

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİTETRASİKLİN UYGULANAN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'NDA SOLUNGAÇLARIN HİSTOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar GEVER

(06228102)

Anabilim Dalı: Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Programı: Balık Hastalıkları

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 04.10.2010

ELAZIĞ 2010

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OKSİTETRASİKLİN UYGULANAN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'NDA SOLUNGAÇLARIN HİSTOLOJİK YÖNDEN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar GEVER
(06228102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.10.2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 30.09.2010

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ

Prof. Dr. Metin ÇALTA

EYLÜL-2010

ÖNSÖZ

Bu bilimsel çalışmanın planlanmasında ve yürütülmesinde her türlü yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ'ye, araştırmanın yapılabilmesi için gerekli alt yapıyı sunan Su Ürünleri Fakültesine, çalışmayı maddi yönden destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim birimine teşekkür ederim.

Pınar GEVER

ELAZIĞ -2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	IV
SUMMARY.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOT.....	7
2.1. Materyal.....	7
3.2. Metot	7
3. BULGULAR.....	9
3.1. Klinik Bulgular.....	9
3.2. Histopatolojik Bulgular.....	9
3.2.1. Kontrol Grubu	9
3.2.2. Deney Grupları.....	10
3.2.2.1. 1. Deney Grubu (100 mg/L 1 saat süreyle, 10 gün).....	10
3.2.2.2. 2. Deney Grubu (100 mg/L 2 saat süreyle, 10 gün).....	11
3.2.2.2. 3. Deney Grubu (200 mg/L 1 saat süreyle, 10 gün).....	12
3.2.2.2. 4. Deney Grubu (200 mg/L 2 saat süreyle, 10 gün).....	14
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	17
KAYNAKLAR.....	19
ÖZGEÇMİŞ.....	22

ÖZET

Bu araştırmada, toplam 75 adet gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanıldı. Bir kontrol ve dört deney grubu oluşturuldu. Deney gruplarındaki balıklara farklı dozaj ve sürelerde oksitetrasiklin banyo şeklinde uygulanarak solungaçlarda meydana gelen etkileri klinik ve histopatolojik olarak incelendi.

Klinik olarak, dört deney grubuna ait balıklarda oksitetrasiklin uygulamasından sonra balıklarda hareketlerinde yavaşlama, dengesiz yüzme hareketleri, renklerinde açılma, solungaçlarda solgunluk ve filamentlerde kopmalar gözlemlendi.

Histopatolojik olarak, lamellalarda hipertrofi ile başlayan ve daha ilerleyen dozajlarda solungaçların distal lamellalarının birbirine yapışması sonucu primer lamellalarda gelişen hiperplazi gözlemlendi. Primer lamellalarda ödem ve sekonder lamellalarda epidermiste ayrılmalar görüldü. Artan dozaj ve sürelerle ilgili olarak patolojik etkilerin derecesi de artmıştır.

Anahtar Kelimeler: Oksitetrasiklin, Solungaç, Histoloji, Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

SUMMARY

Histological Examination Of Gills Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Exposed To Oxytetracycline

In this study a total of 75 rainbow trout were used. One control and four experimental groups were designed. Clinical and histopathological observations were made on gills in the experimental group on which oxytetracycline was applied at different doses and times.

Clinically, less motility, abnormal swimming, pale colour, pale gills and deformation of filaments in experimental groups.

Histopathological, hypertrophy of lamella at the beginning and hyperplasia were observed at higher concentrations. Separation and edema were determined on primary lamella. Pathological effects were also increased by increasing dose and time.

Key Words: Oxytetracycline, Gill, Histopathology, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.	Fiberglass tekneler içinde banyo yaptırılan balıkların görüntüsü	8
Şekil 2.	Kontrol grubu balıkların solungaç görünümü	10
Şekil 3.	Sekonder lamellalarda gelişen hipertrofi	10
Şekil 4.	Sekonder lamellalarda oluşan ayrılmalar	11
Şekil 5.	Sekonder lamellalarda ayrılmalar ve primer lamellalarda hücre proliferasyonu	11
Şekil 6.	Primer lamellaların distal kısımlarındaki hiperplazi	12
Şekil 7.	Lamellalarda birleşmesi sonucu görülen hiperplazi	12
Şekil 8.	Lamellalarda görülen hiperplazi	13
Şekil 9.	Sekonder lamella epidermisindeki ayrılmalar	13
Şekil 10.	Lamellalarda görülen hemoraji	14
Şekil 11.	Lamellalarda görülen hiperplazi	14
Şekil 12.	Lamellalar arasında görülen hemorajili alanlar	15
Şekil 13.	Sekonder lamellalar arasında görülen ödem ve hücre proliferasyonu	15
Şekil 14.	Primer lamelladaki farklı kalınlaşma gösteren kıvrımdak yapı	16

1. GİRİŞ

Balık yetiştiriciliği ülkemizde ve yöremizde her geçen yıl giderek büyüyen ve gelişen bir sektördür. Bugün yetiştiricilik denildiğinde büyük ölçüde ve ilk planda; çevre koşullarına çok iyi uyum göstermesi, dayanıklı olması, aktif yem alması nedeniyle kolay yemlenmesi ve sonuçta iyi gelişmesi, kısa kuluçka devresine sahip olması, sağım, döl alımı, yavruların yapay yemlerle beslenme ve büyütme işlemlerinin daha kolay yapılması, dolayısıyla daha ekonomik olması ve yetiştiriciliği uzun yıllardan beri yapıldığından pek çok yetiştiricilik sorununun çözümlenmiş olmasından dolayı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) akla gelmektedir (Okumuş, 2002). Kültür balığı üretimindeki artış, balık çiftliklerinin sayıca artması kadar, her geçen gün üretimde yeni tekniklerin uygulamaya konulmasına da bağlıdır. Üreticiler en az alan ve su kullanımıyla maksimum üretim yapabilmek için bu teknikleri kullanmaktadırlar. Bu uygulamaların dezavantajı balık yetiştiriciliğindeki gelişmelere paralel olarak, su ortamının fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerindeki değişimlerden doğrudan etkilenen balıkların hastalıklardan korunması veya tedavileri de bir zorunluluk olarak karşımıza çıkmaktadır (Serezli vd.,2005).

Yüksek stoklama yoğunluğu, bakteriyel hastalıkların yaygın olarak görülmesine neden olmakta ve eğer tedavi yapılmazsa, balık ölümlerinden ve gelişim yavaşlamasından dolayı büyük ekonomik kayıplar olabilmektedir (Björklund, 1991). Bu nedenle balık yetiştiriciliğinde kemoterapötikler örn, antibiyotikler, sulfanomidler ve quinolonlar balık işletmelerinde koruyucu ve hastalık hallerinde de tedavi amaçlı kullanılması yaygın bir hal almıştır (Treves ve Brown, 2000). Antibiyotikler içinde en yaygın olarak kullanılanları ise tetrasiklin grubu ilaçlar, özellikle oksitetrasiklin hidroklorür (OTC) olduğu bildirilmektedir (Serezli vd.,2005). Oksitetrasiklin hidroklorür Amerikan Federal Besin ve İlaç Birliği (FDA) tarafından aquakültürde kullanımına izin verilen ilk antibiyotiktir (Reed vd., 2004). Ayrıca Norveç, İtalya ve Japonya gibi birçok ülkede bakteriyel balık hastalıklarının sağaltımında kullanılmasına izin verilmiş bir antibiyotik olduğu rapor edilmektedir (Björklund 1991; Malvisi vd., 1996). Oksitetrasiklin hidroklorür frunkulosis, vibriosis, pasteurellosis ve yersiniosis gibi sistemik ve kolumnaris gibi tropikal balık hastalıklarının sağaltımında geniş spektrumlu bir antibiyotik olarak kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 1999; Malvisi vd., 1996). Oksitetrasiklinin kullanımı birçok kaynakta 50-100 mg/L/günlük

doz/50-60 dk/10 gün süreyle banyo tarzında; 10 mg/kg canlı ağırlık/intramüsküler enjeksiyon; 1 ml/250 g canlı ağırlık/intraperitoneal enjeksiyon ve 50-75 mg/kg canlı ağırlık/10 gün süreyle yeme katılarak şeklinde verilmiştir (Arda vd., 2005; URL 1).

Balıkta antibakteriyel ilaçların kullanımının pek çok zararları ve yan etkileri vardır. Örneğin; bağışıklık sistemini baskılaması, nefrotoksisite, gelişme geriliği, dirençli bakteriyel suşların gelişimi, çevresel problemler örneğin; balık çiftliklerinin sedimentlerinde ve balık ürünlerindeki kalıntılardır (Björklund vd., 1991; Grondel vd., 1985). Antibakteriyel ilaçların bağışıklık sistemine sayısız etkisi vardır ve kullanılan ilaca göre değişir. İlaçların lenfoid dokularla etkileşimi bağışıklık sisteminin fonksiyonlarını ve dengesini değiştirebilir ve istenmeyen etkilere örneğin; bağışıklık sisteminin baskılanması, kontrolsüz hücre proliferasyonu, patojenlere karşı konakçının savunma mekanizmasındaki değişimlere ve neoplaziye dahi neden olabilir. Oksitetrasiklin (OTC) okzolonik asit ve florfenikolün sazanlarda ve gökkuşaağı alabalıklarında bağışıklık sistemini baskılayıcı etkileri rapor edilmiştir (Rijkers vd., 1980; Grondel vd., 1985; Swicki vd., 1990; Lunden vd., 1990). Sazan balıklarına oksitetrasiklinin uygulanmasının ise balıklarda eritrosit sayısını azaltmaktadır(Rijkers vd., 1980).

Antibiyotiklerin ve diğer tedavi edici ilaçların balık etinde biriktiği ve bunların insanlar tarafından tüketilmesiyle insan vücuduna geçtiği bildirilmiştir (Arda vd., 2005). Ayrıca tedavi amacıyla kimyasal ilaçların kullanımı sonucu doğal ortamda kimyasal madde kalıntılarının birikimiyle karşılaşmaktadır. Örneğin; balık yetiştiriciliği yapılan birçok işletmelerde ilaç tedavisi sonrasında ağ kafeslerin çevresindeki balık ve kabuklularda farklı düzeylerde oksitetrasiklin ve okzolinik asit tespit edilmiştir (Björklund vd., 1991; Rigos vd., 2004).

Su ürünleri yetiştiriciliği yapan işletmelerin yakınında bulunan kabuklularda da ilaç kalıntıları bulunabilmekte ve bunları tüketen insanların sağlığı açısından tehlikeli bir durum oluşturmaktadır (Björklund vd., 1991). Fazla alındıklarında insan ve hayvanlarda, bağırsak mikroflorası bozulmakta, ekolojik denge ortadan kalkmakta ayrıca tetrasikline dirençli olanların, pseudomonas, proteus, stafilokok, mayaların üremesine ve enfeksiyon oluşturmalarına yol açmaktadır. Bunun yanında böbrek bozuklukları, sağırliklar, periton içi şırıngalarda solunum felci, alyuvarların genç şekillerinde bozukluk, serumda demir artması ve kansızlık yapabilir (Arda, 1997). İlaç kalıntıları sucul ekosistem içerisinde sedimentte mikro fauna üzerinde de etkiye sahiptir. Sucul ekosistemdeki mikro fauna organik madde döngüsünü sağlamaktadır. Sucul ekosistem içerisindeki oksijen tüketimi, amonyak ve

sülfat üretimi mikrobiyal aktiviteye bağlıdır. İlaç kalıntılarının sedimentte birikimi mikrobiyal aktiviteyi etkileyerek organik madde döngüsünü kısıtlar (Capone vd.,1996). Sedimentteki oksitetrasiklin kalıntı miktarının 7 mg/kg'a kadar artmasının, sedimentteki mikrobiyal yoğunluk ve aktiviteyi değiştirmediği bildirilmiştir. Buna karşın, 100-400 mg/kg oksitetrasiklin, okzolinik asit ve flemekuin ilavesi ile mikrobiyal yoğunluğun %40-50 oranında azaldığı ve mikrobiyal aktivitenin %90'a varan oranda azaldığı belirtilmiştir (Hansen vd., 1992).

Oksitetrasiklinin bugüne kadar gerek balık gerekse sudaki etkileri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Rigos vd. (2004), iki önemli çiftlik türü olan *Sparus aurata* (çipura) ve *Diplodus puntazzo* (sivri burun karagöz)'nun dışkı atıklarındaki oksitetrasiklin ve okzolonik asit miktarlarını ölçümlerle hesaplamışlar ve bu ilaçların Akdeniz'deki balık çiftliklerinin potansiyel olarak iki yaygın antibakteriyel ajanı olduğunu bildirmişlerdir. Okzolonik asitin *Sparus aurata*'da %92, *Diplodus puntazzo*'da %88, oksitetrasiklinin ise sırasıyla % 27 ve % 40 oranlarında absorbe edildiğini, dolayısıyla tedavi edilen çipuralarda metabolizma edilmemiş oksitetrasiklinin büyük bir kısmının absorbe edilmeden vücuttan tamamen çıktığını ve dışkı yoluyla bölgesel deniz ortamına bırakıldığını saptamışlardır. Bununda denizel çevrede ilaç kirliliğine karşı ters ekolojik eteklere, dirençli bakteri popölasyonlarının gelişmesine ve akuatik fauna ve florada potansiyel ilaç birikimine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Salmo salar üzerinde yapılan çalışmada (Kerry vd., 1997) balıkların besinlerine vücut ağırlığı başına 112.5 mg/kg olacak şekilde oksitetrasiklin hidroklorür ilave edilerek 12 gün boyunca deneysel tanklar içinde verilmiş bu süre sonunda 5 balığın bağırsak içeriğinden alınan örnekler incelenmiş 25 µg/ml ihtiva eden 2216 V üstü olan ortamda sık sık koloni oluşturan dirençli soylar tanımlamışlardır. Her ilaç verme döneminde ve bu dönemi takip eden 16 günlük ilaç verilmeyen dönemde balıklar beslenmiş ve bu dönemde bağırsaklara ait mikroflorada dirençli soyların ayrımı için hiçbir kanıt bulamamışlardır. Daima yemle beslendikleri mikroflora içindeki en düşük direnç sıklığı % 0.16 iken ilaçlı dönemden sonra bağırsak florasındaki direnç sıklığı ortalamasının % 0.1 - % 9.9 olduğunu saptamışlardır, deneysel dönemin sonuna doğru alınan su numunelerinin de bir kısmın da yüksek direnç sıklığını belirlemişler ve bu durumun yenmemiş besin birikmesi sonucu olabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir araştırmada (Johnsen, 1994), terk edilmiş deniz balıkları çiftliklerinin sedimentlerindeki yağ asitlerinin dönüşümü incelenmiştir. Sedimentler 5 kap içerisine bırakılmış. Bunlardan 3'üne oksitetrasiklin, flumequin, ve okzolonik asit eklenmiş, diğer 2 kapta kontrol grubu olarak oluşturulmuştur, bir yıl boyunca izlenmiştir. Sedimentteki yağ asidi kompozisyonu, direkt methanolosis, yüksek çözünürlük gaz kromatografisi ve çok değişkenli veri analizi ile yapılmıştır. Bütün kaplardaki yağ asitleri toplam miktarının azaldığını ve sedimentteki yağ asidinin doğal ortam yönünde değiştiği tespit edilmiştir.

Björklund vd. (1991), 5 balık çiftliğinde tedaviden sonra sediment ve balıktaki okzolonik asit ve oksiterasiklinin kalıntılarını araştırmışlardır. Oksitetrasiklin ve okzolonik asitle tedavi edilen balıklarda okzolonik asit oksitetrasikline göre daha iyi absorbe edilip daha hızlı vücuttan atıldığı görülmüştür. Okzolonik asit uygulanan çiftlik sedimentlerindeki antibakteriyel hareketin daha hızlı bir kayıp gösterdiğini bildirmişlerdir. Tedavi gören balıklardan ve çiftlikteki sedimentlerden oksitetrasikline karşı dirençli patojenik bakteriler izole ettikleri halde okzolonik asite karşı dirençli patojenik bakteriler bulamamışlardır.

Şili çiftliklerinde *Salmo salar* üzerinde yapılan bir çalışmada (Claudio vd., 2002) hem oksitetrasikline dirençli sudaki bakterilerin sıklığı hem de seçilen soyların direnç düzeyleri araştırılmıştır. Dirençli bakterilerin en yüksek oranları tesislerin dışarı akan su numunelerinde bulunmuştur. Tesise gelen giriş suyunda ise dirençli bakterilerin en düşük seviyeleri tespit edilmiş, 30 veya 100 µg/L oksitetrasiklin kapsayan Tryptic soy agarlardan (TSA) oksitetrasikline dirençli gram (-) bakteriler izole etmişlerdir. Bunlar *Pseudomonas fluorescens* (%28.2), *Stenotrophomonas maltophilia* (%5.8), *Sphingomonas paucimobilis* (%5.8), *Acinetobacter lwoffii* (%4.8), *Pseudomonas putida* (%4.8), *Aeromonas hydrophila* (%9.7), *Burkholderia cepacia* (%3.9), *Brevundimonas vesicularis* (%3.9), *Acinetobacter johnsonii* (%2.9), *Pantoe sp.* (% 2.9) ve *Moraxella sp.* (%2.9) dir.

Pender ve Stobberingh (2008) *Silurus glanis* ve *Anguilla anguilla* tesislerinde antibiyotik direncinin yaygınlık ve derecesini belirlemek için indikatör bakteri olarak hareketli Aeromonods'ları kullanmışlardır. Bir *Silurus glanis* ve *Anguilla anguilla* tesislerinden toplam 29 su örneği alınmış ve sadece Aeromonodsların üremesini sağlayan agarları kullanmışlardır. Her plaktan bir koloni seçerek antibiyotik duyarlılığı test edilmiştir. Ampisilin ve oksitetrasiklin % 100, sulfametoksazol % 24, trimethoprim % 3 ve siprofloksakin ve kloramfenikol % 0 direnç saptanmıştır. Oksitetrasikline dirençli genlerin büyük birikimleri insan sağlığı için bir risk oluşturabilir ve balıkta bulaşıcı hastalıkların

tedavisinde bu antibiyotiğin etkinliğinin büyük önemi olduğunu savunmuşlardır.

Hatha vd. (2005), yetiştirme tesislerindeki *Catla catla*, *Labeo rohita* ve *Ctenophoryngodon idella* gibi tatlı su balıklarının bağırsaklarından hareketli *Aeromonads* izole etmişlerdir. Morfolojik ve fizyolojik gruplamada %61 *Aeromonads hydrophilla*, %30 *Aeromonads caviae*, %7 *Aeromonads sobria* bulunmuştur. Hemoliz en fazla *A. hydrophila*'da, görüldüğü saptanmıştır. Bu türlere antibiyotik duyarlılık testi yapılarak en yüksek oksitetrasiklinde olup, sıralama amoksisilin, ampisilin, novobiosin ve polymiksin-B şeklinde olduğu görülmüştür.

Coyne vd. (2004), balık dokusundaki oksitetrasiklini belirlemek için ilk olarak basit ve hızlı olan likid kromotagrafi kullanmışlardır. Bu metod kas dokusundaki sıvı konsatrasyonu, proteinlerin çökelme ve ayrışma safhasını, HPLC analizi ile spektrofotometrik araştırmayı kapsamaktadır. Metod, yüksek duyarlılık, hassasiyeti ve doğrusallığı ile avantajlı olmakla birlikte az zaman ve çalışma gerektirdiğinden dolayı da avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir başka araştırmada (Pouliquen vd., 2007) üç farklı su tipinde (tatlı su, tuzlu su ve acı su) abiyotik şartlar altında, sudaki antibakteriyel ajanları önemli ölçüde yok etmede kullanılan hidroliz ve fotoliz yöntemiyle oksitetrasiklini, okzolonik asidi, flumequini ve florfenikolü karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Her bir antibakteriyel ajan için iyonsuz suyun fotoliz ve hidrolizi yapılarak çözünmemiş oksijen, pH, ve ışığın etkisini çalışmak amacıyla 7 gün deney süresi planlanmış ve ayrıca her üç su tipine ve her antibakteriyel ajana 14 günlük kinetik deneyler uygulamışlardır. Hidroliz yada fotoliz olayı ile florfenikolün niteliği bozulmazken hidroliz olayının sadece oksitetrasiklinle ilgili yaklaşık % 20'sinin bozulmasına neden olduğunu ve bu süre sonunda 8°C sıcaklığa maruz kaldığını açıklamışlardır.

Soler vd. (2006), *Tinca tinca*'ya 100 mg/kg oksitetrasiklin tek doz şeklinde kas içine enjeksiyonu sonrasında oluşan patolojik etkileri çalışmışlardır. Oksitetrasiklin uygulanmış doku örnekleri 20 günde farklı zamanlarda alınarak %10'luk buffer-formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüştür. Hazırlanan balıklardan kesit alındıktan sonra hematoksilin-eosin ile boyanıp incelemişlerdir. Kas hücrelerinin şırınga edildiği bölgelerde aşırı hücre çoğalması ve inflamasyon reaksiyonları ile beraber kas hücrelerini çevreleyen yerlerde dejenerasyon tespit etmişlerdir. Bu durum deneyin ilk gününde ortaya çıkmıştır. Bahsedilen ana lezyon karaciğer ve böbrekte lokalize olmuştur. 24 saat sonra

karaciğerde yağ dejenerasyonu ve böbrekte tubuler epitelyumda nekrozis, 7. günde ise hematopoietik böbrek dokularında şiddetli nekrozis gözlemlenmiştir.

Morten vd. (2003), *Flavobacterium psychrophilum*'un 3 soyuyla infekte edilmiş yavru alabalık gruplarında oksitetrasiklinin tedavi sonucu deneysel olarak araştırılmıştır. Patojen intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile verilerek hastalandırılan balıklara tedavi olarak, 100 mg/kg/10 gün süreyle oksitetrasiklinli yem verilmiştir. Üç soyun farklı antimikrobiyal duyarlılığı belirlenmiştir. Başarılı tedavi sadece MIC_{OTC} değeri 0.25 µg/ml olan soyda elde edilmiştir. MIC_{OTC} değeri 8.0 µg/ml olan bir soyla hasta olan grupta tedavi etkisi görülmezken MIC_{OTC} değeri 4.0 µg/ml olan soyda tedavi etkisi az görülmüştür. Alabalık yavrularının dış yüzeyinde birdenbire ortaya çıkan hastalık belirtileri invitro verilerine göre oksitetrasiklinin tedavi etkinliğinin doğru tahmin edildiğini açıklamışlardır. Bu çalışmada duyarlılık testinin önemi ve *F. psychrophilumun* antimikrobiyal duyarlılık testi için ortam seçiminin de önemli olduğu vurgulanmıştır.

Çipuralar üzerine yapılan bir çalışmada (Rigos vd., 2006) sürekli oksitetrasiklin banyosu yaptırılarak tedavi edilen çipuralarda oksitetrasiklinin vücuda alınımını ve atılımını incelemişlerdir. Deneyde su sıcaklığı 17-18°C 50 µg/g oksitetrasiklin konsantrasyonu kullanılarak 24 saat banyo yaptırılmıştır. Plazma ve kas numuneleri, 1, 3, 6 ve 24 saat ve 1, 2, 3, 4 ve 6 günlük banyo süreleri sonunda analiz edilmiştir. 24 saatlik banyo süresinin sonunda sırasıyla deri ve plazmada ilaç konsantrasyonları 0,096 ve 0,047 µg/g yada ml kadar az olarak hesaplanmıştır. OTC banyo tedavisinde hesaplanan bu dozajın altı sistemik bakteriyel enfeksiyonları karşılaştırmada mümkün olmayacağı bulgusu çalışmada verilmiştir.

Gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) bakteriyel hastalıklara karşı tedavi amaçlı kullanılan oksitetrasiklinin bu balığın solungaçlarına etkisinin olup olmadığına dair histolojik olarak yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Pratikte en çok tercih edilen kullanım şekli olan banyo uygulamasında, antibiyotikle doğrudan temas halinde olan organların başında solungaçlar, deri ve yüzgeçler gelmektedir. Bu çalışmada birçok bakteriyel hastalığın tedavisinde kullanılan oksitetrasiklinin solunum, boşaltım ve osmoregülasyon gibi önemli görevleri bulunan solungaçlara, bir etkisinin olup olmadığı histolojik olarak araştırılacaktır.

2. MATERYAL ve METOT

Araştırma Kasım 2008-Aralık 2009 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine ait Balık Deneyleri Uygulama Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1. Materyal

Çalışmada ortalama ağırlığı 225 ± 25 g, ortalama total boyu $27,5 \pm 2,5$ cm olan toplam 100 adet gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) kullanıldı. Keban Alabalık Anonim Şirketine ait tesisten sağlanan bu balıklar balık nakil tankıyla taşınarak araştırmanın yapıldığı Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine ait Balık Deneyleri Uygulama Laboratuvarına getirildi. Su giriş ve çıkışı olan havuzuna yerleştirilen balıkların bir süreyle ortama adaptasyonları sağlandı. Belirlenen günlük yem miktarı balıklara uygun öğünlerde verildi. Stok havuzunun temizliği günlük olarak yapıldı.

Deneyisel uygulamada 95x80x75 cm boyutlarında olan 5 adet fiberglass tekneler kullanıldı. Teknelere hava motoruyla oksijen sağlandı. Teknelerdeki su günlük olarak yenilendi. Antibiyotik olarak birçok balık işletmesinde kullanılan oksitetrasiklin hidroklorür (1 gramında 755 mg. Oksitetrasiklin hidroklorür içeren) Primavilin Aqua kullanıldı. Bu antibiyotik Veteriner İlaçları Satan yerel bir firmadan temin edildi.

Çalışmada ayrıca kepçe, lam, lamel, makas, pens, bistüri, küçük cam şişeler, operasyon eldiveni, plastik küvetler, baget, beher, erlen, pH metre, okijen metre, termometre, hassas terazi, etüv, bek alevi, buzdolabı, benmari, plastik boru, mikrotom, ışık mikroskobu, %10'luk nötral tamponlu formalin, alkol, xylol, parafin, hematoksilen ve eosin kullanıldı.

Araştırma tanklardaki suyun sıcaklık, çözünmüş oksijen, pH ve toplam sertliğine ait değerleri arasındaki farklılıkların önemli olup olmadığı varyans analizi kullanılarak tespit edildi. Gruplar arası farklılıklar 0,05 önem derecesine göre değerlendirildi. Belirtilen istatistiksel analiz bilgisayar ortamında SPSS 10.0 paket program (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) kullanılarak yapıldı.

3.2. Metot

Araştırmada 1 kontrol ve 4 deney grubu oluşturuldu. Deney grupları, oksitetrasiklinin farklı konsantrasyon ve süreleri kullanılarak aşağıdaki şekilde uygulandı.

Deney Grupları

1. Deney grubu (15 adet balık) 100 mg/L 1 saat süreyle, 10 gün boyunca, banyo tarzında
2. Deney grubu (15 adet balık) 100 mg/L 2 saat süreyle, 10 gün boyunca, banyo tarzında
3. Deney grubu (15 adet balık) 200 mg/L 1 saat süreyle, 10 gün boyunca, banyo tarzında
4. Deney grubu (15 adet balık) 200 mg/L 2 saat süreyle, 10 gün boyunca, banyo tarzında
5. Kontrol grubu (15 adet balık)



Şekil 1. Fiberglass tekneler içinde banyo yaptırılan balıkların görüntüsü

Deneme süresinin sonunda her deney grubundan alınan balıklar, genel anestezi altında (fenoksietanol 5 ml/L) (Matson ve Ripley, 1989), usulüne uygun biçimde (Arda, 1974) otopsi yapılarak solungaçlardan doku örnekleri alındı. Alınan doku numuneleri %10'luk nötral tamponlu formalin (pH 7,2) solüsyonu içinde 24-26 saat süreyle tespit edildi (Luna, 1968).

Tesbit edilen doku örnekleri tesbit sıvısından arındırılmak üzere tesbit süresi kadar yıkamaya alındı. Dehidrasyon için alkol, parlatmak için xylol serilerinden geçirilip, parafine emdirildikten sonra yine parafinde bloklandı (Luna, 1968). Parafinli dokulardan Leica marka kızaklı mikrotom ile 5-6 μ kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilen-eosin boyaması ile boyandıktan sonra nikon marka araştırma mikroskopunda değerlendirilerek bulgular mikrofotografi ile tespit edildi.

3. BULGULAR

Araştırma gruplarına ait tanklardaki suyun ortalama sıcaklığı $17,2\pm0,8$ °C, çözünmüş oksijen değeri $8,4\pm0,1$ mg/L, pH'sı $7,3\pm0,1$ ve toplam sertliği 320 ± 10 mg CaCO₃/L olarak tespit edildi. Kontrol ve deneme tanklarındaki suyun sıcaklık, çözünmüş oksijen, pH ve toplam sertlik değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0,05$).

Kontrol grubu balıklar ile farklı konsantrasyon ve sürelerde oksitetrasiklin uygulanan deney grubu balıkların solungaçları incelenerek klinik ve histopatolojik bulgular tespit edildi.

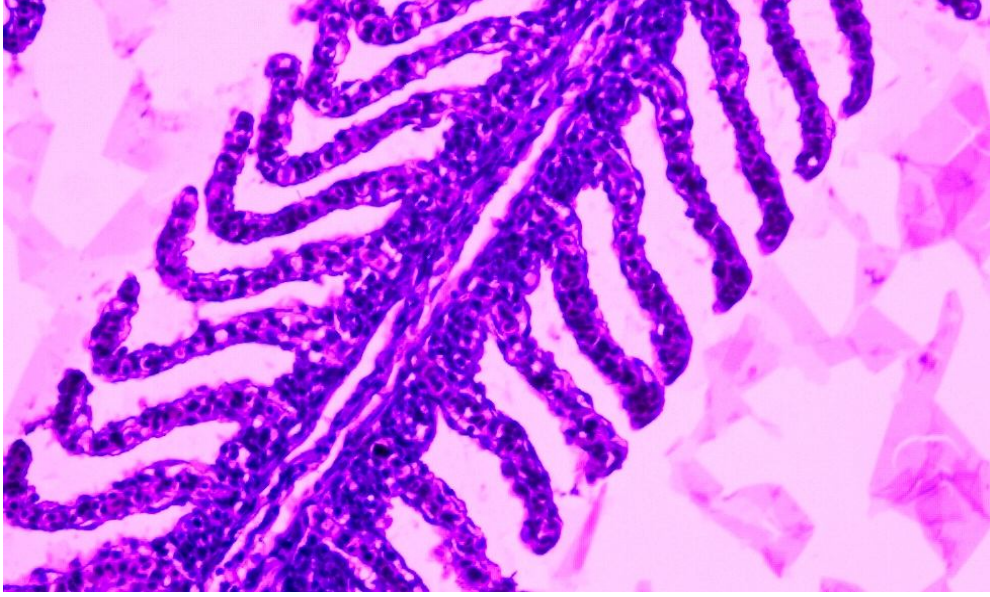
3.1. Klinik Bulgular

Dört deney grubuna ait balıklarda oksitetrasiklin uygulamasından sonra balıklarda hareketlerinde yavaşlama, dengesiz yüzme hareketleri, renklerinde açılma, solungaçlarda solgunluk ve filamentlerde kopmalar gözlemlendi.

3.2. Histopatolojik Bulgular

3.2.1. Kontrol Grubu

Solungaçların her bir filamentinde primer ve sekonder lamellalar tespit edildi (Şekil 2). Lamella üzerinde klorid hücreleri, epitelyum hücreleri ve mukus hücreleri görüldü. Klorid hücreler, lamellar epitelyum boyunca ve özellikle de lamellanın proksimal bölgesinde çok sayıda bulundu. Mukus hücreleri, lamellanın yüzeyinde ve içleri boş bir vakuol şeklinde gözlemlendi. Her bir lamellada pılaster hücreleri vardı.

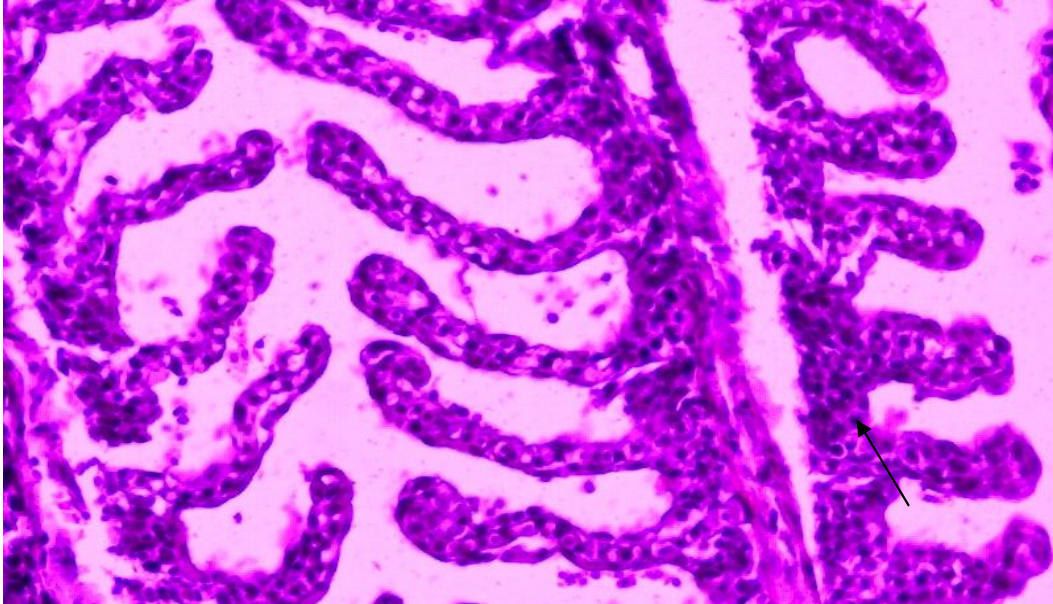


Şekil 2. Kontrol grubu balıkların solungaç görünümü, H&E, X200.

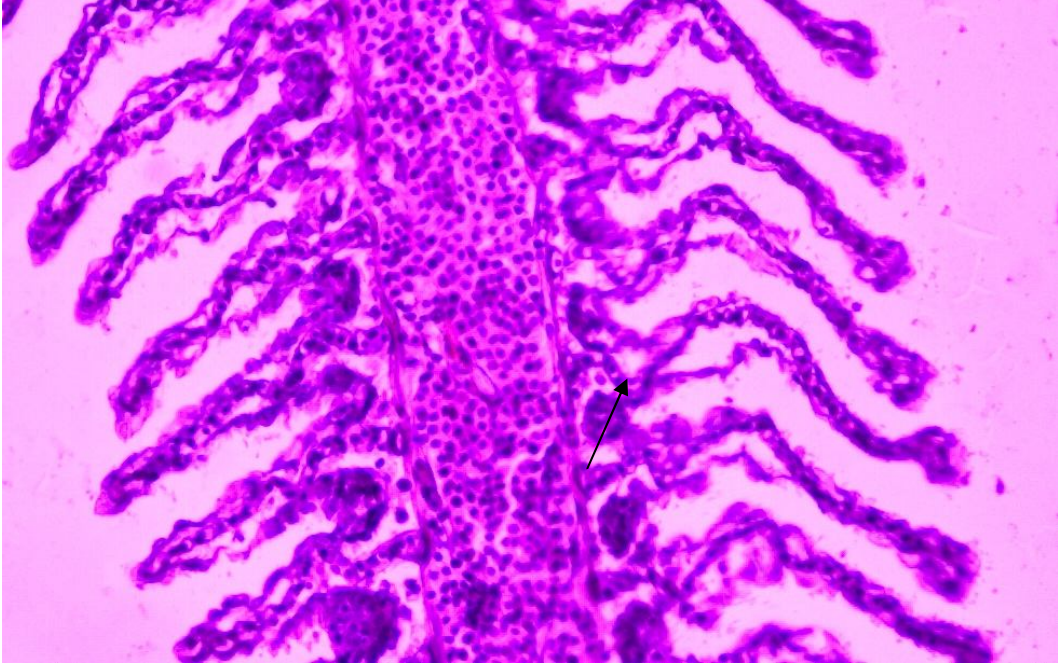
3.2.2. Deney Grupları

3.2.2.1. Deney Grubu (100 mg/L 1 saat süreyle, 10 gün)

Sekonder lamellalarda hipertrofi tespit edildi (Şekil 3). Yine sekonder lamellalarda ayrılmalar belirlendi (Şekil 4).



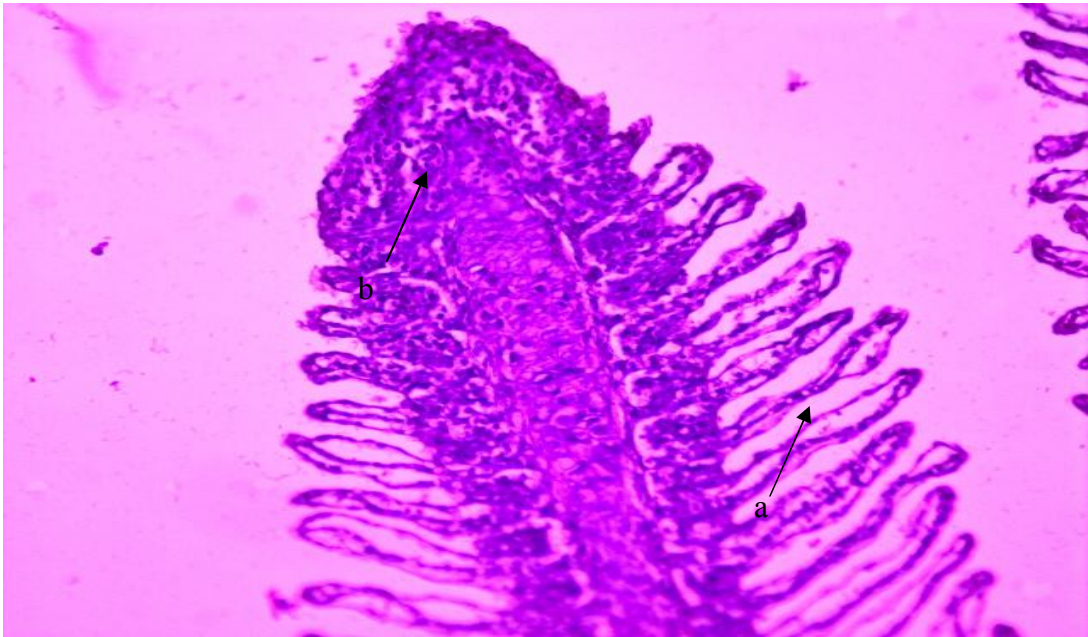
Şekil 3. Sekonderr lamellalarda gelişen hipertrofi, H&E, X200.



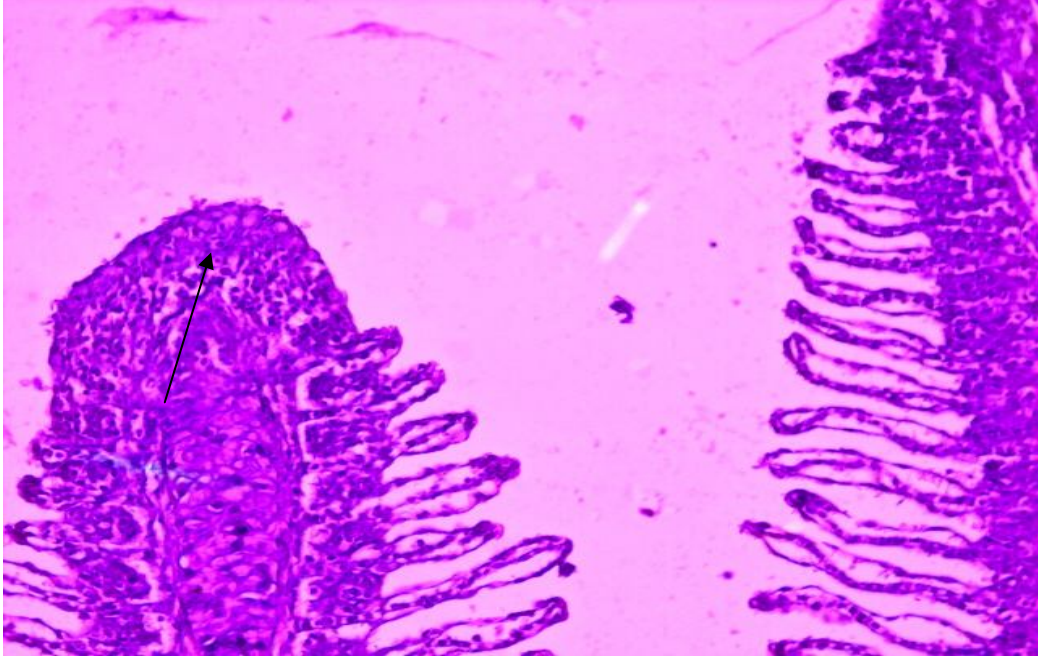
Şekil 4. Sekonder lamellalarda oluşan ayrılmalar, H&E, X200.

3.2.2.2 2. Deney Grubu (100 mg/L 2 saat süreyle, 10 gün)

Sekonder lamellalarda ödem ve primer lamellaya doğru olan bölümlerde hücre proliferasyonu tespit edildi (Şekil 5). Solungaçların distal lamellaları birbirine yapışarak primer lamellada hiperplazinin geliştiği görüldü (Şekil 6).



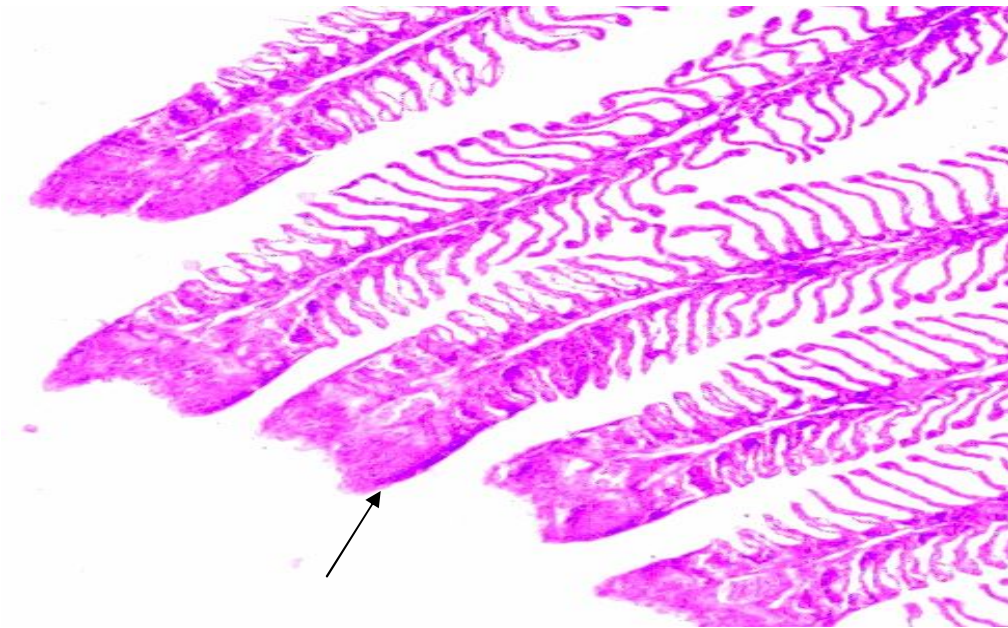
Şekil 5. Sekonder lamellalardaki (a)ödem ve (b)hücre proliferasyonu, H&E, X200



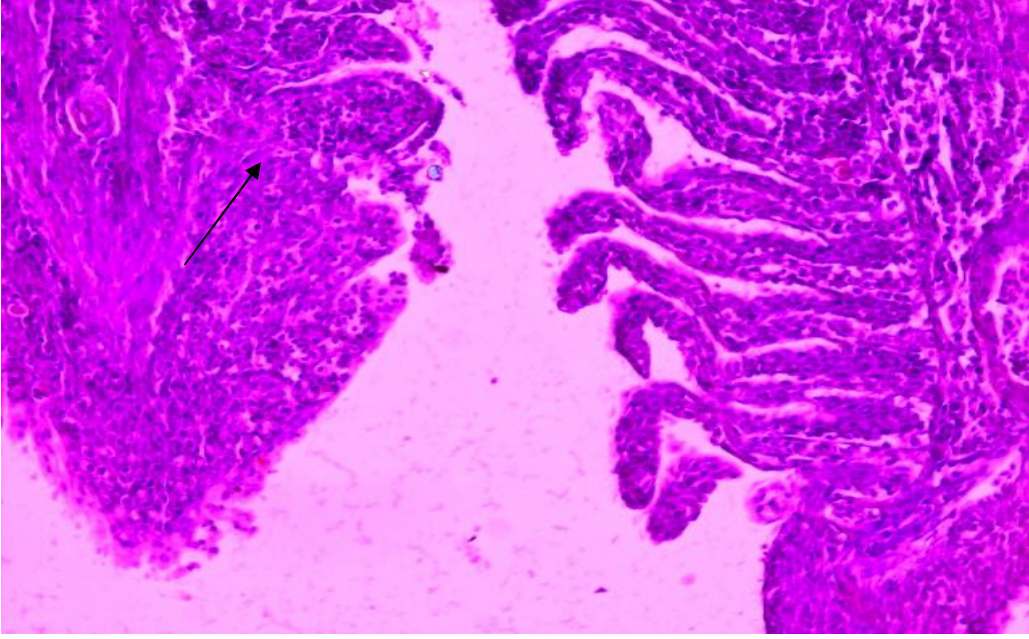
Şekil 6. Primer lamellaların distal kısımlarındaki hiperplazi, H&E, X200.

3.2.2.2 3. Deney Grubu (200 mg/L 1 saat süreyle, 10 gün)

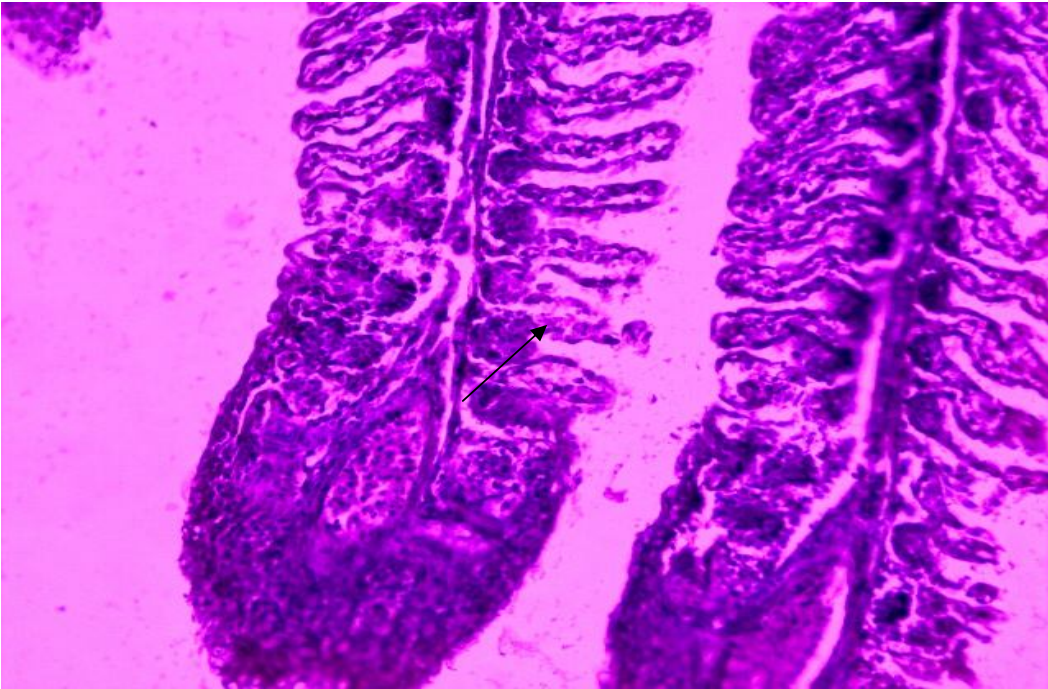
Balıkların solungaçların distal lamellaların birbirine yapışması sonucu primer lamellalarda gelişen hiperplazi gözlemlendi (Şekil 7 ve 8). Primer lamellalarda distal bölüme gidildikçe ödem ve sekonder lamellanın epidermisinde ayrılmalar belirlendi (Şekil 9). Lamellalarda hemoraji gözlemlendi (Şekil 10).



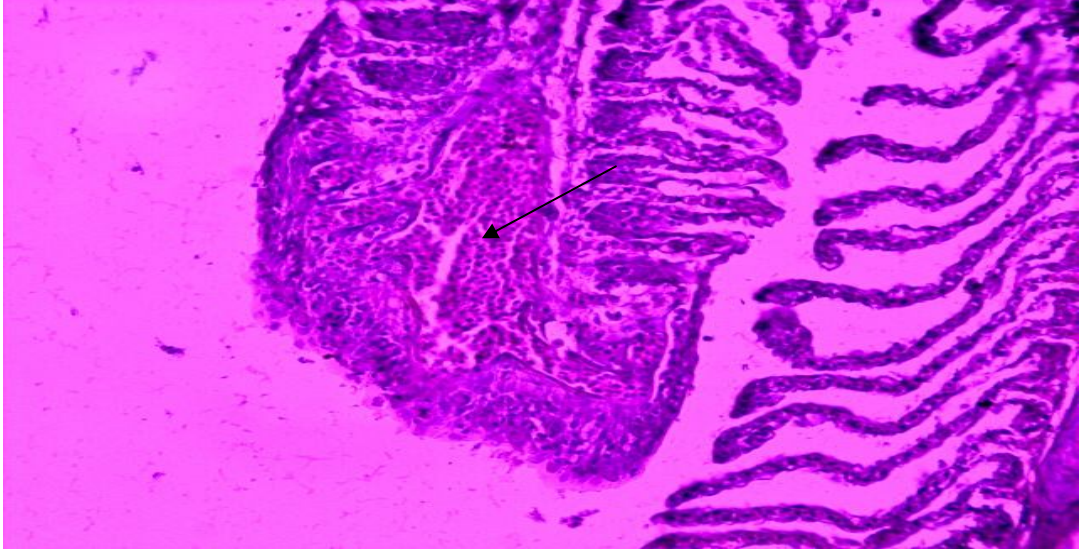
Şekil 7. Lamellalarda birleşmesi sonucu görülen hiperplazi, H&E, X100.



Şekil 8. Lamellalarda görülen hiperplazi, H&E, X200.



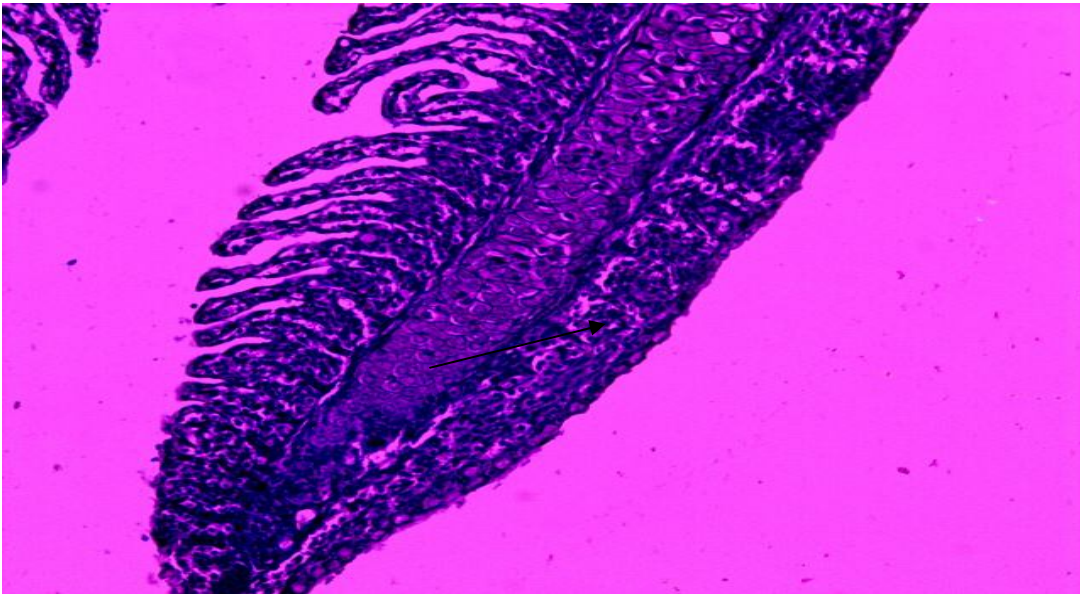
Şekil 9. Sekonder lamella epidermisindeki ayrılmalar, H&E, X200.



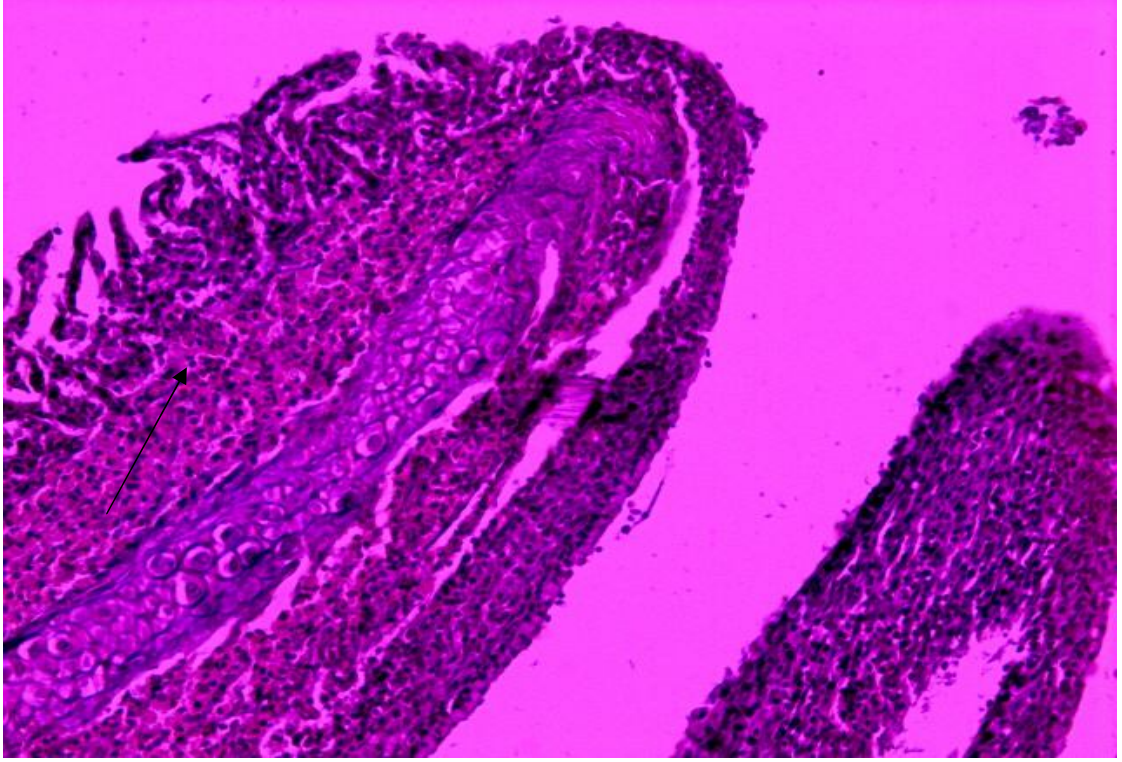
Şekil 10. Lamellalarda görülen hemoraji, H&E, X200.

3.2.2.2 4. Deney Grubu (200 mg/L 2 saat süreyle, 10 gün)

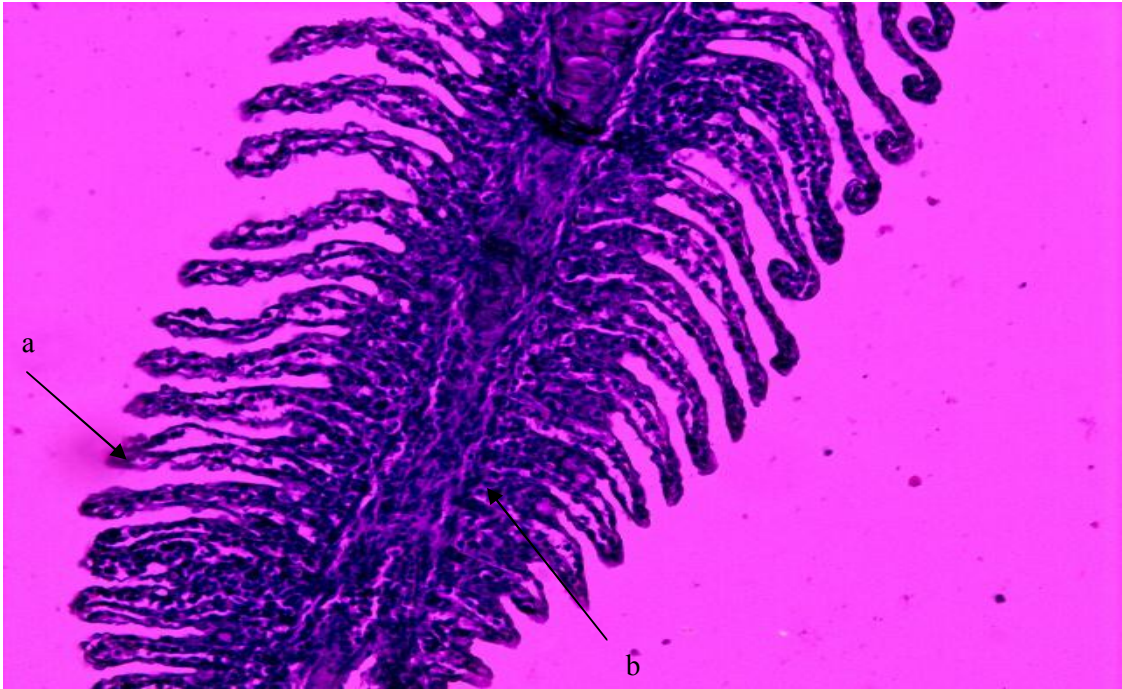
Solungaçların distal lamellaları birbirine yapışması sonucu meydana gelen hiperplazi bir önceki süreye göre artan bir derece gösterdiği tespit edildi (Şekil 11). Sekonder lamellalarda ödem ve ayrılmalar ayrıca primer lamellaya doğru olan bölümde hücre proliferasyonu gözlemlendi (Şekil 12). Lamellalar arasında hemorajili alanlar gözlemlendi (Şekil 13). Sekonder lamellalarda kırılma ve kopmalar görüldü. Primer lamellada farklı kalınlıklar gösteren kıvrımdak yapı belirlendi (Şekil 14).



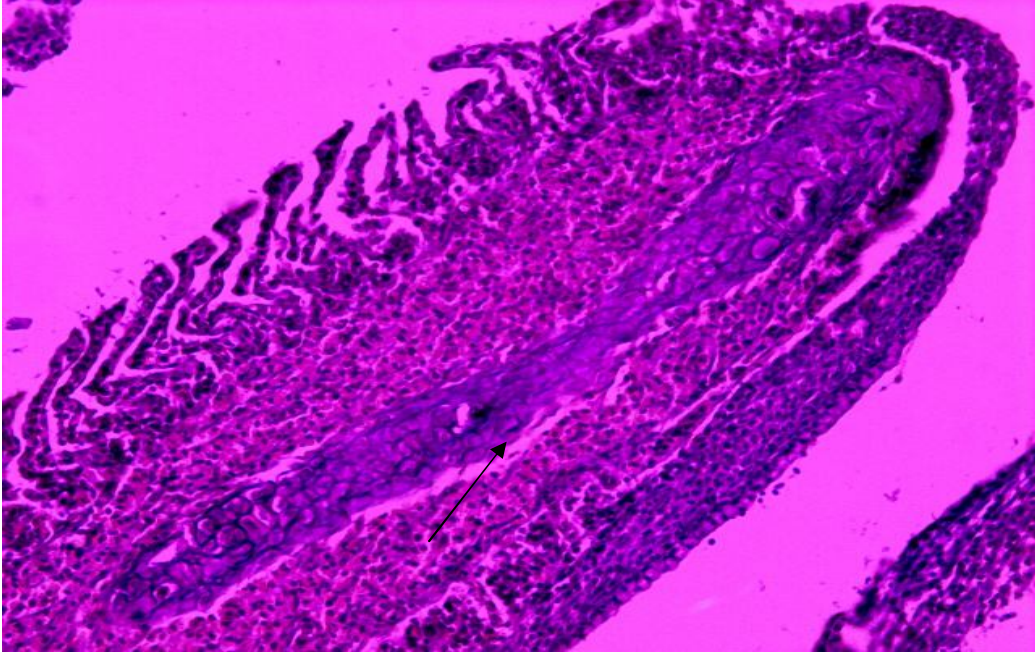
Şekil 11. Lamellalarda görülen hiperplazi, H&E, X200.



Şekil 12. Lamellalar arasında görülen hemorajili alanlar, H&E, X200.



Şekil 13. Sekonder lamellalar arasında görülen (a)ödem ve (b)hücre proliferasyonu, H&E, X200.



Şekil 14. Primer lamelladaki farklı kalınlaşma gösteren kıkırdak yapı, H&E, X200.

4. TARTIşMA ve SONUÇ

Oksitetrasiklinin hem balık hem su hem de sedimentteki birikimi (Johnsen 1994; Björklund vd., 1991; Grondel vd., 1985; Pouliquen vd., 2007; Coyne vd., 2007), antibiyotik duyarlılık testleri (Claudio vd., 2002; Hatha vd., 2005; Morten vd., 2003), balık vücuduna alım ve atımları (Rigos vd., 2006), balıkların bağışıklık sistemine etkileri (Rijkers vd., 1980; Grondel vd., 1985; Swicki vd., 1990; Lunden vd., 1990), balıkların bazı organlarına karşı patolojik etkileri (Soler vd., 2006) çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmıştır.

Yapılan çalışmada gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda bakteriyel hastalıklara karşı tedavi amaçlı kullanılan oksitetrasiklinin bu balığın solungaçlarına etkisinin olup olmadığı histolojik olarak araştırıldı.

Oksitetrasiklin balıklara 50-100 mg./L/günlük doz/50-60dk./10 gün süreyle banyo tarzında; 10 mg./kg. canlı ağırlık/intramüsküler enjeksiyon; 1 ml./250 g. canlı ağırlık/intraperitoneal enjeksiyon ve 50-75 mg./kg. canlı ağırlık/10 gün süreyle yeme katılarak verilmiştir (Arda vd., 2005; URL1). Bu çalışmada ise 100 mg./L (1 saat ve 2 saat süreyle) ve 200 mg./L (1 saat ve 2 saat süreyle) banyo tarzında uygulamaları yapılmıştır.

Soler vd. (2006), *Tinca tinca*’ya 100 mg./kg. oksitetrasiklini tek doz şeklinde kas içine enjeksiyonu sonrasında, enjekte edilen bölgedeki kas hücrelerinde çoğalma ve inflamasyon reaksiyonları ile kas hücrelerini çevreleyen yerlerde dejenerasyon tespit etmişlerdir. Oksitetrasiklinin 100 mg./L/1 saat /10 gün (deney grubu 1) 100 mg./L/2 saat /10 gün (deney grubu 2) 200 mg./L/1 saat /10 gün (deney grubu 3) 200 mg./L/2 saat /10 gün (deney grubu 4) süreyle banyo tarzında uygulanan bu araştırmada ise; incelenen solungaç dokusunda 1. deney grubunda sekonder lamellalarda hipertrofi ve birinci sekonder lamellalarda ayrılmalara; 2. deney grubunda sekonder lamellalarda ödem, hücre proliferasyonu ve primer lamellalarda hiperplazi; 3. deney grubunda primer lamellalarda hiperplazi, ödem ve sekonder lamella epidermisinde ayrılmalara; 4. deney grubunda ise distal lamellada hiperplazi, sekonder lamellada ödem, ayrılmalara, hücre proliferasyonu, hemorajili alanlar, kırılmalara, kopmalara ve primer lamellada farklı kalınlıklar gösteren kıvrımda yapı belirlendi. En hafif patolojik belirtiler 1. deney grubunda görülürken, diğer deney gruplarında dozaj ve süreye bağlı olarak artan derecelerde patolojik etkiler

gözlemlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise (Rigos vd., 2006) çipuraların tedavisinde kullanılan oksitetrasiklinin (17-18 °C 50 µg./g.) 1, 3, 6, 24 saat ve 1, 2, 3, 4, 6 günlük banyo süreleri sonunda plazma ve kas numuneleri analiz edilmiş ve 24 saatlik banyo süresinin sonunda deri ve plazmada ilaç konsantrasyonunu 0.096 ve 0.047 µg./g. kadar az bir miktar belirlemişlerdir.

Sonuç olarak; bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılan oksitetrasiklinin gökkuşağı alabalıkları için en fazla 100 mg./L/1 saat/10 gün süreyle uygulanmasının uygun olacağını; bunun üzerindeki dozaj ve sürelerin balığın solunum, boşaltım ve osmoregülasyon gibi önemli görevleri bulunan solungaçlarına patolojik etkilerinin bulunduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Arda, M.**, 1974, Balıklarda bakteriyel, mantar, viral ve ekolojik nedenlerinden ileri gelen hastalıklar ve tedavisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın No: 300, Yardımcı Ders Kitabı: 201, Ankara
- Arda, M.**, 1997, Temel mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi, No:25, 1. Baskı, 490 s., Arda, Ankara
- Arda, M., M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.**, 2005. Balık Hastalıkları. Medisan Yayın Serisi:61 II. Baskı, Ankara, 230 s.
- Austin, B. and Austin, D.A.** 1999. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish, Third edition. Praxis Publishing, Chichester, UK, 487 p.
- Björklund, H. V., Rabergh, C. M. I. and Bylund, G.**, 1991, Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farm. *Aquaculture*, **97**, (1), 85-96.
- Björklund, H. V.**, 1991. Oxytetracycline and oxolinic acid as antibacterials in aquaculture-analysis, Pharmacokinetics and environmental impacts. Academic Disertation. Department of Biology Abo Akademi University. Abo, Finland. 1-4
- Capone, D. G., Weston, D. P., Miller, V. and Shoemaker, C.**, 1996, Antibacterial residues in marine sediments and invertebrates following chemotherapy in aquaculture. *Aquaculture*, **145**, (1-4), 55-75.
- Claudio, Miranda, D. and Zemelman, R.**, 2002, Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, **212**, (1-4), 31-47.
- Coyne, R., Bergh, Q. and Samuelson, O.B.**, 2004, One step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. *Journal of chromatography B*, **810**, (2), 325-328.
- Hatha, M. Vivekanandhan, A.A., Joice, G. J. and Cristol**, 2005, antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International journal of food microbiology*, **98**, (2), 131-134
- Hansen, P. K., Lunestad, B. T. and Samuelson, O. B.**, 1992, effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in a marine aquaculture sediment. In: Lunestad B. T., 1992. Environmental effects of antibacterial agents

- Grondel, J.L., Gloudemans, A.G.M., van Muiswinkel, W.B., 1985.** The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte responses in culture. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 9, 251-260.
- Johnsen, R. I., 1994,** effects of antibacterial agents on transformation of fatty acids in sediment from a marine fish farm site. *The science of the total environment*, **152**, (2), 143-152
- Kerry, J., Nicgabhair, S. and Smith, P., 1997,** changes in oxytetracycline resistance of intestinal microflora following oral administration of this agent to atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts in a marine environment. *Aquaculture*, **157**, (3-4), 187-195
- Malvisi, J., Rocca, G., Anfossi, P., Giogetti, G., 1996.** Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture*, **147**, 159-168
- Morten, S.B., Madsen, L. and Dalsgard, I., 2003,** efficiency of oxytetracycline treatment in rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum* strains having different in vitro antibiotic susceptibilities. *Aquaculture*, **215**, (1-4), 11-20
- Penders, J. and Stobberingh, E.E., 2008,** antibiotic resistance of motile aeromonads in indoor catfish and eel farms in the southern part of The Netherlands. *International journal of antimicrobial agents*, **31**, (3), 261-265
- Pouliquen, H., Delepee, R., Verdier, M.L., Morvan M.L. and Le Bris H., 2007,** comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions. *Aquaculture*, **262**, (1), 23-28
- Rigos, G., Nengas,I., Alexis, M., 2006,** oxytetracycline uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **261**, (4), 1151-1155
- Rigos, G., Nengas,I., Alexis, M. and troisi, g.m., 2004,** potential drug (oxytetracycline and oxolinicacid) pollution from mediterranean sparid fish farms. *Aquatic toxicology*, **69**, (39), 281-288
- Reed, L. A., Siewicki, T. C., Shah, J. C., 2004.** Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus* *Aquaculture* **232** 11 –28

- Swichi, A. K., Anderson, D. P., Dixon, O. W.,** 1989 Comparisons of nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in salmonids. **Vet. Immunol. Immunopathol.****30**; 23 (1-2): 195-200
- Soler, F., Reja, A., Rubio, L.G. , Miguez, M.P. and Roncero, V.,** 1996, anatomy-pathological effect of oxytetracycline intench (*Tinca tinca*). *Toxicology letters*, **88**, 104
- Treves-Brown, K.M.,** 2000. Applied Fish Pharmacology, Aquaculture series 3, Kluwer Academic Publishers, 309 p.
- Luna L.G.,** 1968, Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York, McGraw-Hill :Book Company.
- Lunden, T., Lilius, E.-M. and Bylund, G.,** 2002. Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture*, **207**; 203-212.
- Mattson, N.S. and Rippe, T.H.,** 1989, Metomidate a better anaesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocain, MS-222, chloro butanol and phenoxethanol. *Aquaculture*, **83**, 89-94.
- Rijkers, G.T., Teunissen, A.G., van Oosterom, R., van Muiswinkel, W.B.,** 1980. The immune system of cyprinid fish. The immuno suppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, **19**, 177- 189.
- Okumus, I.,** 2002. Rainbow trout broodstock managementconstraints and the future. The Turkish J. Fisheries and Aquatic Sciences, 2: 145-155.
- Serezli, R., Çağırğan, H., Okumuş, A., Akhan, S., ve Balta, F.,** 2005. The Effect of oxytetracycline on non-specificimmune response in sea bream (*Sparus aurata* L.1758).Turkish J. of Vet. and Anim. Sci. 29, 31-35.
- URL 1:** <http://www.cinarziraat.com/balikcilik/balikcilik9.asp>

ÖZGEÇMİŞ

18.09.1980 tarihinde Elazığ'da doğdum. İlk ve orta eğitimini Elazığ'da tamamladıktan sonra; 2000 yılında Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi bölümünü kazandım. 2005 yılında mezun oldum. 2006 yılında Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesinde Yüksek lisansa başladım. 2008 yılında Elazığ Keban Alabalık A.Ş. Su Ürünleri mühendisi olarak göreve başladım. Halen bu görevime devam etmekteyim.