MHA'da herbir izolata ölçülen antibiyotik disk zon çapları Tablo 5'deki zon çapları ile karşılaştırılarak antimikrobiyel ajanların etkinlikleri değerlendirilerek sonuçlar Tablo 10 ve devamında hassas, orta hassas ve dirençli olarak verilmiştir.

Antibiyogram testinin sonucunda ölçülen zon çaplarının değerlendirilmesinden sonra antibiyotiklere karşı *vibrio* suşlarının göstermiş olduğu hassasiyet ve direnç seviyesinin yüzdesi hesaplanarak aşağıdaki Şekil 16'da gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan suşlara yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre en fazla direnç ampisilin'e % 94,23 gösterilirken, diğer antibiyotiklere karşı sırasıyla; streptomisin % 42,31, oksitetrasikline % 13,46, eritromisin % 3,85 ve florfenikol % 1,92 direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bakteri izolatları oksolinik asit ve enrofloksasin karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, test sonuçlarına göre izolatların sulfametoksazol ve trimetoprim+sulfametoksazol kombinasyonuna karşıda orta hassasiyet gösterdikleri belirlenmiştir.

**Tablo 10.** *Vibrio* sp. suşlarına ait antibiyogram test sonuçlarının hassasiyet profili

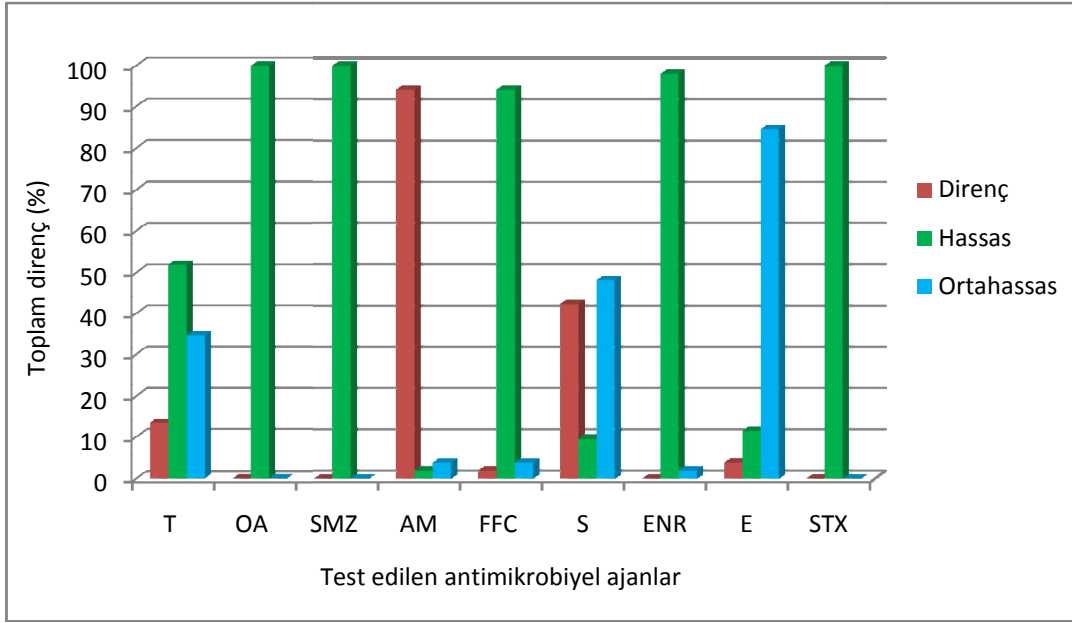
Suş No	Antibiyotik Diskleri								
	T	OA	SMZ	AM	FFC	S	ENR	E	STX
LV01	O	H	H	O	H	H	H	O	H
LV02	O	H	H	O	H	H	H	O	H
LV03	O	H	H	D	H	D	H	O	H
LV04	O	H	H	D	H	D	H	O	H
LV05	H	H	H	D	H	D	H	H	H
LV06	H	H	H	D	H	D	H	H	H
LV07	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV08	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV09	D	H	H	D	H	D	H	H	H
LV10	D	H	H	D	H	O	H	O	H
LV11	D	H	H	D	H	H	H	O	H
LV12	D	H	H	D	H	O	H	O	H
LV13	D	H	H	D	H	H	H	H	H
LV14	H	H	H	D	O	D	H	O	H
LV15	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV16	D	H	H	D	H	O	H	O	H
LV17	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV18	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV19	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV20	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV21	O	H	H	D	O	O	H	D	H
LV22	O	H	H	D	H	O	H	D	H
LV23	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV24	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV25	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV26	O	H	H	D	H	O	H	O	H

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfamethoksazol, AM: Ampisillin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, SXT: Trimethoprim+Sulfamethaksazol.  
D: Dirençli, O: Orta hassas, H: Hassas.

**Table 10. (Devamı)**

Suş No	Antibiyotik Diskleri								
	T	OA	SMZ	AM	FFC	S	ENR	E	STX
LV27	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV28	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV29	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV30	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV31	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV32	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV33	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV34	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV35	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV36	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV37	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV38	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV39	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV40	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV41	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV42	H	H	H	D	H	O	H	H	H
LV43	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV44	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV45	O	H	H	D	H	D	H	H	H
LV46	O	H	H	D	H	D	H	O	H
LV47	D	H	H	D	H	O	H	O	H
LV48	H	H	H	D	H	O	H	O	H
LV49	O	H	H	D	H	O	H	O	H
LV50	O	H	H	D	H	D	H	O	H
LV51	H	H	H	D	H	D	H	O	H
LV52	H	H	H	H	H	H	H	O	H

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfamethoksazol, AM: Ampisillin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, SXT: Trimethoprim+Sulfamethaksazol.  
D: Dirençli, O: Orta hassas, H: Hassas.



**Şekil 16.** Levrek balıklarından izole edilen *Vibrio* sp. suşları için antibiyotik direnç profilleri.

T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik asit, SMZ: Sulfametoksazol, AM: Ampisilin, FFC: Florfenikol, S: Streptomisin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, STX: Trimetoprim-Sulfametoksazol.

Universal 16S rRNA primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin dizi analizine gönderilen sekans sonuçları GenBank veri tabanındaki farklı kabul numarasıyla kayıtlı olan 22 suşun *V. anguillarum* ile % 98-100, 18 suşun *V. parahaemolyticus* ile % 99-100, 8 suşun *V. harveyi* ile % 98-100, 2 suşun *V. vulnificus* ile % 98-100, bir suşun *Aeromonas veronii* ile % 99 ve bir suşun *Photobacterium damsela* ile % 99-100 oranında benzerlik gösterdikleri belirlendi ve elde edilen veriler Tablo 11 verilmiştir.

**Tablo 11.** Dizi analizine gönderilen PZR ürünlerine ait sekans sonuçlarının GenBank veri tabanında benzerlik oranların karşılaştırılması.

Suş No	İzolatu Türü	GenBank Giriş No	Benzerlik (%)
LV01	<i>Vibrio anguillarum</i>	LK021130, CP006699	% 99
LV02	<i>V. vulnificus</i>	AY911393	% 98
LV03	<i>V. anguillarum</i>	LK021130, CP006699	% 99
LV04	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 99
LV05	<i>V. parahaemolyticus</i>	KM406325	% 99
LV06	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 98
LV07	<i>V. anguillarum</i>	LK021130, KJ028214, CP006699	% 99-100
LV08	<i>V. harveyi</i>	KR075014, AB512475	% 98
LV09	<i>Aeromonas veronii</i>	KJ396887	% 99
LV10	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972	% 99
LV11	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972	% 99
LV12	<i>V. harveyi</i>	CP009467, AY750576	% 99-100
LV13	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 98
LV14	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972	% 99
LV15	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972	% 99
LV16	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, KR347266	% 99
LV17	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, KM406325	% 99
LV18	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP009765	% 99
LV19	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP009983	% 99
LV20	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006008	% 99
LV21	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006007	% 99
LV22	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP007004	% 99
LV23	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006004	% 99
LV24	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006004	% 99

V: Vibrio

**Tablo 11. Devamı**

Suş No	İzolatın Türü	GenBank Giriş No	Benzerlik (%)
LV25	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP007004	% 100
LV26	<i>V. harveyi</i>	CP009467, HM771342	% 99-100
LV27	<i>V. anguillarum</i>	LK021130, KJ028214, CP006699	% 99
LV28	<i>V. anguillarum</i>	LK021130, FJ457411, CP006699	% 99
LV29	<i>V. anguillarum</i>	KJ028214, CP002284, CP006699	% 99-100
LV30	<i>V. anguillarum</i>	KJ028214, CP002284, CP006699	% 99-100
LV31	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 99-100
LV32	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, CP006699, CP006699	% 99
LV33	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, KJ028214, CP006699	%99-100
LV34	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006004	% 99
LV35	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006004	% 99
LV36	<i>V. parahaemolyticus</i>	CP003972, CP006004	% 99
LV37	<i>V. anguillarum</i>	CP002284, KF150786, CP006699	% 99
LV38	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 99
LV39	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	%99
LV40	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 99-100
LV41	<i>V. anguillarum</i>	KF150776, LK021130, CP006699	% 99-100
LV42	<i>V. anguillarum</i>	KF150776, KJ028214, CP006699	% 99-100
LV43	<i>V. anguillarum</i>	KF150778, KJ028214, CP006699	% 99-100
LV44	<i>V. anguillarum</i>	KF150786, LK021130, CP006699	% 99
LV45	<i>V. anguillarum</i>	KF150776, CP002284, CP006699	% 99-100
LV46	<i>Ph. damsela</i>	KR075010, KR075015	% 99-100
LV47	<i>V. harveyi</i>	CP009467	% 99
LV48	<i>V. harveyi</i>	HQ439528	% 98
LV49	<i>V. harveyi</i>	CP009467, KC748351	% 99-100
LV50	<i>V. harveyi</i>	JF412245	% 99
LV51	<i>V. harveyi</i>	KT986106	% 100
LV52	<i>V. vulnificus</i>	NR_118570; NR_119061, JQ253967	%99-100

V: Vibrio, Ph: Photobacterium

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Su ürünleri yetiştiriciliğinde maliyeti düşürmek için yem, iş gücü, su kalitesi, gemi giderleri (yakıt, bakım vs ihtiyaçlar) ve pazarlama gibi farklı sorunlarla mücadele edilmektedir. Hastalıklar konusu ise tüm bu diğer problemler ile yakın ilişki içerisinde. Su kalite kriterleri, uygun olmayan rasyonlar ile besleme ve yanlış uygulamalar (hasat, stok yoğunluğu, ilaçlama, taşıma) farklı hastalıklara sebep olmaktadır (Timur ve Timur, 2003). Tüm bu bileşenler içerisinde hastalıkların doğru teşhisi oldukça önem arz etmektedir. Hastalık etmenlerinin yanlış teşhisi, tedaviye ve alınacak önleyici tedbirlere engel teşkil edecektir.

Bu çalışmada, Doğu Karadeniz'deki Rize ve Trabzon illerinin kıyı sahilinde denizel ortamdaki çiftliklerde yüzer ağ kafeslerde kültürü yapılan levrekler (*Dicentrarchus labrax*)'de ölümlere neden olan hastalık vakalarından izole edilen bakterilerin identifikasyonu, konvensiyonel testler, API 20E kiti testleri ve PZR gibi farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam 52 izolata yapılan test sonuçlarına göre hastalık etkenleri 22 suşun *V. anguillarum*, 18 suşun *V. parahaemolyticus*, 8 suşun *V. harveyi* ve 2 suşun ise *V. vulnificus* olduğu 4 farklı vibrio türü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada birer suşun *Aeromonas veronii* ve *Photobacterium damsela* olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, izole edilen *Vibrio* türlerine karşı antimikrobiyellerin etkinliği disk diffüzyon yöntemi ile en etkili antibiyotik belirlenerek hastalığın tedavisinde kullanılması önerilmiştir.

Doğu Karadeniz bölgesinde kültürü yapılan levrekler (*Dicentrarchus labrax*)'de görülen vibrio enfeksiyonlardan izole edilen bakterilerin tanımlanması üzerine yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir (Savaş ve Türe 2007; Uzun ve Oğut, 2015; Balta, 2016). Ordu ili'nde yüzer ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan levreklerde (*D. labrax*) *V. anguillarum* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Etkenin idendifikasyonunda konvensiyonel testler ve API 20E test kitleri kullanılmış, fakat tanımlamaya ait bulgular net olarak verilmemiştir (Savaş ve Türe 2007). Doğu Karadenizdeki iki farklı çiftlikte kültür yapılan levrekler (*D. labrax*)'deki bakteri patojenlerinin oluşumun, çeşitliliğin ve sıklığını belirlemek üzere yapılan başka bir çalışmada biyokimyasal testler ve PZR yöntemi kullanılarak yapılan test sonuçlarına göre *Vibrio vulnificus*, *V. harveyi* ve *V.*



*rotiferianus* olarak tanımlandığı bildirilmiş ve aynı çalışmada levreklerden izole edilen diğer hastalık etkenleri olarak *Aeromonas veronii* biovar *sobria* ve *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* etkenlerin varlığı bildirilmiştir (Uzun ve Ogut, 2015). Bu bölgede *Vibrio* enfeksiyonu üzerine yapılan başka bir çalışmada ise Ordu, Rize ve Trabzon illerine bağlı denizel ortamdaki yüzer ağ kafeslerde hastalıklı levreklerden izole edilen bakterilerin konvensiyonel testler, API 20E test kiti, lam aglütinasyon testi ve PZR test sonuçları *V. anguillarum* olduğu bildirilmiştir (Balta, 2016). Bu bölgede kültürü yapılan alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*)’daki vibrio enfeksiyonlarından izole edilen bakterilerin tanımlanması üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında *V. anguillarum*’un izole edildiği sınırlı sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür (Candan, 2000; Savaş ve Türe, 2007; Balta ve Deniz Balta, 2016; Balta ve Deniz Balta, 2017). Ülkemizdeki vibrio enfeksiyonları üzerine yapılan diğer araştırmalar ise, Ege ve Akdeniz bölgesindeki kıyıları kapsamaktadır (Çağırğan, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Gokoglu, 2007; Tanrikul, 2007; Tanrikul ve Gultepe, 2011; Avsever ve Ün, 2015). Bu çalışma, ülkemizin Doğu Karadeniz kıyılarında yetiştiriciliği yapılan levrek balıklarında ortaya çıkan vibrio enfeksiyonundan izole edilen bakteriler ile ilgili gerek örneklenen balık sayıları ve gerekse zaman aralığı olarak en kapsamlı çalışma olma niteliğindedir. Hastalığın epizootiyolojisine ilişkin, su sıcaklığının 18,5°C üzerine çıktığı yaz aylarında salgınlar meydana geldiği bildirilmiştir (Balta, 2016).

Ülkemizde ise gökkuşağı alabalıklarında 13 ve 15°C’de (Tanrikul, 2007), *Lactococcus garvieae* ile miks enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Tanrikul ve Gultepe, 2011). Başka bir araştırmada, Karadeniz’de kültürü yapılan somon (*Salmo salar*) balıklarında 1991 Temmuz ve 1992 Haziran aylarında su sıcaklığı 23-24°C’nin üzerine çıktığında yoğun ölümlerin gözlemlendiği bildirilmiştir (Candan, 2000). Karadeniz’de ilk kez 8°C gibi düşük su sıcaklığında deniz suyuna nakledilen 5±2 gr ağırlığındaki gökkuşağı alabalık yavrularında adaptasyon esnasında enfeksiyon oluştuğu ve enfekte balıkların iç organlardan izole edilen etkenin *V. anguillarum* olarak tanımlandığı bildirilmiştir (Balta ve Deniz Balta, 2016). Bunun nedeni, balıkların deniz suyuna adaptasyonları esnasında karşılaştıkları yüksek ortam tuzluluğunun (17,8±0,3 ppt) oluşturduğu fizyolojik baskının immün sistem üzerine bir etkisi olarak değerlendirilmiş ve nakil öncesi balıkların uzun süre aç bırakılması, nakil esnasında oluşan taşıma stresi, nakil mesafesinin uzunluğu, elle muamele, yüksek stok yoğunluğu ve deniz suyunda ilk

kez karşılaşılan farklı mikrobiyal patojenlerin de önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Balta ve Dengiz Balta, 2016; Balta ve Dengiz Balta, 2017).

API test kitleri insan patojenlerinin hızlı identifikasyonu için tasarlanmış biyokimyasal testlerin minyatüre edilmiş şeklidir. Özellikle inkübasyon sıcaklıklarının balık patojenlerinin inkübasyon sıcaklıklarına uygun olmayışı, bu kitlerin balık patojenleri için kullanıldığında hatalı sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. *Yersinia ruckeri*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio anguillarum* gibi balık patojenleri için sistemin adaptasyonu üzerinde çalışmalar yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır (Popovic vd., 2007). Bu çalışmada, izolatlara uygulanan API 20E test sonuçları değerlendirildiğinde *V. anguillarum* bakterisi ile ilgili detaylı bir bilgi sunulmuş ve diğer çalışmalar ile bu bulgular arasındaki sonuçlar karşılaştırılmıştır (Kent, 1982; MacDonell vd., 1982; Austin ve Austin, 1999; Çağırğan, 2004; Tanrikul vd., 2004; Demircan and Candan, 2006). Bahsi geçen çalışmalarda farklı suşların arjinin dihidrolaz (Kent 1982; Grisez vd., 1991), sitrat (Maugeri vd., 1983; Tanrikul vd., 2004) ve indol üretimi (Kent 1982; Maugeri vd., 1983; Grisez vd., 1991), voges proskauer reaksiyonu (Maugeri vd., 1983; Grisez vd., 1991), jelatin hidroliz (Maugeri vd., 1983), inositol (Tanrikul vd., 2004), sorbitol (Grisez vd., 1991; Tanrikul vd., 2004), sukroz (Maugeri vd., 1983; Grisez vd., 1991), amigdalin (Grisez vd., 1991; Tanrikul vd., 2004) ve arabinozdan (Maugeri vd., 1983; Grisez vd., 1991) asit üretimi değişken, fakat inositol (Tanrikul, 2007) ve amigdalinden asit üretimi pozitif (Kent 1982; Maugeri vd., 1983; Austin ve Austin, 1999) diğer çalışmalarda negatif, arabinozdan asit üretimi negatif (Grisez vd., 1991; Demircan and Candan, 2006) iken diğer çalışmalarda ise pozitif olduğu ve çalışmalar arasındaki farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Akinbowale vd., 2006; Demircan and Candan, 2006; Tanrikul, 2007). Danimarka'daki bir yılan balığı çiftliğindeki hastalık olgularından izole edilen *V. vulnificus* suşlarının indol pozitif (Dalsgaard vd., 1999) olması bu çalışma sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Ayrıca; tuza tolerans testlerinde tuzsuz (% 0 NaCl) ortamda 52 suştan 4 suş ve tuzlu (% 7 NaCl) ortmada 52 suşun hepsinin pozitif olması ile Demircan ve Candan (2006)'ın, çalışması ile benzerlik gösterirken, Austin ve Austin (1993; 2007) ve Tanrikul (2007)'un çalışmaları ile ise negatif olması ile farklılık göstermiştir. Son yıllarda birçok bilimsel çalışmada, tür teşhisinin konvensiyonel yöntemlerini destekleyici olarak moleküler teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bilimsel

çalışmalarda tür teşhisinin doğruluğunu güçlendirmek ve bazı yanlışların önüne geçmede moleküler metot önemli bir kriter olarak kabul görmektedir. Ülkemizde deniz balıklarından izole edilen *V. anguillarum* bakterisinin moleküler teşhisi sadece birkaç çalışmada (Demircan ve Candan, 2006; Balta, 2016) ve *Vibrio vulnificus*, *V. harveyi* ve *V. rotiferianus* üzerine yapılmış (Uzun ve Ogut, 2015), fakat bu çalışmaya konu olan levrek balıkları dışındaki türler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Demircan ve Candan, 2006; Avsever ve Ün, 2015).

Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisi amacıyla antibiyotik kullanımı oldukça yaygın bir uygulamadır. Vibriozisin tedavisi için flumequin (6mg/kg) 6 gün, furanace (2-4 mg/kg) 3-5 gün, furazolidon (25-75mg/kg) 20 gün, kanamisin (50mg/kg) 7 gün, nifurprazin hidroklorid (10mg/kg) 3-6 gün, nitrofuran (50mg/l) 1 saat banyo, oksolinik asit (10mg/kg) 10 gün, oksitetrasikline (50-75/kg) 10 gün, güçlendirilmiş sülpnamidler (30mg/kg) 10 gün, sulponamidler (sülfisoksazol, sülfamerazin, sülfametazin; 100-200mg/kg) 10-20 gün dozunda kullanılması önerilmektedir (Austin ve Austin 1987; Austin ve Austin 1999; Austin ve Austin 2007; Frans vd., 2011), kloramfenikol (50-70mg/kg) 5-10 gün, florfenikol (10mg/kg) 10 gün (Austin ve Austin 2007), *V. anguillarum* suşlarının R-factor taşıdığı ve plazmidler aracılığı ile özellikle streptomisin, sülfanamidler ve tetrasiklin'e direnç geliştirdiği farklı araştırmalarda tespit edildiği bildirilmiştir (Austin ve Austin 1987; Austin ve Austin 1999; Austin ve Austin 2007; Frans vd., 2011). Ayrıca, farklı çalışmalarda *V. anguillarum* suşlarına karşı ampisilin (Korun ve Gokoglu 2007; Akaylı 2013; Akinbowale vd., 2006; Vaseeharan vd., 2005; Balta, 2016), amoksisilin (Akinbowale vd 2006; Korun ve Gokoglu 2007), kanamisin (Korun ve Gokoglu M 2007; Austin ve Austin 2012), eritromisin (Akinbowale vd., 2006; Korun ve Gokoglu, 2007; Tanrikul ve Gultepe, 2011; Akaylı vd., 2013; Vaseeharan vd., 2005; Balta, 2016), sülfametaksozol (Korun ve Gokoglu 2007; Balta, 2016), bazı suşların enrofloksasin (Tanrikul, 2007) ve oksitetrasiklin (Akaylı vd., 2013; Akinbowale vd., 2006; Tanrikul, 2007; Tanrikul ve Gultepe, 2011; Vaseeharan vd., 2005; Balta, 2016), trimetoprim+sulfametoksazol (Tanrikul ve Gultepe, 2011; Balta, 2016) dirençli olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan suşlara yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre en fazla direnç ampisilin'e % 94,23 gösterilirken, diğer antibiyotiklere karşı sırasıyla;

streptomisin % 42,31, oksitetrasikline % 13,46, eritromisin % 3,85 ve florfenikol % 1,92 direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Bakteri izolatları oksolinik asit ve enrofloksasin karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Hastalığın tedavisinde antibiyogram test sonuçlarına göre enrofloksasin, oksalinik asit ve florfenikolden birinin kullanılması gerektiği tespit edilmiştir. Bölgemizde aynı çiftliklerden izole edilen *V. anguillarum* izolatlarına karşı en yüksek ampisiline ve streptomisine (Balta, 2016) karşı dirençlik, bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermiştir. Aynı çalışmada eritromisine, Sulfametoksazol ve Trimetoprim+Sulfametoksazol izolatların % 50 civarlarında direnç göstermesine karşı bu çalışmada aynı antibiyotiklerin hassas olduğu belirlenmiştir. Bu farklılık Balta (2016)'nın, sadece *V. anguillarum*'un toplam 22 izolat ile çalışmasına karşın bu çalışmada ise 4 farklı vibrio türüne ait toplam 52 suş çalışılmış olmasına bağlanabilir.

Bazı balık patojenleri insanlarda enfeksiyona neden olabilir. Hayvanlardan insanlara bulaşan hastalıklara zoonos hastalıklar denmektedir. Bu bağlamda balık patojenlerinden olan vibrio cinsine ait *V. parahaemolyticus* gıda zehirlenmesine, *V. alginolyticus* insanlarda kulak iltihabına “otitis” neden olabileceği ve *V. vulnificus* ise insanların kol ve ellerindeki yara enfeksiyonlarına neden zoonos hastalık etkenleri olduğu bildirilmiştir(Austin ve Austin, 1999). Bu çalışmada levrek balıklarından izole edilen vibrio türleri arasında zoonoz olan *V. parahaemolyticus* ve *V. vulnificus* varlığı tespit edilmiştir.

## 5. ÖNERİLER

Deniz ortamının doğal mikroflorasında bulunan *Vibrio* sp. türleri farklı balıklarda fırsatçı patojen olduğu ve zaman zaman enfeksiyon oluşturduğu bilinmektedir. Balıklarda hastalık oluşturduğu için bu güne kadar sayısız taksonomik çalışmalar yapılan bu cins, bu çalışmada morfolojik ve biyokimyasal testler, API 20E testleri ve PZR ürünlerinin gen dizin analizleri yardımı ile tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Taksonomik çalışmalarda bu cinsin tamlanması daha başarılı olmak için öneriler aşağıda bildirilmiştir.

Bu çalışmada, hastalıklı levrek balıklarından izole edilen *Vibrio* sp. suşların klasik testleri yanı sıra mutlaka PZR yönteminin kullanılması ve 16S rRNA genleri haricinde farklı gen bölgelerinin çalışılarak tür düzeyinde doğru tanımlanmanın yapılması uygun olabilir.

Bu çalışmada hastalıklı levrek balıklarından izole edilen zoonoz bir hastalık etkeni olan *V. parahaemolyticus* tanımlanması insan sağlığını korunması açısından önem arz etmektedir. Ölen ve ölmek üzere olan balıkların toplanıp kireç kuyularında gömülerek imha edilmesi gerekmektedir. Ayrıca hastalıklı balıkların insan tüketimine tedavi edilmeden kesinlikle sunulmaması gerekmektedir.

Antibiyogram test sonuçlarına göre bakterilerde meydana gelen dirençli suşların moleküler yöntemle çalışılıp ve plazmit aracılığı ile aktarılabılır genlerin varlığı araştırılmalıdır.

Akuatik çevrede oluşabilecek antibiyotik kirliliğinin balık ve insan sağlığı üzerine etkilerinde araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; levrek balıklarında toplu ölümler ile büyük ekonomik kayıplara neden olan *vibrio* enfeksiyonlarının önlenmesi için proflaktif tedavi öncelikli olmalıdır. Bunun için; balıkların mevcut aşılarda aşılması ve yeni aşı çalışmalarının yapılması, rezidü problemlerin önüne geçmek için farklı biyolojik mücadelelerin yapılması gerektiği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Actis, L.A., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H., 2011.** Vibriosis. In: Fish diseases and disorders, volume 3: Viral, bacterial and fungal infections, Edition by P.T.K. Woo and D.W. Bruno. CABI Publishing, 1845935543, 9781845935542.
- Akaylı, T., 2001.** Kültür Çipura Balıklarında (*Sparus aurata*, L. 1758) Vibriosis'in ELİSA ve Bakteriyolojik Yöntemlerle Teşhisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 77s.
- Akaylı, T., 2007.** Çiklet (*Aulonocara maylandi*) balıklarında görülen bir vibriosis olgusu. Sumder Su Ürünleri Dergisi, 27, 38-40.
- Akinbowale, O.L., Peng, H. and Barton, M.D., 2006.** Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J Appl Microbiol, 100, 1103-1113.
- Alcaide, E., Amaro, C., Todoli, R. and Oltra, R., 1999.** Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcarp *Aphanius iberus*. Diseases of Aquatic Organisms, 35, 77-80.
- Altınok, I. and Kurt, I., 2003.** Molecular diagnosis of fish diseases: a review, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3, 131-138.
- Akşit, D. ve Kum, C., 2008.** Gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1972)'nda sık görülen patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(1), 1-7.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1987.** Bacterial fish pathogens. Diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limited, Chichester, 364p.
- Austin, B. and Austin, D., 1999.** Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and Wild Fish. Third (Revised) Edition. Springer-Praxis Publishing, Chichester, 457p.
- Austin, B. and Austin, D., 2007.** Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and Wild Fish. Seventh (Revised) Edition. Springer-Praxis Publishing, Chichester, 552p.
- Aydin, S. 2000.** Investigation of high mortalities in eyed eggs and fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and brown trout (*Salmo trutta*). Turkish Journal of Marine Sciences, 6(1), 245-254.
- Avsever, M.L. and Ün, C., 2015.** Distribution of hemolysin genes in Turkish *Vibrio anguillarum* isolates. Bull Eur Ass Fish Pathol, 35, 75-84.
- Bader, J.A. and Shott, E.B., 1998.** Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species-specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. Journal of Aquatic Animal Health, 10, 311-319.

- Balebona, M.C., Zorrilla, I., Morinigo, M.A. and Borrego, J.J. 1998.** Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, 166, 19-35.
- Balta, F., 2016.** Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25 (10); 4393-4400.
- Balta, F. ve Dengiz Balta, Z., 2016.** Vibrio infection and treatment on the juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transferred seawater. *Journal of Anatolian, Environmental & Animal Sciences*, 1 (1), 14-20.
- Balta, F., Dengiz Balta, Z., 2017.** Doğu Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (Baskıda).
- Biosca, E. G., Amaro, C., Esteve, C., Alcaide, E. and Garay, E., 1991.** First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European el, *Anguilla anguilla*, L. *Journal of Fish Diseases*, 14, 103-109.
- Boran, H., Terzi, E., Altinok, I., Capkin, E. and Bascinar, N. 2013.** Bacterial diseases of cultured mediterranean Horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) in sea cages. *Aquaculture*, 396: 8-13. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.025.
- Bullock, G. L., 1987.** Vibriosis in fish. Fish disease leaflet, 77. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, 11p.
- Candan, A., 1991.** Çipura Yetiştiriciliğinde Mevsimsel Olarak Görülen Hastalık Etkenlerinin Teşhis Ve Tedavi Yöntemlerinin Geliştirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 76s.
- Candan, A., 1993.** Çipura (*Sparus aurata* L, 1758) balıklarında *Vibrio anguillarum* enfeksiyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti dergisi*, 23, 25-27.
- Candan, A., 2000.** Türkiye’de üretilen Atlantik salmonu (*Salmo salar* L.)’nda tespit edilen ilk vibriosis olgusu. *Türkiye Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 107-108.
- Collwell, R.R. and Grimes, D.J., 1984.** Vibrio diseases of marine fish populations. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, 37, 265-287.
- Çağırğan, H., 1993.** Kültürü Yapılan Çipura (*Sparus aurata*, L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L.) Balıklarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Teşhis Ve Tedavisi Üzerine Bir Arastırma. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 117s.

- Çağırğan, H. and Yureklitürk, O., 1996.** A research on the diagnosis and treatment of cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). The Journal of Centre Veterinary Control and Research Institute, 21(35): 113-122.
- Çağırğan, H., Tanrikul, T.T ve Tokşen, E., 1996.** Balık hastalıklarından korunmada genel hijyenik tedbirleri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 20, 39-55.
- Çağırğan, H., 2004.** Vaccine development in sea bass fry (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) against vibriosis. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi, 21, 271-274.
- Çanak, Ö., 2011.** Kültür çipura (*Sparus aurata*, L. 1758) balıklarından izole edilen bazı patojen bakterilerin protein profillerinin tespiti, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Hastalıklar Programı, 88s.
- Dalsgaard, I., Hoi, L., Siebeling, R. J. and Dalsgaard, A., 1999.** Indole-positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm. Diseases of Aquatic Organisms, 35(3), 187-94.
- Demircan, D. and Candan, A., 2006.** Identification of *Vibrio anguillarum* by PZR (rpoN gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 30, 305-310.
- Dec, C., Angelidis, P. and Baudin Laurecin, F., 1990.** Effect of oral vaccination against vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Fish Diseases, 13, 369-377.
- Doğaka, 2014.** Kültür balıkçılığı sektör raporu. <http://dogaka.gov.tr> (14 Ekim 2016).
- Fouz, B. and Amaro, C., 2003.** Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater farms. Aquaculture, 217, (1-4), 677-682.
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier P, Willems, K.A., Lievens B. and Rediers H., (2011):** *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. J Fish Dis, 34, 643-661.
- Grisez, L., Ceusters, R. and Olliver, F., 1991.** The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. J Fish Dis, 14, 359-365.
- Grisez, L. and Olliver, F., 1995.** Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Applied and Environmental Microbiology, 61(12), 4367-4373.
- Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J. and Ollevier, F., 1997.** Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture, 155, 387-399.



- Güralp, H., 2012.** Denizde Kültür Balıklarında Görülen Bakteriyel Patojenlerin Teşhisi Ve Antibakteriyel Maddelere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 143s.
- Gomez-Gil, B., Soto-rodri'guez, S., Garcı'a-gasca, A., Roque, A., Vazoquez-juarez, R., Thompson, F.L. and Swings, J., 2004.** Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150, 1769-1777. DOI: 10.1099/mic.0.26797-0.
- Hada, H.S., West, P.A., Lee, J.V., Stemmler, J. and Colwell, R.R., 1984.** *Vibrio tubiashii* sp. nov., a Pathogen of Bivalve Mollusks, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 1-4.
- Horne, M.T., Tatner, M., McDerment, S. and Agius, C., 1982.** Vaccination of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at low temperatures and the long-term persistence of protection. *Journal of Fish Diseases*, 5, 343-345.
- Jayasankar, P., 1998.** Application of DNA fingerprinting in Genome Analysis of Fishes. In: Proceedings of the first National Seminar on Trends in Marine Biotechnology, Institute for Coastal Area Studies, Nagercoil, 151-159.
- Kent, M.L., 1982.** Characteristics and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fish using API 20 E (Analytab products) multitube test strips. *Can J Fish Aquat Sci*, 39, 1725-1729.
- Kıran, F. ve Osmanağaoğlu, Ö., 2011.** Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) identifikasyonunda/Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27(1), 62-74.
- Kornberg, A. and Baker, T.A., 2005.** DNA replication. Published by University Science Books, 2nd edition, ISBN-13: 978-1891389443, 931p.
- Korun, J., 2004.** Kültür levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax* L.) vibriosis ve pasteurellosis'in bazı diagnostik kitler ve laboratuvar yöntemleri ile teşhisi üzerinde bir çalışma. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, 143 s.
- Korun, J. ve Akaylı, T., 2004.** Kültür levrek balıklarında paraziter bir isopod: *Cerattothoa oestroides* ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlar olgusu. İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 30(2), 123-132.
- Korun, J., 2006.** Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 23 - Ek (1/2): 259-263.
- Korun, J. and Gokoglu, M., 2007.** *Listonella anguillarum* isolated from hatchery cultured red porgy *Pagrus pagrus* in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(6): 823-827.

- Korun, J. and Timur, G., 2008.** Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Journal of Fisheries Sciences*, 2(1), 66-76.
- Lane, D.J., 1991.** 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Li, J.J., Yie, R., Foo, W.T., Ling, J.M.L., Xu, H., and Woo, N.Y.S., 1999.** Antibiotic resistance and plasmid profiles of vibrio isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 245-249.
- Liu, P.C., Lin, J.Y., Chuang, W.H. and Lee, K.K., 2004.** Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 495-499.
- López, J.R., De la Roca, E., Núñez, S., De la Herrán, R., Navas, J.I., Manchado, M., Herrera, M. and Toranzo, A.E., 2009.** Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 84, 209-217.
- MacDonell, M.T., Singleton, F.L. and Hood, M.A., 1982.** Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 44, 423-427.
- MacDonell, M.T. and Colwell, R.R., 1985.** Phylogeny of the vibriaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *System. Appl Microbiol.*, 6, 171-182.
- Martinez-Picado, J., Blanch, A.R. and Jorfe, J., 1994.** Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (2), 732-737.
- Maugeri, T.L., Crisafi, E., Genovese, L. and Scoglio, M.E., 1983.** Identification of *Vibrio anguillarum* with the API 20 E system. *Microbiologica*, 1, 73-79.
- McPherson, M.J. and Møller, S.G., 2006.** PCR. Taylor and Francis Group, 2nd Edition, ISBN: 0-4153-5547-8, 292p.
- Nascimento, A.M.A., 2011.** Use of the rRNA operon and Genomik Repetitive Sequences for the Identification of Bacteria. In: *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, Edited by F.J. de Bruijn, John Wiley and Sons, 1118010442, 9781118010440.
- Newton, C.R. and Graham, A., 1994.** PCR (Introduction to Biotechniques Series) BIOS Scientific Publishers Limited, 2 Sub Edition, ISBN-13: 978-1872748825, 161p.

- Noga, E.J., 2010.** Fish Disease:Diagnosis and Treatment. Blackwell Publishing, 2<sup>nd</sup> Edition, Singapore, ISBN: 978-0-8138-0697-6, 536p.
- Öztürk, R.Ç. ve Altınok, İ., 2014.** Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14, 275-297. DOI: 10.4194/1303-2712-v14\_1\_30.
- Ozer, S., Aslan, G., Tezcan, S. and Bulduklu, P. 2008.** Genetic heterogeneity and antibiotic susceptibility of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from Horsemackerel (*Trachurus trachurus* L., 1758). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 32(2), 107-112.
- Pedersen K, Grisez L, van Houdt R, Tiainen, T., Ollevier, F and Larsen, J.L., 1999.** Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. Current Microbiology, 38, 183-189.
- Pedersen, K., Verdonck, L., Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Tiainen, T., Vigneulle, M. and Swings, J., 1998.** Taxsonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes *et al.* 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *etal.* 1981. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 749-758.
- Pelt-Verkuil, E.V., van Belkum, A. and Hays, J.P., 2008.** Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, ISBN: 978-1-4020-6240-7, 325p.
- Popovic, N.T., Coz-Rakovac, R., Strunjak-Petrovic, I., 2007.** Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. Veterinarni Medicina, 52, 49-53.
- Reed, P.A. and Francis-Floyd, R., 1996.** Vibrio Infections of Fish (online ), University of Florida Ifas extention. Universty of Florida, Gainesville, FL, USA, Institue of Food and Agriculture Sciences.
- Savaş, H., Yıldırım, Y., Kurtoğlu, I.Z., Bascinar, N., Alkan, A., Gürel, M., Ergun, H., Firidin, S., Kutlu, I., Serdar, S. ve Zengin, B., 2006.** Ordu ili Perşembe ilçesinde faaliyet gösteren yüzer kafes işletmelerinin çevresel etki ve su ürünleri sağlığı yönünden izlenmesi projesi, Sonuç raporu, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, 58 pp.
- Savaş, H. ve Türe, M., 2007.** Bölgemizde doğal ve kültürü yapılan balıklarda görülen hastalıklar. SUMAE Yunus Araştırma Bülteni, 7, 10-13.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74 (12), 5463-5467.

- Tanrikul, T.T., Çağırğan, H. ve Tokşen, E., 2004.** Levreklerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu. Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Dergisi, 21, 243-247.
- Tanrikul, T.T., 2007.** Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Pak J Biol Sci, 10, 1733-1737.
- Tanrikul, T.T. and Gultepe, N., 2011.** Mix infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) *Lactococcus garvieae* and *Vibrio anguillarum* O1. J Anim Vet Adv, 10, 1019-1023.
- Tendencia, E.A., 2002.** *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* Bloch in the Philippines. Aquaculture Research, 33, 455-458.
- Thompson, F.L., Thopson, C.C., Li, Y., Gomez-Gil, B., Vandenberghe, J., Hoste, B. and Swings, J., 2003a.** *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov. from sea water and marine animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 753-759.
- Thompson, F.L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G.S., Preira, A., De bem, M. M., Sorgeloos, P. and Swings, J., 2003b.** *Vibrio nebtunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 245-252.
- Thompson, F.L., Thompson, C.C. and Swings, J., 2003c.** *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Systematic and Applied Microbiology, 26, 65-69.
- Thompson, F.L., Thompson, C.C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullina, M. and Swings, J., 2003d.** *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1495-1501.
- Thompson, F.L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A.T.R. and Sawabe, T., 2007.** Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio hayveyi* and *Vibrio campbellii* are distinct species. Applied and Environmental Microbiology, 73(13), 4279-4285.
- Timur, G. ve Timur, M., 2003.** Balık hastalıkları, İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, yayın no: 5, Dilek Ofset, ISBN: 975-404-699-9, 538s.
- Timur, G., Timur, M., Akaylı, T., Korun, J. and Erkan, M., 2011.** First occurrence inclusion body syndrome (EIBS) in marinered rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 63, 1-8.
- Tison, D.L., Nishibuchi, M., Greenwood, J.D. and Seidler, R.J., 1982.** *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels. Applied and Environmental Microbiology, 44, 640-646.

- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Topal Sarıkaya, A., Arda, N., 2008.** Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İ.Ü. ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEEM) Yayın No: 3, 3. Baskı, ISBN: 987-975-420-583-1. 345s.
- Toranzo, A.E. and Barja, J.L., 1990.** A review of the taxonomy and seropizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. Diseases of Aquatic Organisms, 9, 73-82.
- TÜİK, 2016.** Su Ürünleri İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu, (14 Kasım 2015).
- Türk, N., 2002.** Çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) yavrularından bakteri izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi, 27, 7-14.
- Uzun, E. and Ogut H., 2015.** The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. Aquaculture, 437, 30-37.
- URL-1:** Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L, 1758) balığının biyolojisi ve yetiştirme Teknikleri (12.03.2015).
- URL-2:** Ağ havuzlarda levrek yetiştiriciliği. www.tarimkutuphanesi.com (16.03.2015).
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S. ve Çakiris, A., 2011.** Yeni nesil DNA dizileme. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1(1), 11-18.
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Murugan T. and Chen, J.C., 2005.** In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. Int. J. Antimicrob. Agents, 26, 285-291.
- Yaman, F., Seçer, S. ve Halkman, A.K., 2003.** Ağ kafeslerde yapılan çipura (*Sparus aurata* L.) ve levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) balıklarında vibriosiz ve pasteurellosis'in araştırılması. Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 1(2), 1-36.
- Zhou, J., Fang, W., Yang, X., Zhou, S., Hu, L., Li X., Qi, X., Su, H. and Xie, L., 2012.** A nonluminescent and highly virulent *Vibrio harveyi* strain is associated with "Bacterial White Tail Disease" of *Litopenaeus vannamei* Shrimp. PloS One, 7 (2), 1-6, DOI: 10.1371/journal.pone.0029961.

## ÖZGEÇMİŞ

Hasret YILMAZ, 30/10/1986 tarihinde Rize ilinde doğdu. İlköğretimine 1997 tarihinde Rize/Muradiye’de Delihasanlı İlkokulu’nda başladı. Ortaöğretimini 2000 tarihinde Rize/Muradiye’de Muradiye İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Rize Lisesi’nden 2003 yılında mezun oldu. Rize Üniversitesi, Meslek Yüksek Okulu, Su Ürünleri Bölümü’nde 2006 yılında başladığı önlisans eğitimini 2008 yılında birincilikle tamamladı. ÖSYM’nin 2010 yılında yaptığı Dikey Geçiş Sınavı’yla Rize Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi’ni kazandı ve kaydını yaptırarak lisans eğitimine başladı. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi’ni 2013 yılında Su Ürünleri Mühendisi unvanı olarak birincilikle tamamladı. Aynı yıl Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda Yüksek lisans programını kayıt yaptırdı ve yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir.