

**BAZI ALABALIK İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792)
FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM BAKTERİSİNİN
BELİRLENMESİ, FENOTİPİK VE GENOTİPİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yük. Müh. Mikail ÖZCAN

Doktora Tezi

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU

OCAK-2011

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ALABALIK İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792)
FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM BAKTERİSİNİN
BELİRLENMESİ, FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Mikail ÖZCAN

(Enstitü No:04228201)

Anabilim Dalı: Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Programı: Balık Hastalıkları

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 24Ocak 2011

OCAK-2011

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ALABALIK İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA
(ONCORHYNCHUS MYKISS WALBAUM, 1792) FLAVOBACTERIUM
PSYCHROPHILUM BAKTERİSİNİN BELİRLENMESİ, FENOTİPİK VE
GENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

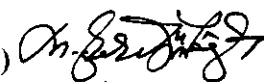
DOKTORA TEZİ

Yük. Müh. Mikail ÖZCAN

(Enstitü No:04228201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih 24 Ocak 2011

Tezin Savunulduğu Tarih: 25 Şubat 2011

Tez Danışmanı:	Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU (F.Ü)	
Diğer Jüri Üyeleri:	Prof. Dr. Metin ÇALTA (F.Ü)	
	Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA (F.Ü)	
	Doç. Dr. Sener ALTUN (UÜ)	
	Doç. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ (F.Ü)	

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve Doktora öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU'na en içten saygılarımla teşekkür ederim.

Çalışmada her türlü olanağı sağlayan Su Ürünleri Fakültesi Dekanlığına akademik ve idari personeline; özellikle doktoram boyunca her türlü desteği sağlayan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ, Prof. Dr. Naim SAĞLAM ve Doç. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ'ye; Üniversitemiz Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışmama izin veren Fakülte Dekanlığına; Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Hasan Basri ERTAŞ'a aynı Anabilim Dalı'nda görev yapan Prof. Dr. Burhan ÇETİNKAYA, Prof. Dr. Adile MUZ ve Prof. Dr. Hasan ÖNGÖR'e özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu - PZR (Polymerase Chain Reaction - PCR) ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Değişken Alanlı Jel Elektforezi) çalışmalarında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Murat KARAHAN ve Dr. Recep KALIN'a; İspanya'da Centro de Biotecnología Animal laboratuvarından bulunan *Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu gönderen Ana del Cerro ARRİETA'ya; tezim için gerekli laboratuvar gereçlerini kullanmama yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Erdal DUMAN ve Yrd. Doç. Dr. Ayşe GÜREL İNANLI'ya antibiyogramda yardımcı olan Bülent TAŞDEMİR'e; alabalık temininde yardımcı olan DSİ Keban Barajı Su Ürünleri Şube Müdürü Yük. Müh. Yasin CELAYİR'e, aynı kurumdan çalışan Dr. Murat PALA'ya; işletmelerde çalışan Su Ürünleri Mühendis'lerinden Muhammet Kartal AKKAYA'ya, Vahdet ENGİN'e, Pınar GEVER'e, Mikail ŞİMŞEK'e, Mürsel BAZNA'ya, Tuba KÜLLAHÇI'ya ve Semrah ŞİMSEK'e; Doktora öğrencisi Hacı Bayram GÖKHAN ve Yüksek Lisans öğrencilerinden Arş. Gör. Sibel BARATA ve Zuhale KARAMAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmamı 1573 nolu proje olarak maddi imkanlar sağlayıp, destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) koordinatörlüğüne çok teşekkür ederim.

ÖNSÖZ

Psikrofilozis (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkül hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS); gökkuşağı alabalığı işletmelerinin kuluçkahanelerinde su sıcaklığının 10 °C'nin altına düştüğü durumlarda meydana gelen, septisemik karakterli, akut seyirli ve öldürücü bir enfeksiyondur. Psikrofilozis, ilk defa ABD'nin batı Virginia eyaletinde 1941 ve daha sonra 1945 yılında görülmüştür. Son yıllarda hastalık dünyada bir çok ülkede görülmektedir. Türkiye'de ilk olarak 1993 yılında yavru gökkuşağı alabalıklarında saptanmış ve daha sonraki yıllarda farklı bölgelere yayılarak gökkuşağı alabalığı üretim tesislerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur. Enfeksiyona neden olan *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin fenotipik ve biyokimyasal özellikleri ile genotipik karakterleri ve antibakteriyel duyarlılıkları izole edildiği coğrafik bölgelere göre değişmektedir. Bu çalışmada, Elazığ ili Keban ilçesinde dört adet yavru üretimi yapan gökkuşağı alabalığı işletmesinden *F. psychrophilum* bakterisi izole edilmiş, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği ile etkenin identifikasyonunun doğrulaması yapılmış ve sonra Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)'de gen tiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda dört gökkuşağı balığı yavru işletmesinden izole edilen bakterilerin referans *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T'ye göre akrabalık ilişkisi ortaya konulmuştur. Ayrıca antibiyogram testi yapılarak izole edilen suşların antibakteriyellere karşı duyarlılıkları tespit edilmiştir.

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II-VIII
ÖZET	IX-XI
SUMMARY	XII-XIV
ŞEKİLLER LİSTESİ	XV-XVII
TABLOLAR LİSTESİ	XVIII
KISALTMALAR LİSTESİ	XIX-XXII
SEMBOLLER LİSTESİ	XXIII-XXIV
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	5
2.1. PSİKROFİLOZ (BAKTERİYEL SOĞUK SU HASTALIĞI, PEDİNKUL HASTALIĞI, RAINBOW TROUT FRY SYNDROME - RTFS)	5
2.1.1. Etiyoloji	5
2.1.2. Epizootioloji	10
2.1.3. Patogenezi	11
2.1.4. Semptomlar	12
2.1.5. Teşhis	13
2.1.5.1. Mikroskopi	13
2.1.5.2. Kültür ve İzolasyon	13
2.1.5.3. Serolojik Testler.....	14
2.1.5.4. Moleküler Yöntemler	15
2.1.5.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	15
2.1.5.4.2. Moleküler Alt Tiplendirme.....	15
2.1.5.4.2.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Değişken Alanlı Jel Elektroforezis).....	15
2.1.6. Koruma ve Kontrol	20
2.1.7. Sağaltım	21
2.3. Bakterilerin Antibakteriyel Duyarlılık Testleri.....	22
3. MATERYAL ve METOT	23

3.1. Materyal	23
3.1.1. Alabalık Yavru Üretimi Yapan İşletmelerin Yeri.....	23
3.1.1.1. Balıkların Elde Edildiği İşletmelerin Konum ve Kapasiteleri.....	24
3.1.1.1.1. I Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler	24
3.1.1.1.2. II Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler	24
3.1.1.1.3. III Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler	25
3.1.1.1.4. IV Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler	25
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	27
3.1.2.1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>'un İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri..	27
3.1.2.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>'un İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri.....	29
3.1.2.2.1. Cytophaga Broth	29
3.1.2.2.2. Tryptone Yeast Extract Salts Broth (TYES-B)	29
3.1.2.2.3. Nitrat Broth.....	29
3.1.2.2.4. Oksidasyon- Fermentasyon Besiyeri (O/F)	29
3.1.2.2.5. Jelatin Hidrolizi	29
3.1.2.2.6. Metil Kırmızısı - Voges Proskauer (MR-VP).....	30
3.1.2.2.7. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glikan)	30
3.1.2.2.8. Simmons Sitrat Yatık Agar	30
3.1.2.2.9. Tryptic Soy Agar (TSA)	30
3.1.2.2.10. Tryptic Soy Broth (TSB).....	30
3.1.2.2.11. Plate Count Agar (PCA)	31
3.1.2.2.12. Mueller-Hinton Agar (MHA)	31
3.1.2.2.13. Kanlı Agar	31
3.1.2.2.14. MacConkey Agar (MCA).....	31
3.1.2.2.15. NaCl içeren TYES	31
3.1.2.2.16. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)	32
3.1.2.2.17. İndol Besiyeri	32
3.1.2.2.18. Eskülin Besiyeri	32
3.1.2.2.19. Nişastalı Agar	32
3.1.2.2.20. Jelatin Broth.....	32
3.1.2.2.21. Kazein hidrolizi.....	32

3.1.2.2.22. Tween 20 ve 80 Hidrolizi.....	33
3.1.2.2.23. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS).....	33
3.1.3. Kimyasallar ve Ayıraçlar	33
3.1.3.1. % 20 Potasyum Hidroksit	33
3.1.3.2. Hidrojen Peroksit (% 3'lük).....	33
3.1.3.3. Gram Boyama Ayıraçları	33
3.1.3.4. Kovaks İndol Ayırıcı	33
3.1.3.5. Oksidaz Ayırıcı	33
3.1.3.6. Lugol Solusyonu (1/5).....	34
3.1.3.7. 400 ppm Povidin/iodin Solusyonu	34
3.1.3.8. Metil Kırmızısı Ayırıcı	34
3.1.3.9. Fenol Kırmızısı Ayırıcı (% 0,2'lik)	34
3.1.3.10. Nitrat A Ayırıcı	34
3.1.3.11. Nitrat B Ayırıcı	35
3.1.3.12. 1/80 Normal'lik Amonyum Oksalat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$)	35
3.1.3.13. 1/80 Normal'lik Potasyum Permanganat (KMnO_4).....	35
3.1.3.14. 1/3 Seyreltilmiş Sülfirik Asit (H_2SO_4).....	35
3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar	35
3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar	35
3.1.4.1.1. Proteinase K Solusyonu (100 mg, Sigma, P2308, St. Louis, MO)	35
3.1.4.1.2. TNES buffer tampon solusyonu	35
3.1.4.1.3. Phenol Equilibrated, Stabilized: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1 (A0889, Applichem, Darmstadt)	36
3.1.4.1.4. Natriumasetat Kristalle	36
3.1.4.1.5. Absolute Ethanol	36
3.1.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar	36
3.1.4.2.1. 10x PZR Buffer (MBI Fermentas)	36
3.1.4.2.2. MgCl_2 (MBI Fermentas)	36
3.1.4.2.3. dNTP Set (100mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; MBI Fermentas)	36
3.1.4.2.4. Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas).....	37
3.1.4.2.5. Primerler	37
3.1.5. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar	37

3.1.5.1. 5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu	37
3.1.5.2. Agarose LE, (Promega, Madison).....	37
3.1.5.3. 100 bp DNA Ladder (50µg/100µl; MBI Fermentas)	37
3.1.5.4. 6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (1 ml; MBI Fermentas).....	37
3.1.5.5. Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt)	38
3.1.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Kullanılan Ayıraçlar.....	38
3.1.6.1. 50 ml 1M Tris Solüsyonu	38
3.1.6.2. 200 ml 0,5 M EDTA Solüsyonu	38
3.1.6.3. 50 ml % 10 Sarcosyl Solüsyonu.....	38
3.1.6.4. 250 ml HST (100 mM Tris, 100mM EDTA pH 8) Solüsyonu.....	38
3.1.6.5. 250 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 7.6) Solüsyonu	38
3.1.6.6. 1000 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8).....	39
3.1.6.7. 100 ml Hücre Lizis Buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8 + % 1 Sarcosyl)	39
3.1.6.8. 50 ml Hücre Lizis solüsyon I (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA).....	39
3.1.6.9. 50 ml Hücre Lizis Solüsyon II (0.5 M EDTA, % 1 sarcosyl)	39
3.1.6.10. 25 ml 10X H buffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 1000 mM NaCl, 10 mM Dithioerythritol).....	39
3.1.6.11. 15 ml % 20 SeaKem Gold (SKG).....	39
3.1.6.12. 500 ml 10 X TBE.....	40
3.1.7. Antibakteriyel Duyarlılık Testleri	40
3.1.8. Referans Kültür	41
3.1.9. Kullanılan Diğer Malzemeler	42
3.1.10. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Araştırıldığı Yumurta, Sperm, Ovaryum Sıvısı, Keseli Yavru, Yavru, Su ve Yem Örnekleri	42
3.2. Metot.....	48
3.2.1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un İzolasyonu	48
3.2.1.1. Gökkuşluğu Alabalığının Yumurta, Dölenmiş Yumurta, Gözlenmiş Yumurta, Besin Keseli Yavru ve Yavru Örneklerinin Hazırlanması	48
3.2.1.2. Ticari Alabalık Yem Örneklerinin Hazırlanması	49
3.2.1.3. Alabalık İşletmelerindeki Su Örneklerinin Hazırlanması.....	50
3.2.4. Katı ve Sıvı Besiyerlerine Ekimler	50

3.2.3. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un İdentifikasyonu.....	50
3.2.3.1. Gram Boyama	51
3.2.3.2. Katalaz Testi	51
3.2.3.3. Fleksirubin Pigment Testi.....	51
3.2.3.4. Oksidaz (Sitokrom Oksidaz) Testi	51
3.2.3.5. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glikan) Testi.....	52
3.2.3.6. İndol Testi ve Hareket Muayenesi	52
3.2.3.7. Metil Red (MR) - Voges Proskauer (VP) Testleri	52
3.2.3.8. Nitrat Redüksiyon Testi	52
3.2.3.9. Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) Testleri	53
3.2.3.10. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase (ONPG) Testi.....	53
3.2.3.11. Dekarboksilase Testi	53
3.2.3.12. Jelatin Hidrolizasyon Testi	53
3.2.3.13. Simmons Sitrat Testi	54
3.2.3.14. Üreaz Testi	54
3.2.3.15. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Oluşumu.....	54
3.2.3.16. Glukoz ve Laktoz Testleri.....	54
3.2.3.17. Hemoliz Testi	55
3.2.3.18. Nişasta Hidrolizasyon Testi	55
3.2.3.19. Eskülin Hidrolizasyon Testi.....	55
3.2.3.20. Kazein Hidrolizasyon Testi.....	55
3.2.3.21. Tween 20 ve Tween 80 Hidrolizasyon Testi	56
3.2.3.22. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri	56
3.2.3.23. Çeşitli Sıcaklıklarda (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37°C) Üreme.....	56
3.2.3.24. Çeşitli Tuzluluk Oranlarında (% 0.0, 0.5, 1.0, 2.0) Üreme.....	56
3.2.3.25. Tryptic Soy Agar, Tryptic Soy Broth, Plate Count, Mueller-Hinton, Kanlı ve Macconkey Agarlarda Üreme	56
3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)'unda <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Teyit Edilmesi İçin DNA İzolasyonu.....	57
3.2.5. DNA'nın Çoğaltılması İçin PZR Karışımının Hazırlanması ve Uygulanması.....	57
3.2.6. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)	

ile Moleküler Alt Tiplendirilmesi.....	59
3.2.6.1. İzolatların Hazırlanması	59
3.2.6.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi	59
3.2.6.3. PFGE için <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un DNA İzolasyonu	59
3.2.6.4. DNA'nın Restriksiyon enzimi (RE) ile Kesim İşlemi İçin Hazırlanması	60
3.2.6.4.1. DNA'nın <i>XhoI</i> Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesilmesi.....	60
3.2.6.4.2. DNA'nın <i>BlnI</i> Restriksiyon enzimi (RE) ile kesilmesi.....	61
3.2.6.5. Enzimle Kesilmiş DNA'lı Agaroza Kalıpların Jel Kasetine Yerleştirilerek Üzerine Agaroza Jelin Dökülmesi ve Jel Bantlarının Analizi	61
3.2.7. Antibakteriyel Testler	64
3.2.8. Su Sıcaklığı, Çözünmüş Oksijen, pH ve Organik Madde Miktarının Ölçülmesi	64
3.2.9. İstatistik analizi.....	64
4. BULGULAR	65
4.1. I Nolu Gökkuşuğu Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi	65
4.2. II Nolu Gökkuşuğu Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi.....	72
4.3. III Nolu Gökkuşuğu Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi	75
4.4. IV Nolu Gökkuşuğu Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi	78
4.5. I, II, III, IV Nolu Gökkuşuğu Alabalığı Üretim İşletmelerinin Toplu Olarak İncelenmesi	81
4.6. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un İzolasyonu	83
4.6.1. Yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla yıkanmış yumurta, Sperm, Ovaryum sıvısı, Dölenmiş Yumurta, Gözlenmiş Yumurta Keseli Yavru ve Yavru Örneklerinden Besiyelerine Yapılan Ekimler.....	83
4.6.2. Katı Besiyelerinde Üreme	84
4.7. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un İdentifikasyonu.....	85
4.8. DNA İzolasyonu Yapılan <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Teyit Edilmesi.....	90
4.9. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile Moleküler Alt Tiplendirilmesi.....	91
4.10. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları	95
4.10.1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Antibakteriyel Duyarlılık Durumları....	95

4.10.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un Antibakteriyel Duyarlılık Yüzde Oranları	99
4.11. İşletmelerde Kullanılan Suyun Sıcaklığı, Çözünmüş Oksijeni, pH, Organik Madde Miktarları	102
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	115
6. ÖNERİLER.....	122
KAYNAKLAR.....	123
ÖZGEÇMİŞ	141

ÖZET

**BAZI ALABALIK İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792)
FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM BAKTERİSİNİN BELİRLENMESİ,
FENOTİPİK VE GENOTİPİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Mikail ÖZCAN

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

2011, Sayfa: 141

Bu çalışma ile Elazığ ili Keban ilçesinde bulunan dört ayrı Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) işletmesindeki yavruarda *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin varlığı ile fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla, Aralık 2008 ve Temmuz 2009 tarihleri arasında alabalık işletmelerinden yumurta, döllenmiş yumurta, ovaryum sıvısı, sperm, gözlenmiş yumurta, keseli yavru, 5 gramdan küçük yavru, 5 gramdan büyük yavru, su ve yem örnekleri alındı.

F. psychrophilum izolasyonu için; Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (CB), Modified Anacker ve Ordal Agar (MAOA), Modified Anacker ve Ordal Broth (MAOB), Tryptone Yeast Extract Salt Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Extract Salt Broth (TYES-B), Enriched Anacker ve Ordal + Fetal Bovine Serum+ Agar (EAO+FBS+A), Enriched Anacker ve Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+ B), Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin (TYESA+ T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum (TYFBS) agarlar kullanıldı. Bu besiyerleri 15 °C’de 5–7 gün süreyle etüvde inkübe edildi. Üreyen saf sarı renkteki kolonilerin fenotipik özellikleri belirlendi. Ayrıca antibiyogram duyarlılık testi disk difüzyon yöntemine göre yapıldı.

İşletmelerden alınan 175 adet yumurta, 185 adet ovaryum sıvısı (2 ml’lik), 200 adet sperm (2 ml’lik) 185 adet povidin/iodin solüsyonuyla yıkanmış yumurta, 205 adet

döllenmiş yumurta, 240 adet gözlenmiş yumurta, 510 adet keseli yavru, 400 adet 5 gramdan küçük yavru, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı 120 adet yem ve 204 adet su örneği olmak üzere toplam 4024 adet örnek bakteriyolojik olarak incelendi. Bu örneklerde 160 adet (% 3,97) *F. psychrophilum* izole edildi. Bu suşların 18'i (% 10,28) yumurtadan, 13'ü (% 7,02) ovaryum sıvısından, 6'ı (% 3,24) povidin/iodin solüsyonuyla yıkanmış yumurtadan, 14'ü (% 6,82) döllenmiş yumurtadan, 14'ü (% 7,77) gözlenmiş yumurtadan, 13'ü (% 2,54) keseli yavrudan ve 15'i ise (% 3,75) 5 gramdan küçük yavruardan izole edildi. Beş gramdan büyük sağlıklı yavruların dalağından 8 adet (% 4), karaciğerinden 5 adet (% 2,5), böbreğinden 4 adet (% 2) ve bağırsağından 1 adet (% 0,5) *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapıldı. Yine 5 gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık dalağından 17 adet (% 8,5), karaciğerinden 10 adet (% 5), böbreğinden 10 adet (% 5), bağırsağından 6 adet (% 3) ve işletmedeki sudan da 6 adet (% 2,94) *F. psychrophilum* izolasyon ve identifikasyonu yapıldı.

Fenotipik ve biyokimyasal özellikler göre belirlenen 160 adet *F. psychrophilum* suşunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğiyle doğrulanmasında iki farklı primer kullanıldı. Akabinde bu suşların tamamının moleküler olarak *F. psychrophilum* olduğu teyit edildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulanan suşların Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tekniği ile gen tiplendirmesi yapıldı. Bunun sonucunda dört ayrı yavru alabalık işletmesinden izole edilen suşların referans *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T ile yakın akraba olduğu tespit edildi.

Antibakteriyel disk sonuçlarına göre, *F. psychrophilum* suşları; Amoksisilin, Amoksisilin/Klavulanik asit, Amikasin, Ampisilin, Kloramfenikol, Sefazolin, Enoksasin, Optokin, Neomisin, Vankomisin, Sefoksitin, Nalidiksik Asit, Aztreonam, Linkomisin ve Trimetoprim (% 100); Penisilin ve Klindamisin (% 78,12); Ofloksasin ve Gentamisin (% 78,75); Eritromisin ve Sulfametoksazol (% 55,62) ile Furazolidone (% 15,62) gibi antibakteriyellere karşı direnç gösterdiği görüldü. *F. psychrophilum*; Eritromisin ve

Sulfametoksazol (% 28,12); İmipenem (% 21,87); Nitrofurantin, Tobramisin ve Netilmisin (% 21,25); Seftriakson, Sefoperazon, Klaritromisin, Piperasillin, Basitrasin ve Trimetoprim + Sulfametoksazol (% 16,25); Penisilin ve Klindamisin (% 12,50) gibi antibakteriyellere de orta derecede duyarlı olduğu tespit edildi. Yine *F. psychrophilum*; Oksitetrasiklin, Florfenikol, Enrofloksasin ve Siprofloksasin (% 100) ile Furazolidone (% 84,37); Trimetoprim + Sulfametoksazol, Seftriakson, Sefoperazon, Klaritromisin ve Piperasillin (% 83,75); Tobramisin, Nitrofurantoin ve Netilmisin (% 78,75); İmipenem % 78,12; Streptomisin (% 77,5); Ofloksasin (% 21,25); Eritromisin ve Sulfametoksazol (% 16,25); Penisilin ve Klindamisin (% 9,37) antibakteriyellerine ise duyarlı olduğu belirlendi.

Sonuç olarak bu çalışmada, Elazığ ili Keban ilçesindeki dört farklı işletmede *F. psychrophilum* etkenini taşıdığı tespit edildi. *F. psychrophilum* kültür yöntemiyle identifikasyonu 3 hafta sürerken, Polimeraz Zincir Reaksiyon tekniği ile 24 saat içerisinde yapıldı. Pulsed Field Gel Electrophoresis tekniği ile *F. psychrophilum*'un alt tiplendirilmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Ancak *F. psychrophilum*'a bağlı enfeksiyon ve salgınların epidemiyolojisi daha iyi anlaşılması için Türkiye'nin farklı bölgelerinde izole edilen suşlar kullanılarak daha detaylı bilgi sağlanacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Flavobacterium psychrophilum*, Gökkuşacağı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Değişken Alanlı Jel Elektroforezi), Antibiyogram test.

SUMMARY

IDENTIFICATION AND INVESTIGATION OF PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* IN FRY RAINBOW TROUTS (*ONCORHYNCHUS MYKISS*) IN SOME TROUT FARMS

PhD Thesis

Mikail ÖZCAN

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Aquaculture

2011, Page: 141

In this study, it was aimed to identify and investigate phenotypic and genotypic characteristics of *Flavobacterium psychrophilum* in four rainbow trout farms in Keban district of Elazığ province. For this purpose, eggs, fertilized eggs, ovarian liquid, sperm, eyed eggs, larvae with egg sac, fry under 5 g, fry over 5 g, water and food samples were collected.

For isolation of *Flavobacterium psychrophilum*; Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (CB), Modified Anacker and Ordal agar (MAOA), Modified Anacker and Ordal Broth (MAOB), Tryptone Yeast Extract Salt Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Extract Salt Broth (TYES-B), Enriched Anacker and Ordal + Fetal Bovine Serum+ Agar (EAO+FBS+A), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+B), Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin (TYESA+ T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum (TYFBS) agars were used. These media were incubated for 5-7 days at 15 °C and phenotypic characteristics of colonies pure yellow colour were identified. Antibigram sensitivity test was also applied according to disk diffusion method.

A total of 4024 samples; 175 eggs, 205 fertilized eggs, 185 eggs washed with povidin/iodin solution, 185 ovarian liquid (2 ml), 200 sperm (2 ml), 240 eyed eggs, 510

larvae with egg sac, 400 fry under 5 g, 200 spleen of healthy fry over 5 g, 200 liver of healthy fry over 5 g, 200 kidney of healthy fry over 5 g, 200 intestine of healthy fry over 5 g, 200 spleen of newly dead and suspicious from disease fry over 5g, 200 liver of newly dead and suspicious from disease fry over 5 g, 200 kidney healthy of newly dead and suspicious from disease fry over 5 g, 200 intestine of newly dead fry over 5 g and suspicious from disease, 120 food and 204 water samples obtained from fish farms were examined as bacteriologically. From these samples; 160 (3.97 %) *Flavobacterium psychrophilum* were isolated. 18 (10.28 %), 13 (7.02 %), 6 (3.24 %), 14 (6.82 %), 14 (7.77 %), 13 (2.54 %) and 15 (3.75 %) of these strains was isolated in eggs, ovarium liquid, eggs washed with povidin/iodin solution, fertilized eggs, eyed eggs, larvae with egg sac, and fry under 5 g respectively. 8 (4 %), 5 (2.5 %), 4 (2 %) and 1 (0.5 %) of *Flavobacterium psychrophilum* were isolated from spleen, liver, kidney and intestine of healthy fry over 5 g respectively. Again 10 (5 %), 10 (5 %), 6 (3 %) and 6 (2.94 %) of *Flavobacterium psychrophilum* were isolated from spleen, liver, kidney and intestine of healthy fry over 5 g and suspicious from disease and water of fish farms respectively.

Two different primers were used to confirm 160 *Flavobacterium psychrophilum* with PCR after determined according to the phenotype and genotype characteristics. Subsequently, these strains were confirmed as *Flavobacterium psychrophilum* with DNA.

Gene typing was performed with PFGE technique on strains confirmed with PCR. As a result of this, it was decided that strains obtained from four different fish farms was close relative with reference *Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947^T.

According to the results of antibacterial disc, *Flavobacterium psychrophilum* strains showed strength against antibacterial; (78.75 %) Amoxicillin, Amoxicillin / Clavulanic Acid, Amikacin, Ampicilin, Chloramphenicol, Cefazolin, Enoxacin, Optochin, Neomicin, Vankomisin, Cefoxitin, Nalidixic Acid, Aztreonam, Linkomicin and Trimetoprim (100 %); Penicillin and Clindamycin (78.12 %); Ofloxacin and Gentamicin; (55.62 %) Erythromycin and Sulphamethoxazole (15.62 %) Furazolidone. It was determined that *Flavobacterium psychrophilum* was moderately sensitive to antibacterial; (28.12 %) Erythromycin and Sulphamethoxazole; (21.87 %) Imipenem; (21.25 %) Nitrofurantoin, Tobramicin and Netilmicin; (16.25 %) Ceftriaxone, Cefoperazone, Clarithromycin, Piperacillin, Bacitracin and Trimethoprim+Sulphamethoxazole; (12.50 %) Penicillin and Clindamycin. Again, *Flavobacterium psychrophilum* was found sensitive to antibacterial;

(100 %) Oxytetracycline, Florfenikol, Enrofloxacin and Ciprofloxacin; (84.37 %) Furazolidone; % (83.75 %) Trimethoprim+Sulphamethoxazole, Ceftriaxone, Cefoperazone, Clarithromycin and Piperacillin; (78.75 %) Tobramycin, Nitrofurantoin and Netilmicin; (78.12 %) Imipenem; (77.5 %) Streptomisin; (21.25 %) Ofloksasin; (16.25 %) Eritromisin and Sulphamethoxazole; (9.37 %) Penisilin and Klindamisin.

Consequently, *F. psychrophilum* was determined in four fish farms in Keban district of Elazığ province. While the identification period of *F. psychrophilum* with culture method was taken three weeks, it was performed in 24 hours. Sub-typing of *F. psychrophilum* with Pulsed Field Gel Electrophoresis technique was performed successfully. However, it was thought that to well understand infection and epidemiology of *F. psychrophilum*, detailed information will be obtained by using strains isolated from different region of Turkey.

Key Words: *Flavobacterium psychrophilum*, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Polymerase Chain Reaction (PCR), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Antibiotic disc.

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 2.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un mikroskopda görünüşü.....	7
Şekil 2.2. <i>F. psychrophilum</i> 'un elektron mikroskopunda görünüşü.....	8
Şekil 2.3. <i>F. psychrophilum</i> 'un kolonisi	8
Şekil 2.4. PFGE analizi	17
Şekil 2.5. PFGE'nin çeşitli akım yönleriyle çalışması	18
Şekil 3.1. Yavru üretimi yapan gökkuşağı alabalığı işletmelerinin bulunduğu Keban ilçesi	23
Şekil 3.2. Keban ilçesinde bulunan yavru gökkuşağı alabalığı işletmelerinin konumları.....	26
Şekil 3.3. Erkek gökkuşağı alabalığı anaçlarından sperm sağımı.	43
Şekil 3.4. Gökkuşağı alabalığından sağım yoluyla alınan sperm.	43
Şekil 3.5. Dişi gökkuşağı alabalığı anaçlarından yumurta sağımı.....	44
Şekil 3.6. Dişi Gökkuşağı alabalığı anaçlarından alınan ovaryum sıvısı.	44
Şekil 3.7. Dişi gökkuşağı alabalığı yumurtaları.	44
Şekil 3.8. Dölllenmiş gökkuşağı alabalığı yumurtaları.	45
Şekil 3.9. Gözlenmiş gökkuşağı alabalığı yumurtaları.....	45
Şekil 3.10. Gökkuşağı alabalığının keseli yavruları.	46
Şekil 3.11. Besin kesesini absorbe etmiş gökkuşağı alabalığı yavruları.	46
Şekil 3.12. Homojenizasyon için keseli alabalık yavrularının poşete yerleştirilmesi.	46
Şekil 3.13. Homojenizasyon için alabalık yavrularının poşete yerleştirilmesi.....	47
Şekil 3.14. Beş gramdan büyük yavru balıkların poşetle taşınması.	47
Şekil 3.15. Homojenize alabalık yumurtası (a) ve döllenmiş yumurtası (b).	48
Şekil 3.16. Homojenize gözlenmiş alabalık yumurtası	48
Şekil 3.17. Homojenize besin keseli alabalık yavrusu.	49
Şekil 3.18. Homojenize 5 gramdan küçük alabalık yavrusu.	49
Şekil 3.19. Jel tarağının uç kısmına agaroz kalıp yerleştirilmesi.	62
Şekil 3.20. Agaroz kasetine Jel tarağının yerleştirilmesi ve agarozun dökülmesi.	62
Şekil 3.21. PFGE jel tankının içindeki DNA'nın yürütülmesi.	63
Şekil 4.1. I nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı	67

Şekil 4.2. İşletmede görülen toplu alabalık ölümleri.....	68
Şekil 4.3. Hasta alabalıkda görülen asites.	68
Şekil 4.4. Hasta alabalıkda görülen ekzoftalmus.....	69
Şekil 4.5. Hastalıklı alabalıklarda deride koyulaşma	69
Şekil 4.6. Hastalıklı alabalığın dorsal ve kavdal yüzgecinde oluşan beyaz renkteki lezyonlar.	70
Şekil 4.7. Hastalıklı alabalıkda kavdal yüzgecin tahrip olması ve radiusların ortaya çıkması.....	70
Şekil 4.8. Hastalıklı yavru alabalığın iç organlarının çıkarılması.	71
Şekil 4.9. Hastalıklı alabalığın iç organları.	71
Şekil 4.10. II nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı .	74
Şekil 4.11. III nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı	77
Şekil 4.12. IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı.	80
Şekil 4.13. I, II, III, IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı.....	83
Şekil 4.14. TYES-A ve EAO+FBS agarda ilk ekimden sonra çoğunluğu sarı renkte olan karışık koloniler.	84
Şekil 4.15. TYES –A ve EAO+FBS agarda üreyen saf koloniler.	85
Şekil 4.16. <i>F. psychrophilum</i> DNA’larının, GYRA-FP1F, GYRA-FP1R primer çifti kullanılarak PZR’de analizi sonucu oluşan Flavobacterium cinsine ait 396 bp’lik bantları gösteren agaroz jel	90
Şekil 4.17. <i>F. psychrophilum</i> DNA’larının, PSY1 190–206, PSY2 1278–1262 primer çifti kullanılarak PZR’de analizi sonucu oluşan <i>F. psychrophilum</i> türüne ait 1089 bp’lik bantları gösteren agaroz jel.	91
Şekil 4.18. <i>F. psychrophilum</i> ’un kromozomal DNA’sının <i>XhoI</i> enzimi ile kesilmesi sonucu agaroz jeldeki bantları.	92
Şekil 4.19. <i>F. psychrophilum</i> ’un kromozomal DNA’sının <i>BlnI</i> enzimi ile kesim sonucu oluşan agaroz jeldeki bantları.....	93
Şekil 4.20. <i>F. psychrophilum</i> NCIMB 1947 ^T referans suş ve işletmelerde izole edilen <i>F. psychrophilum</i> PFGE profilleri	94
Şekil 4.21. <i>F. psychrophilum</i> suşlarının antibakteriyellere olan dirençlilik yüzde oranları.....	101

Şekil 4.22. <i>F. psychrophilum</i> suşlarının antibakteriyellere karşı orta derecede duyarlılık yüzde oranları.....	101
Şekil 4.23. <i>F. psychrophilum</i> suşlarının antibakteriyellere karşı duyarlılık yüzde yüzde oranları.	102
Şekil 4.24. I nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.	104
Şekil 4.25. I nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen miktarlarının aylara göre dağılımı.....	104
Şekil 4.26. I nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.	104
Şekil 4.27. I nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarlarının dağılımı. .	105
Şekil 4.28. II nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.	107
Şekil 4.29. II nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen miktarlarının aylara göre dağılımı.....	107
Şekil 4.30. II nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.....	107
Şekil 4.31. II nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarlarının dağılımı ..	108
Şekil 4.32. III nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.....	110
Şekil 4.33. III nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen miktarlarının aylara göre dağılımı.....	110
Şekil 4.34. III nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.	110
Şekil 4.35. III nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarının dağılımı....	111
Şekil 4.36. IV nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.....	113
Şekil 4.37. IV nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen oranlarının aylara göre dağılımı.....	113
Şekil 4.38. IV nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.	113
Şekil 4.39. IV nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarının dağılımı....	114

TABLolar LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 2.1. <i>F. psychrophilum</i> bakterisinin etkilediği balıklar ve coğrafik dağılımları.....	6
Tablo 2.2. <i>F. psychrophilum</i> 'un fenotipik karakterizasyonu.....	9
Tablo 2.3. <i>F. psychrophilum</i> 'un serotipleri	14
Tablo 2.4. PFGE yorumlama kriteri	19
Tablo 3.1. <i>F. psychrophilum</i> 'un izolasyonu için hazırlanan besiyerleri.	27
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan antibakteriyel diskler, miktarları ve standart zon çapları	40
Tablo 4.1. I nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı ve yüzde oranı.....	66
Tablo 4.2. II nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı ve yüzde oranı.....	73
Tablo 4.3. III nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı ve yüzde oranı.....	76
Tablo 4.4. IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı ve yüzde oranı.....	79
Tablo 4.5. I, II, III, IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen <i>F. psychrophilum</i> sayısı ve yüzdesi.....	82
Tablo 4.6. <i>F. psychrophilum</i> 'un fenotipik ve biyokimyasal özellikleri	86
Tablo 4.7. İzole edilen <i>F. psychrophilum</i> 'un antibakteriyel duyarlılık durumları.	96
Tablo 4.8. <i>F. psychrophilum</i> suşlarının antibakteriyellere olan duyarlılık yüzde dağılımı.	100
Tablo 4.9. I nolu işletmenin su parametreleri.....	103
Tablo 4.10. II nolu işletmenin su parametreleri.....	106
Tablo 4.11. III nolu işletmenin su parametreleri.	109
Tablo 4.12. VI nolu işletmenin su parametreleri	112

KISALTMALAR LİSTESİ

FÜBAP	:	Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
RTFS	:	Rainbow Trout Fry Syndrome
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	:	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RE	:	Restriksiyon (Kesme veya sınırlama) enzim
IPN	:	Infectious Pancreatic Necrosis
IHN	:	Infectious Hematopoietic Necrosis
IFAT	:	İndirekt Fluoresan Antikor Testi
dNTP	:	Nükleotid
A	:	Adenin
T	:	Timin
G	:	Guanin
C	:	Sitozin
NCIMB	:	National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria
CA	:	Cytophaga Agar
CB	:	Cytophaga Broth
MAOA	:	Modified Anacker ve Ordal Agar
MAOB	:	Modified Anacker ve Broth
TYES-A	:	Tryptone Yeast Salt Agar
TYES-B	:	Tryptone Yeast Salt Broth
EAO+FBS+A	:	Enriched Anacker ve Ordal + Fetal Bovine Serum+ Agar
EAO+FBS+ B	:	Enriched Anacker ve Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth
TYESA+ T	:	Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin
TYFBS-A	:	Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum +Agar
FBS	:	Fetal Bovine Serum
BHIA	:	Brain Heart Infusion Agar
TSIA	:	Triple Sugar İron Agar
TSA	:	Tryptic Soy Agar
TSB	:	Tryptic Soy Broth

PCA	:	Plate Count Agar
BHIA	:	Brain Heart Infusion Agar
TSIA	:	Triple Sugar Iron Agar
TSA	:	Tryptic Soy Agar
TSB	:	Tryptic Soy Broth
MCA	:	MacConkey Agar
MHA	:	Mueller-Hinton Agar
O/F	:	Oksidasyon / Fermentasyon
MR	:	Metil Red
VP	:	Voges Proskauer
NB	:	Nitrat Broth
MHA	:	Mueller-Hinton Agar
FTS	:	Fizyolojik Tuzlu Su
SKG	:	SeaKem Gold
TBE	:	Tris-Borik asit-EDTA
CLSI	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
rRNA	:	Ribozomal ribonükleik asit
RNA	:	Ribonükleik asit
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
TE	:	Tris Edta
Etest®	:	Gradiyent difüzyon
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
ONPG	:	Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase
OD	:	Ornitindekarboksilaz
TNES	:	Tris, NaCl, EDTA, SDS,
TBE	:	Tris-Borik Asit-EDTA
HST	:	Hücre Süspansiyon Tamponu
HSB	:	Hücre Süspansiyon Buffer
HLB	:	Hücre Lysis Buffer
TIFF	:	Tagget Image File formatında
CN	:	Gentamisin

AX	:	Amoksisilin
AMC	:	Amoksisilin/Klavulanik asit
AK	:	Amikasin
AMP	:	Ampisilin
C	:	Kloramfenikol
CAZ	:	Seftriakson
CZ	:	Sefoperazo
CEP	:	Sefoperazon
İPM	:	İmipenem
E	:	Eritromisin
EN	:	Enoksasin
CLR	:	Klaritromisin
CIP	:	Siprofloksasin
F/M	:	Nitrofurantoin
SMZ	:	Sulfametoksazol
P	:	Penisilin
OT	:	Oksitetrasiklin
PIL	:	Piperasillin
FP	:	Furazolidone
B	:	Basitrasin
OP	:	Optokin
BC	:	Baktrim (Trimethoprim+Sülphamethoxazole)
ENR	:	Enrofloksasin
FFC	:	Florfenikol
S	:	Streptomisin
N	:	Neomisin
CC	:	Klindamisin
OFX	:	Ofloksasin
VA	:	Vankomisin
NN	:	Tobramisin
FOX	:	Sefoksitin
NA	:	Nalidiksik Asit

NET	:	Netilmisin
ATM	:	Aztreonam
LC	:	Linkomisin
TMP	:	Trimetoprim

SEMBOLLER LİSTESİ

mM	:	Milimol
mm	:	Milimetre
bp	:	Base Pairs
mg	:	Miligram
µg	:	Mikrogram
g	:	Gram
l	:	Litre
ml	:	Mililitre
kg	:	Kilogram
kb	:	Kilobayt
µl	:	Mikrolitre
nm	:	Nonometre
ppm	:	Parts Per Million
≤	:	Küçük Eşittir
≥	:	Büyük eşittir
-	:	Negatif Reaksiyon
+	:	Pozitif Reaksiyon
N	:	Normallik
n	:	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> sayısı
R	:	Resistant-dirençli
I	:	Intermediate sensitive-orta derecede duyarlı
S	:	Sensitive-duyarlı
M	:	100 bp'lik moleküler marker
NH₄C₂O₄	:	Amonyum Oksalat
KMnO₄	:	Potasyum Permanganat
H₂SO₄	:	Sülfirik Asit
Mg	:	Magnezyum
KCl	:	Potasyum klorür
MgCl₂	:	Magnezyum klorür
KOH	:	Potasyum hidroksit

H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HCl	:	Hidrojen klorür
KI	:	Potasyum iyodür
MgSO₄.7H₂O	:	Magnezyum sülfat heptahidrat
CaCl₂.2H₂O	:	Kalsiyum klorür dihidrat
NaCl	:	Sodyum klorür
H₂S	:	Hidrojen sülfür

1. GİRİŞ

İnsanlar metabolik aktivitelerini dışardan aldıkları besinlerle karşılamak zorundadırlar. Artan nüfus yoğunluğuyla birlikte dünyanın birçok yerinde gıda yetersizliği görülmektedir. Günümüzde balık, besin ihtiyacımızın önemli bir kısmını karşılamaktadır. Bu nedenle, tüm dünyada intensif kültür balıkçılığına verilen önem gün geçtikçe artmaktadır. Ancak gelişen intensif kültür balıkçılığı uygulamalarıyla birlikte balık hastalıkları da gittikçe sorun olmaya başlamıştır (Anderson, 1974).

Su ürünleri yetiştiriciliği tüm dünyada hızlı bir gelişme göstermektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun açıkladığı son rakamlara göre ülkemizde 2009 yılında, 464462 tonu avcılıkla, 158729 tonu yetiştiricilikle olmak üzere toplam 623191 ton su ürünleri üretimi yapılmıştır. Kültür balığı üretiminin % 48,04'ü içsularda; % 51,96'sı ise denizlerde gerçekleştirilmiştir. Yetiştirilen en önemli türler içsularda % 47,66 ile alabalık; denizlerde ise % 29,33 ile levrek ve % 17,87 ile çipura olmuştur (URL-1).

Elazığ, il sınırları içerisinde bulunan baraj gölleri, doğal göller ve akarsularla ülkemizin en zengin illerinden biridir. Balık yetiştiriciliği için 22989 ha'lık alan bulunmaktadır (Sağlam vd., 2008). Elazığ Tarım İl Müdürlüğü 2010 yılı kayıtlarına göre ilimizde toplam 63 işletmede 8360 ton alabalık yetiştirilmiştir (Anonim, 2010).

Kültür balıkçılığında bakteriyel kökenli balık hastalıkları, işletmelerde ekonomik kayıplara neden olan etkenlerin en önemlilerinden birini oluşturmaktadır. Hastalığın şiddeti, balığın yaşına ve türüne göre değişmektedir. Buna karşın balıklardaki birçok enfeksiyonun tedavisi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Ancak çevre şartlarının olumsuzluğu, balıkların hastalıktan korunmasını ve kontrol önlemlerinin alınmasını zorlaştırmakta, hatta imkansız hale getirebilmektedir (Austin ve Austin, 1987; Buckley vd., 1998).

Flavobacterium psychrophilum A.B.D.'de ilk kez 1946'de Coho salmonlardan (*Oncorhynchus kisutch*) izole edilmiştir (Bernardet ve Keroualt, 1989; Inglis vd., 1993; Ekman, 2003; Cipriano ve Holt, 2005). *Salmo salar*, *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* gibi bir çok balık türünden bu patojenin izole edildiği ve önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Lehmann vd., 1991; Bernardet, 1997). Japonya'da da 1987'den beri doğal sularda ve *Plecaglossus altivelis* üretimi yapılan işletmelerde *F. psychrophilum* ciddi sorunlar oluşturmuştur (Wakabayashi vd., 1994; Lido ve Mizokomi, 1996). Türkiye'de; gökkuşağı alabalığı işletmelerinde yavru alabalıklardan

Flavobakterilerin izole edildiği bildirilmiş (Balta, 1997; Korun ve Timur, 2001), hatta 0.5 – 1.0 g'lık alabalıklarda yüksek mortaliteye (% 75) neden olduğu tespit edilmiştir (Balta, 1997). Ayrıca 1–5 g'lık alabalık yavrularında mortalite % 70 iken, 10–15 g'lık yavrularda % 10 olduğu belirlenmiştir (Austin ve Austin, 1987; Bernardet ve Keroualt, 1989; Austin, 1992).

Psikrofiloz (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkül hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS); *F. psychrophilum*'un neden olduğu, özellikle kuluçkahanelerde su sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü durumlarda meydana gelen, sepsisemik karakterli, akut seyirli, epidemik ve öldürücü bir enfeksiyondur. Bu nedenle işletmeler için ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Psikrofilozis, Türkiye'de ilk olarak 1993 yılında yavru gökkuşuğu alabalıklarında saptanmış ve daha sonraki yıllarda farklı coğrafik bölgelere yayılarak balık üretim tesislerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur. Şimdiye kadar ülkemizde bu hastalık şubat-haziran aylarında yaygın halde görülmüş, yavru alabalıkların önemli bir bakteriyel hastalığı haline gelmiştir (Bernardet ve Keroualt, 1989; Austin, 1992; Lumsden vd., 1996; Diler vd., 2003; İspir vd., 2004; Arda vd., 2005).

Psikrofiloz etkeni olan *F. psychrophilum* kültürü yapılan salmonid türlerden *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo namaycush* (Shotts ve Starliper, 1999; Ekman, 2003; Nematollahi vd., 2003; Cipriano ve Holt, 2005) ile *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* gibi salmonid olmayan türlerden de izole edilmiştir (Bernardet ve Keroualt, 1989; Lorenzen vd., 1991; Austin, 1992; Holliman, 1993; Lorenzen vd., 1997; Plumb, 1999; Ekman, 2003; Cipriano ve Holt, 2005). Bu hastalıkta, özellikle kuluçkahane sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü durumlarda, yavru alabalıkların dorsal ve kaval yüzgeçlerinde, vücut yüzeyinde çeşitli büyüklüklerde lezyonlar ile, deride kanama ve ekzoftalmus görülür. Ayrıca, solungaç ve karaciğerde solgunluk, karında şişkinlik, bağırsağın sarı bir içerik ile kaplı olması, dalak ve karaciğerde büyüme meydana gelmesiyle karakterize olan bulaşıcı ve öldürücü bakteriyel bir hastalıktır (Kandil, 1976; Çolak, 1982; Austin ve Austin, 1987; Lorenzen vd., 1991; Santos vd., 1992; Bustos vd., 1995; Balta, 1997; Cengizler, 2000; Korun ve Timur, 2001; Diler vd., 2003; Ekman, 2003; Timur ve Timur, 2003; İspir vd., 2004; Arda vd., 2005; Cipriano ve Holt, 2005).

F. psychrophilum, hastalığa yol açtığı gibi alabalıkların deri, mukoza, yüzgeç, solungaç, operkulum, ovaryum sıvısı ve sindirim sisteminin doğal florasında da bulunmaktadır (Diler, 2000; Nematollahi vd., 2003; Arda vd., 2005; Kubilay vd., 2009a; Kubilay vd., 2009b). Ayrıca etkenin hasta anaç balıkların yumurtalarına, buradan da yavru

balıklara bulaşabildiği bildirilmiştir (Balta, 1997; Diler vd., 2003). Çevresel faktörlerin (özellikle su sıcaklığının düşmesi, kalitesi düşük sular, balık popülasyonundaki artış, kötü bakım-besleme gibi) değişmesiyle etkenin virulensi artmakta ve enfeksiyona neden olmaktadır. Etken temas ve su yoluyla balıklar arasında hızlı bir şekilde yayılarak bulaştığından gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde aşırı ölümlere ve sonuçta işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cipriano ve Holt, 2005).

Hastalığın kontrolünde etkin bir aşı uygulamasının olmaması ve bakteriyel bir hastalık olması nedeniyle antibiyotik ile sağaltımı ön plana çıkmaktadır. Ancak kültür balıkçılığında yaygın olarak görülen bakteriyel hastalıkların tanı ve sağaltımında etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmadan, bilinçsiz ve yaygın bir şekilde antibiyotik kullanımı, dirençli suşların gelişmesine neden olmakta ve sonuçta hastalıkların sağaltımında güçlüklerle karşılaşmaktadır (Faruk, 2000; Midtlyng, 2002; Cipriano ve Holt, 2005).

Alabalık işletmelerinde önemli ekonomik zararlara neden olan *F. psychrophilum*'un üretilmesi zor ve fazla zaman almaktadır (Delen, 2007).

Flavobacterium psychrophilum'un fenotipik (organizmanın genotipinin dış çevreyle beraber oluşturduğu morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik özellikler) özelliklerinin belirlenmesinde genellikle mikrobiyolojik testler kullanılmaktadır (Arda, 2000; Austin ve Austin, 1987; Bernardet ve Kerouault, 1989; Bernardet vd., 1996).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu -PZR (Polymerase Chain Reaction - PCR); kısa bir zaman içinde aranan etkenlerin genetik materyalini saptamak amacıyla hedeflenen nükleik asitin (DNA) biyokimyasal olarak çoğaltmasını sağlayan bir yöntemdir (Saiki vd., 1988; Mullis, 1990; Bej vd., 1991; Taylor, 1993). Bu yöntemde; hedef organizmadan elde edilen genin bir parçası milyonlarca çoğaltılarak kolayca tespit edilebilecek seviyeye getirilmektedir. PZR, halen mevcut kültür tekniklerine göre 12–24 saat gibi kısa sürede sonuç vermektedir. Bu teknik hastalık teşhisinde doğrudan uygulamaya sahip olduğu gibi aynı zamanda nedeni bilinmeyen hastalıklarda, epidemiyoloji sahasında patojen etkenin identifikasyonunda ve mikroorganizmaların sınıflandırılmasında da kullanılmaktadır (Marx, 1988; Coote, 1990; Quirke, 1992; Arda, 1995; Arı, 1999).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Değişken Alanlı Jel Elektroforezi); moleküler tiplendirme teknikleri içinde bu yöntem oldukça yüksek ayırım gücüne sahip, sonuçları tekrarlanabilir ve kolay yorumlanabilir olduğu için genotipik identifikasyonda

referans olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, agaroz içerisine gömülü haldeki bakteriden izole edilen kromozomun, yapısal bütünlüğü bozulmadan genetik profilinin belirlenmesi için restriksiyon enzim (RE) ile kesim esasına dayanır (Derbentli, 2002; Domig vd., 2003; Van Belkum vd., 2007).

Ülkemizde önemli balık hastalıklarından olan Psikrofiloz'un etkeni *F. psychrophilum*'un fenotipik ve genotipik karakterleri hakkında kapsamlı bir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada; Elazığ ili Keban ilçesinde bulunan bazı alabalık işletmelerinin kuluçkahanelerindeki yavru gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin belirlenmesi ve bu etkenin fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması amaçlandı.

Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Hastalıklar Anabilim Dalı ile Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından yararlanılarak gerçekleştirilen bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Destekleme Koordinatörlüğü tarafından 1573 nolu araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. PSİKROFİLOZ (BAKTERİYEL SOĞUK SU HASTALIĞI, PEDİNKUL HASTALIĞI, RAINBOW TROUT FRY SYNDROME - RTFS)

Psikrofiloz (Bakteriyel Soğuk Su Hastalığı, Pedinkül Hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome-RTFS); bazı alabalık türlerinde özellikle gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerin kuluçkahanesinde su sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü durumlarda, yavru alabalıkların dorsal ve kaval yüzgeçlerinde çeşitli büyüklükte lezyonların oluşması, deride gittikçe artan pigmentasyon, spiral tarzda yüzme, iştah kaybı, asites, ekzoftalmus, solungaçlar ve iç organlarda anemi, deride ülserasyon, pedinkül bölgede ülser ve nekroz odakları, vertebralarda deformasyonlar, dalak ve böbreklerde hipertrofi gibi bozuklukların oluşması sonucu aşırı ölümlere neden olan bulaşıcı bakteriyel bir enfeksiyondur (Branson, 1998; Bowser, 1999; Ekman, 2003; Shotts ve Starliper, 2003; Nematollahi vd., 2003; Cipriano ve Holt, 2005; Bernardet ve Keroualt, 1989; Austin, 1992; Lumsden vd., 1996; Diler vd., 2003; Arda vd., 2005).

Psikrofiloz sistematik olarak etiyolojik, epizootiyolojik, patogeneze, klinik ile otopsi bulguları, teşhis ve tedavisi yönleriyle incelenmektedir.

2.1.1. Etiyoloji

ABD'nin batı Virginia eyaletinde 1941 ve daha sonra 1945 yıllarında parmak büyüklüğündeki gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) iki salgın görülmüştür. Balıklarda bu salgınlar özellikle pedinkül ve kaval yüzgeçleri etkilediğinden, Davis 1946'da hastalığı "pedünkül hastalığı" olarak adlandırmış ve balıklarda oluşan lezyonlarda etkenin yığınlar halinde, uzun ince basiller şeklinde bulunduğunu belirtmiştir (Bernardet ve Keroualt, 1989; Inglis vd., 1993; Cipriano ve Holt, 2005). Borg, 1948'de alabalıklardaki bu bozuklukların Coho (silver) salmon (*Oncorhynchus kisutch*)'unda da görüldüğünü ve hasta balıkların böbrek ve dış lezyonlarından etkeni izole ettiğini, hastalığın özellikle düşük su sıcaklıklarında meydana geldiğini ve mortalitenin çok yüksek olduğunu bildirmiştir (Bernardet ve Kerouat, 1989; Noga, 1999; Ekman 2003; Cipriano ve Holt, 2005). Ayrıca bu hastalık etkenini Myxobacteriales takımına ait *Cytophaga psychrophila* olarak isimlendirmiştir. Bernardet ve Grimont tarafından 1986 yılında bu etken fenotipik özelliklerine dayanarak *Flexibacter psychrophilus* olarak yeniden tanımlanmıştır. Daha

sonra etkenin DNA ve rRNA sentezinde guanin+sitozin bağlanması, yağ asiti ve proteine göre *F. psychrophilum* olarak isimlendirilmiştir (Bernardet vd. 1996).

Fransa, Danimarka, İtalya ve İngiltere gibi çeşitli Avrupa ülkelerinde (Tablo 2.1) de 1988 yılından beri yavru gökkuşağı alabalıklarında Pedinkül hastalığı görülmüştür. Yine 1989'da Almanya'nın Weser nehrindeki yılan balıklarından (*Anguilla anguilla*) hastalık etkeni izole edilmiştir (Lehmann vd., 1997; Toranzo, 2004). Daha sonra 1990 yılında *Cyprinus carpio* ve *Tinca tinca*'dan, 1992 yılında İspanya'da gökkuşağı alabalığı işletmelerindeki 0.2-1 gram büyüklüğündeki yavru balıklardan (Lehmann vd., 1991), ülkemizde ise 1993'de kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı işletmelerinden *F. psychrophilum* izole edilmiştir (Çağırman vd., 1997).

Tablo 2.1. *F. psychrophilum* bakterisinin etkilediği balıklar ve coğrafik dağılımları (Faruk, 2000; Cipriano ve Holt, 2005).

Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i>	ABD-Borg 1960; Japonya-Wakabayashi ve diğ. 1991
Chinook salmon, <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	ABD-Rucker ve diğ. 1953; Kanada-Ostland ve diğ. 1999
Sockeye salmon, <i>Oncorhynchus nerka</i>	ABD-Rucker ve diğ. 1953
Chum salmon, <i>Oncorhynchus keta</i>	ABD-Holt 1987
Amago, <i>Oncorhynchus rhodurus</i>	Japonya-Furutsuka-Uozumi ve diğ. 1996
Masou salmon, <i>Oncorhynchus masou</i>	Japonya-Lida and Mizokami 1996
Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>	ABD-Schneider and Nicholson 1980; Avustralya-Schmidtke ve Carson 1995; İsveç-Ekman ve diğ. 1999; Kanada-Ostland ve diğ. 1999.
Kahverengi alabalık, <i>Salmo trutta</i>	Japonya-Wakabayashi ve diğ. 1991; Finlandiya -Madetoja ve diğ. 2001; Norveç-Lorenzen ve Olesen 1997.
Deniz alabalığı, <i>Salmo trutta</i>	Finlandiya ve İsveç-Madetoja ve diğ. 2001
Gökkuşağı alabalığı, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ABD-Davis 1946; Fransa-Bernardet ve diğ. 1988; Bernardet ve Kerouault 1989; Almanya-Weis 1987; İtalya-Sarti ve diğ. 1992; Kanada-Ostland ve diğ. 1999; Finlandiya-Madetoja ve diğ. 2001; United Kingdom- Santos ve diğ. 1992, Bruno 1992, Austin 1992; İspanya- Toranzo ve Barja 1993; Finlandiya-Wiklund ve diğ. 1994; Chile Bustos ve diğ. 1995; Danimarka-Lorenzen ve diğ. 1991; İsviçre ve Kuzey İrlanda-Lorenzen ve Olesen 1997
Cutthroat trout, <i>Oncorhynchus clarki</i>	ABD- Holt 1987; Finlandiya-Crump ve diğ. 2001
Kaynak alabalığı, <i>Salvelinus fontinalis</i>	ABD-Bullock 1972; Finlandiya-Madetoja ve diğ. 2001
Göl alabalığı, <i>Salvelinus namaycush</i>	ABD-Schachte 1983
Çelikbaş, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ABD-Brown ve diğ. 1997, Kanada-Ostland ve diğ. 1999
Arctic char, <i>Salvelinus alpinus</i>	Finlandiya-Madetoja ve diğ. 2001
Grayling, <i>Thymallus thymallus</i>	Estonya-Madetoja ve diğ. 2001
Ayu, <i>Plecoglossus altivelis</i>	Kore-Lee ve Heo 1998; Japonya-Wakabayashi ve diğ. 1994
Grayling, <i>Thymallus thymallus</i>	Estonya-Madetoja ve diğ. 2001
Sazan, <i>Cyprinus carpio</i>	Almanya-Lehmann ve diğ. 1991
Havuz balığı, <i>Carassius carassius</i>	Almanya-Lehmann ve diğ. 1991
Yılan balığı, <i>Anguilla anguilla</i>	Almanya-Lehmann ve diğ. 1991
Forktongue goby, <i>Chaenogobius urotaenia</i>	Japonya-Amita ve diğ. 2000
Japanese dace, <i>Trybolodon hakonensis</i>	Japonya-Amita ve diğ. 2000
Lake goby, <i>Rhinogobius brunneus</i>	Japonya-Amita ve diğ. 2000
Pale chub, <i>Zacco platypus</i>	Japonya-Lida ve Mizokami 1996
Tatlısu levreği, <i>Perca fluviatilis</i>	Finlandiya-Madetoja ve diğ. 2002
Kızıl göz, <i>Rutilus rutilus</i>	Finlandiya-Madetoja ve diğ. 2002
Kadife, <i>Tinca tinca</i>	Almanya-Lehmann ve diğ. 1991

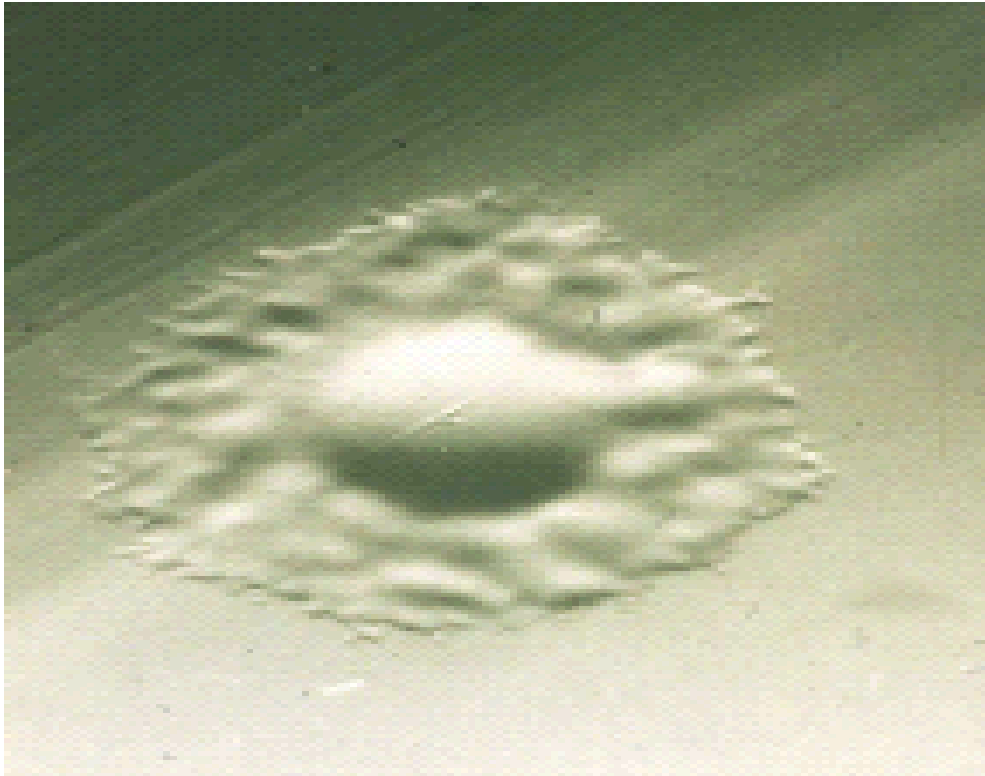
F. psychrophilum, Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz ve flagellasız olup kayma hareketi yapan, aerob veya fakültatif anaerob, ince- uzun çomakçıklar (Şekil 2.1) biçimindeki mikroorganizmalardır. Taze sıvı kültürlerde, bakterilerin bireysel formu genellikle 0.3–0.75X2.0–7.0µm boyutlarındadır (Şekil 2.2). Hatta taze sıvı kültürdeki bu etkenlerin boyutları, doğal enfekte balıkların lezyonlarında rastlanılmalardan daha büyük olabilmektedir. Kültürlerde az da olsa filamentöz formlara (10–40 µm) görülebilmektedir. Mikroist formasyonuna ise rastlanılmamaktadır. Aerob koşullarda, 15–20°C’de katı besiyerlerinde, 2–4 gün içinde üzerleri ve kenarları pürüzlü (Şekil 2.3) sarı renkli koloniler meydana getirirler. Kolonilerde oluşan sarı pigment, % 20’lik KOH ile oranj rengini alır. Mikroorganizma 4°C’nin altında ve 25°C’in üstündeki sıcaklıklarda üremez. (Arda, 1973; Austin ve Austin, 1987; Bernardet ve Kerouault, 1989; Bernardet vd., 1996; Balta, 1997; Cengizler, 2000; Korun ve Timur, 2001; Madetoja vd., 2001; Vatansever, 2001; Diler vd., 2003; Ekman, 2003; Tamaki vd., 2003; Timur ve Timur, 2003; İspir vd., 2004; Arda vd., 2005; Cipriano ve Holt, 2005). *F. psychrophilum*’un fenotipik özellikleri tablo 2.2’de görülmektedir.



Şekil 2.1. *F. psychrophilum*’un mikroskopta görünüşü (URL–3).



Şekil 2.2. *F. psychrophilum*'un elektron mikroskopunda görünüşü (URL-4).



Şekil 2.3. *F. psychrophilum*'un kolonisi (Cipriano ve Holt, 2005).

Tablo 2.2. *F. psychrophilum*'un fenotipik karakterizasyonu (Wiklund vd., 1994; Lorenzen vd., 1997; Bowser 1999; Dalsgaard ve Madsen, 2000; Nematollahi vd., 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

Test	Sonuç	Test	Sonuç
Gram boyama	—	Lizin	—
Hareket	-(kayma)	Fruktoz	—
Koloni rengi	Sarı	İnositol	—
Flexirubin tipi pigment	+	Rhamnoz	—
Kongo red testi	—	Mannoz	—
Katalaz	Zayıf pozitif	Meliboz	—
Oksidaz	—	Amigolalin	—
Nitrat redüksiyonu	—	TYE agarda üreme	+
Jelatin hidrolizi	+	TYES agarda üreme	+
Nişasta hidrolizi	—	TSA'da üreme	+/-
H ₂ S üretimi	—	Kanlı agar	+/-
Metil kırmızısı-	—	Tirozin hidrolizi	+/-
Voges Proskauer	—	Sellulöz dekompozisyonu	—
ONPG testi	—	Glukoz oksidasyonu	—
Simmons sitrat kullanımı	—	Sellobioz oksidasyonu	—
B-galaktozidaz	—	Glukoz fermentasyonu	—
Arjinin dihidroloz	—	Laktoz fermentasyonu	—
Ornitin dekarboksilaz	—	Mannitol fermentasyonu	—
Üreaz üretimi	—	Sellobioz fermentasyonu	—
Triptofan deaminaz	—	Tirozin agarda pigment	—
Albümin sindirimi	+	Mueller-Hinton agarda üreme	—
Tributrin hidrolizi	+	Vibriostat O/129	—
<i>E. coli</i> otolizi	+	5 °C'de üreme	+
Kitin hidrolizi	—	15°C'de üreme	+
Agar hidrolizi	—	20°C'de üreme	+
Kazein hidrolizi	+	25°C'de üreme	+/-
Nişasta hidrolizi	—	30°C'de üreme	—
Ksantin hidrolizi	—	37°C'de üreme	—
Sukroz	—	% 0,0 NaCl'de üreme	+
Galaktoz	—	% 0,5 NaCl'de üreme	+
Arabinoz	—	% 1,0 NaCl'de üreme	+/-
Sorbitol	—	% 2,0 NaCl'de üreme	+/-

- : Negatif reaksiyon

+ : Pozitif reaksiyon

Bu etkende plasmidin varlığı belirtilmiş ise de fonksiyonu tam olarak açıklanmamıştır. Bakterinin fizyolojik ve biyokimyasal aktivitesi oldukça sınırlıdır. Sakkarolitik etkinliği de birçok karbonhidrat için bulunmamaktadır. Buna rağmen kazein, kollagen, jelatin ve albümin için aktif proteolitik özelliğe sahiptir. Ancak bu karakterleri de suşlara göre değişmektedir. Bazı izolatların da, kas, deri ve kıkırdakları eritebilen

ekstrasellüler enzim sentezledikleri açıklanmıştır. *F. psychrophilum* antibiyotiklere, kemoterapotiklere ve dezenfektanlara karşı değişik derecede duyarlılık gösterir. Mikroorganizma, antijenite yönünden bir homojeniteye sahiptir. İncelenen izolatlardan lam aglütinasyon testi ile saptanan ortak antijenik komponentlerin varlığı bildirilmiştir. Ancak bölgelere göre suşlar arasında virulens ve antijenik farklılıkların ortaya çıkabileceği de açıklanmıştır (Holt, 1987; Madsen ve Dalsgaard, 2000; Arda vd., 2005).

F. psychrophilum yüksek proteolitik enzim üretmesinden dolayı direk dokulara zarar vermektedir. Bu proteaz ürünü bakterinin birinci virulens faktörüdür (Dalsgaard, 1993; Bertolini vd., 1994; Madsen ve Dalsgaard, 1998; Dalsgaard ve madsen 2000). *F. psychrophilum* suşları arasında elastin çeşitliliği vardır. Elastini az olan suşlar daha virulenttir (Madsen ve Dalsgaard, 1998;1999b). Yine suşlar arasında plasmid (3.7 kb) içerenler daha virulenttir (Lorenzen vd., 1997).

2.1.2. Epizootioloji

Enfeksiyon, *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus rhodurus*, *Oncorhynchus masou*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus clarki*, *Salmo salar*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fortinalis*, *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus alpinus* ve *Thymallus thymallus* gibi yavru veya çok genç Salmonidlerde ve *Plecoglossus altivelis*, *Cyprinus carpio*, *Carassius carassius*, *Anguilla anguilla*, *Chaenogobius urotaenia*, *Trybolodon hakonensi*, *Rhinogobius brunneus*, *Zacco platypus*, *Perca fluviatilis*, *Rutilus rutilus* ve *Tinca tinca* gibi diğer balıklarda görülür. (Arda, 1973; Arda vd., 2005; Cipriano ve Holt, 2005).

Su sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü havuzlarda fazla kalabalık, akıntısız, oksijenin az olduğu, su kalitesinin bozulduğu zamanlarda kuluçkahane ve havuzlardaki ölümler % 30–50 arasında değişmektedir. Stres faktörleri de hastalığın çıkmasında ve yayılmasında etkili bir rol oynar. *F. psychrophilum* balıkçılık işletmelerindeki sularda bulunmaktadır ve hatta bu etken steril suya bırakıldığında uzun süre canlı kalabilmektedir. Ayrıca bakteri suda 4 ay süreyle çoğalabilmektedir. Balık işletmelerinde suyun sirkülasyonu ile etken sağlıklı balığa da bulaşabilmektedir (Arda, 1973; Bruun vd., 2000; Dalsgaard ve Madsen, 2000; Schmidt vd., 2000; Wiklund vd., 2000; Madetoja ve Wiklund, 2002; Ekman, 2003; Madetoja vd., 2003; Vatsos vd., 2003; Arda vd., 2005).

Bakteri, salmonid balıkların yüzgeç, solungaç, operkulumla bağlantılı dokularda, ayrıca mukus ve deri florasında bulunur. Mikroorganizma, deri ve solungaçlarda çeşitli

nedenlerin etkisiyle meydana gelen yara vb. yerlerden vücuda girerek enfeksiyon oluşturur. Enfeksiyona duyarlılık bakımından da balık türleri arasında farklılıklar bulunabilmektedir. Balıkların çok genç, sıcaklığın da düşük olması ve diğer olumsuz faktörler balıkların direncini azaltarak, hastalıklara karşı duyarlılığın artmasına yol açmaktadır. Havuzlarda bulunan portör, kronik ve ölü balıklar bir hastalık kaynağıdır. *F. psychrophilum*, balıkların birbirine direk temasında ve suya karışarak balıklar arasında yayılma göstermektedir. Bu patojen balıkların vücut yüzeyinde, ovaryumda, sindirim sistemi ve yumurtaların dış kısmında da rastlanabilir. Ayrıca etkenin hasta ergin balıkların yumurtalarına, buradan da yavru balıklara bulaşabildiği bildirilmiştir. Bu bakteri balıkçılık tesislerine yumurta ve balıkların taşınmasıyla da bulaşabilmektedir (Bustos vd., 1995; Brown vd., 1997; Izumi ve Wakabayashi, 1997; Madsen ve Dalsgaard, 1999a; Madetoja vd., 2000; Baliarda vd., 2002; Madetoja, 2002; Ekman, 2003; Nemotallohi vd., 2003; Timur ve Timur, 2003; Cipriano ve Holt, 2005; Arda vd., 2005).

Hastalık, bazı salmon türlerinde diğer bakteriyel, viral veya paraziter balık patojenleriyle birlikte görülebilmektedir. Örneğin furunkulozise neden olan *Aeromonas salmonicida* Psikrofiloz ile birlikte görülebilen bakteriyel bir patojendir. Enfeksiyöz pankreatik nekrozis (Infectious Pancreatic Necrosis, IPN) ve Enfeksiyöz hematopoietik nekrozis (Infectious Hematopoietic Necrosis, IHN) Psikrofiloz ile birlikte görülebilen viral enfeksiyonlardır. Ayrıca Hekzamitiyaz hastalığına neden olan *Hexamita salmonis* ve Kostiyaz hastalığına neden olan *Costia* (Ichthyobodo) *necatrix* ile *Gyrodactylus derjavi* ektoparazitlerinin gökkuşağı alabalığında Psikrofiloz ile birlikte miks enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir (Cipriano ve Holt, 2005).

2.1.3. Patogeneze

Etken, dokularda hasara yol açabilecek kadar yüksek proteolitik enzim üretimine sahiptir ve etkenin virulensi ekzotoksin, endotoksin, adezyon (yapışma) ve proteaz aktivitesine bağlıdır (Ekman, 2003). Çevresel faktörlerde meydana gelen değişim, *F. psychrophilum*'un proteolitik aktivitesini arttırmaktadır. Etken proteolitik enzimlerle lipaz ve nükleaz gibi ekstrasellüler enzimler salgılayarak konakçının hücrelerinde lizise neden olur. Bu özellikler diğer bakteriyel balık patojenlerine göre *F. psychrophilum*'un virulensini artırır (Nematollahi vd., 2003).

Ekstrasellüler proteazlar etkenin virulensini etkilemekte ve kas dokudaki elastin miktarını azaltmaktadır (Cipriano ve Holt 2005).

F. psychrophilum'un taşıyıcısı bilinmemektedir. Ancak sağlıklı balıkların vücut yüzeylerinde bulunan etkenin, epidermiste oluşan giriş yerlerinden içeri girdikten sonra üremeye başladığı, deride önceleri küçük ve beyazımsı, gözle görülebilecek irilikte kabarcıkların meydana geldiği, bunların zamanla büyüüp, sayılarının arttığı ve birbiriyle birleştiği gözlemlenir. Bu kabarcıkların üzerindeki deri delinerek açılıp, yerlerinde çapları 1–3 cm kadar olan yüzeysel ülserlerin teşekkül ettiği, dermisin dejenere olduğu ve renginde açılmaların meydana geldiği görülür. Etken zamanla bağ doku ve kas tabakasına kadar ilerleyip tahriplere neden olur. Bu arada kan damarlarında zedelenme meydana geldiğinden, yüzgeç tabanlarında hemorajik odaklar teşekkül eder. Hastalık *Oncorhynchus kisutch* türü alabalıklarda akut septisemilere yol açtığından iç organlarda lezyonlara rastlanmaktadır. Adipoz ve kavdal yüzgeçlerin dış kenarında başlayan enfeksiyon tabana kadar uzanır. Etken balıkların üreme sisteminde de yüksek oranda bulunup, yumurtalarla taşınabilmektedir (Arda, 1973; Kandil, 1976; Cengizler, 2000).

2.1.4. Semptomlar

Hastalık su sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü zamanlarda ortaya çıkar. Hasta balıkların hareketlerinde durgunluk, iştahsızlık ve renginde kararma görülür. Etken kavdal yüzgeçten girerek çoğalır ve adipoz yüzgeç boyunca renk bozulmaya başlar. Çoğu durumda kavdal ve adipoz yüzgeçlerden dorsal yüzgece doğru deriyi kaplayan nekrozlar oluşur. Yüzgeçlerin dış kenarlarda başlayan bozukluklar zamanla yüzgecin tabanına yayılır, bütün yüzgeçler tahrip olabilir ve radiuslar ortaya çıkar. Balığın derisinde dermal lezyonlar, ülserler ve yan kısımlarında büyük kabarcıklar gelişir. İleri safhalarda doku ve kaslar dejenere olup, ağzın yanlarında, ventralde ve lateral yüzeyde derin lezyonlar bulunur. Bazen de lordoz ve skolyoz görülür. (Arda, 1973; Kandil, 1976; Çolak, 1982; Bernardet vd., 1988; Lorenzen vd., 1991; Balta, 1997; Cengizler, 2000; Korun ve Timur, 2001; Timur ve Timur, 2003; Ryce ve Zale, 2004; Arda vd., 2005; Cipriano ve Holt, 2005)

Solungaçlar solgun renkte olup üzerinde kanama odakları bulunur (Arda vd., 2005). Etken, solungaç lamellerinin erimesine neden olur (Balta, 1997). Solungaç merkezi kapillar damarlarında kan pıhtıları toplanır (Cipriano ve Holt, 2005). Bazı balıklarda ekzoftalmus gözlenir (Cipriano ve Holt, 2005; Korun ve Timur, 2001; Arda vd., 2005). Gözün retinasında ve retinanın alt tabakasında kızarıklıklar meydana gelir (Evensen ve Lorenzen, 1996). Karında sıvı toplanması nedeniyle karın şişkindir (Bernardet ve Kerouault, 1989). Dalakta kızarıklık, büyüme ve hemorajiler, böbreğin solgunlaştığı

(Korun ve Timur, 2001), böbrek kapiller ve tubullarında nekrozların oluştuğu, kalp kasında kızarma (Cipriano ve Holt, 2005), bağırsağın boş, şeffaf ve anüse doğru olan kısmının hafif kanlı sarı renkli bir içerikle dolu olduğu, karaciğerin solgun ve bazı kan damarlarının dolgunlaştığı görülür (Korun ve Timur, 2001). Kemik zarı ve kemikte, beyin zarı, sinir düğümü, omurga ve kafatasının birleştiği omurda iltihaplanmalar ve kızarma gözlenir (Cipriano ve Holt, 2005). Kalpte, yüzmeye kesesinde ve karaciğerde peteşiler görülebilir (Cengizler, 2000).

2.1.5. Teşhis

Psikrofiloz hastalığının kesin teşhisi büyük ölçüde laboratuvar muayenelerine dayandığı için, yeterli sayıda hastalıklı canlı balıklara veya muayene materyallerine ihtiyaç duyulur. Bu enfeksiyonun semptomları diğer birçok bakteriyel hastalıklara benzediğinden dolayı, klinik ve otopsi bulgularına göre tanımlamak zordur. Ancak etkenin izole ve identifikasyonu ile mümkün olmaktadır (Arda vd., 2005).

2.1.5.1. Mikroskopi

Deri ve yüzgeçlerde bulunan lezyonlardan, dalak, karaciğer, böbrek ve kalpten alınan küçük parçacıklar, temiz bir lam üzerine sürülerek veya iki lam arasında ezilerek frotiler hazırlanır. Bunlar Gram boyama yöntemi ile boyanır. Mikroskop altında Gram negatif, ince uzun çomakçıklara rastlanır. Ancak, böyle mikroorganizmalar görülse bile, bu kesin teşhis olarak nitelendirilmemelidir (Arda, 1973; Lehmann vd., 1991; Arda vd., 2005).

2.1.5.2. Kültür ve İzolasyon

Aseptik koşullarda alınan doku parçaları, bir pens yardımı ile katı besiyerine (Cytophaga agar, vs.) sürülerek ekim yapılır veya doku parçalarından hazırlanan homojenatlar bir öze yardımıyla Modified Anacker ve Ordal Agar (MAOA), Modified Anacker ve Ordal Broth (MAOB), üzerine yayılarak ekimler yapılır. Aerob koşullarda 15-20°C'de 3-5 gün süre ile inkübasyona bırakılır (Austin ve Austin, 1987; Bernardet ve Grimont 1989; Lehmann vd., 1991; Timur ve Timur, 2003). Üreyen kolonilerden hazırlanan saf kültürler, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve serolojik testlere tabi tutularak etkenin identifikasyonuna çalışılır (Arda vd., 2005).

2.1.5.3. Serolojik Testler

Katı besiyeri üzerinde üreyen kolonilerden hazırlanan yoğun ve homojen bakteri suspansiyonu (%10–20), pozitif serumla lam üzerinde çabuk aglutinasyon testi yapılır ve ayrıca konjugat varsa Indirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) uygulanabilir (Toranzo, 2004; Arda vd., 2005).

Lorenzen ve Olesen (1997) tarafından *F. psychrophilum*'un üç serotipinin (Tablo 2.3) mevcut olduğu bildirilmiştir. Birinci serotip “Th” (alt serotipleri Th-1 ve Th-2’dir), çoğunlukla Danimarka’da izole edilen suşları içerir. İkinci serotip “Fd” gökkuşağı alabalığından izole edilen birkaç farklı izolattan meydana gelir. Fp^T serotipi balıklarda enfeksiyona yol açmakta ve gökkuşağı alabalığı dışındaki balıklardan da izole edilebilmektedir (Ekman, 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

Izumi ve Wakabayashi (1999) *F. psychrophilum* izolatlarının serotipik (Tablo 2.3) ayrımını yapmışlardır. Japon ve Amerika’daki coho salmonlarından serotip O-1; Ayu balıklarında Serotip O-2 ve alabalık türlerinde ise O-3 içeren suşlar izole edilmiştir.

Daha geniş bir serolojik analiz ile *F. psychrophilum*'un yedi ayrı serotipinin (1: salmon; 2a: alabalık; 2b: alabalık; 3: alabalık; 4: avrupa yılan balığı; 5: sazan; 6: kadife balığı ve 7: ayu balığı) izole edildiği ifade edilmiştir (Ekman, 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

Tablo 2.3. *F. psychrophilum*'un serotipleri (Cipriano and Holt, 2005).

İzole edildiği balık türü	Serotipler ve kaynakları		
	Mata et.al. (2002)	Lorenzen and Olesen (1997)	Izumi and Wakabayashi (1999)
Somon	1	Fp ^T	O-1
Gökkuşağı alabalığı	2a	Fd	
Gökkuşağı alabalığı	2b	Th-2	
Gökkuşağı alabalığı	3	Th-1	O-3
Yılan balığı	4		
Sazan	5		
Kadife balığı	6		
Ayu	7		O-2

2.1.5.4. Moleküler Yöntemler

Günümüzde moleküler tekniklerle hastalık etkenlerinin identifikasyonu gittikçe popüler bir konu olmaktadır. Bunun en önemli nedeni, moleküler yöntemlerin son derece doğru, hızlı, duyarlı ve spesifik olmasıdır. Moleküler teknikler arasında PZR diğerlerine göre ön plana çıkmaktadır.

2.1.5.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR; kısa bir zaman içinde aranan etkenlerin genetik materyalini saptamak amacıyla hedeflenen nükleik asitin (DNA) biyokimyasal olarak çoğalmasını sağlayan bir yöntemdir (Saiki vd., 1988; Mullis, 1990; Bej vd., 1991; Taylor, 1993; Çetinkaya, 1998). Bilim dünyası PZR ile tanıştığından beri, PZR'nin bütün moleküler uygulamalara çok büyük etkisi olmuştur. *Flavobacter*'e özgü 16S rRNA ve *gyrA* genleri ile cins bazında; *F. psychrophilum*'a özgü 16S rDNA, *gyrB* ve *ppiC* genleri ile tür bazında PZR ile identifikasyon yapmak mümkündür (Izumi ve Wakabayashi, 2000; Eiler ve Bertilsson, 2007; Suzuki, vd., 2008).

2.1.5.4.2. Moleküler Alt Tiplendirme

2.1.5.4.2.1. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Değişken Alanlı Jel Elektroforezis)

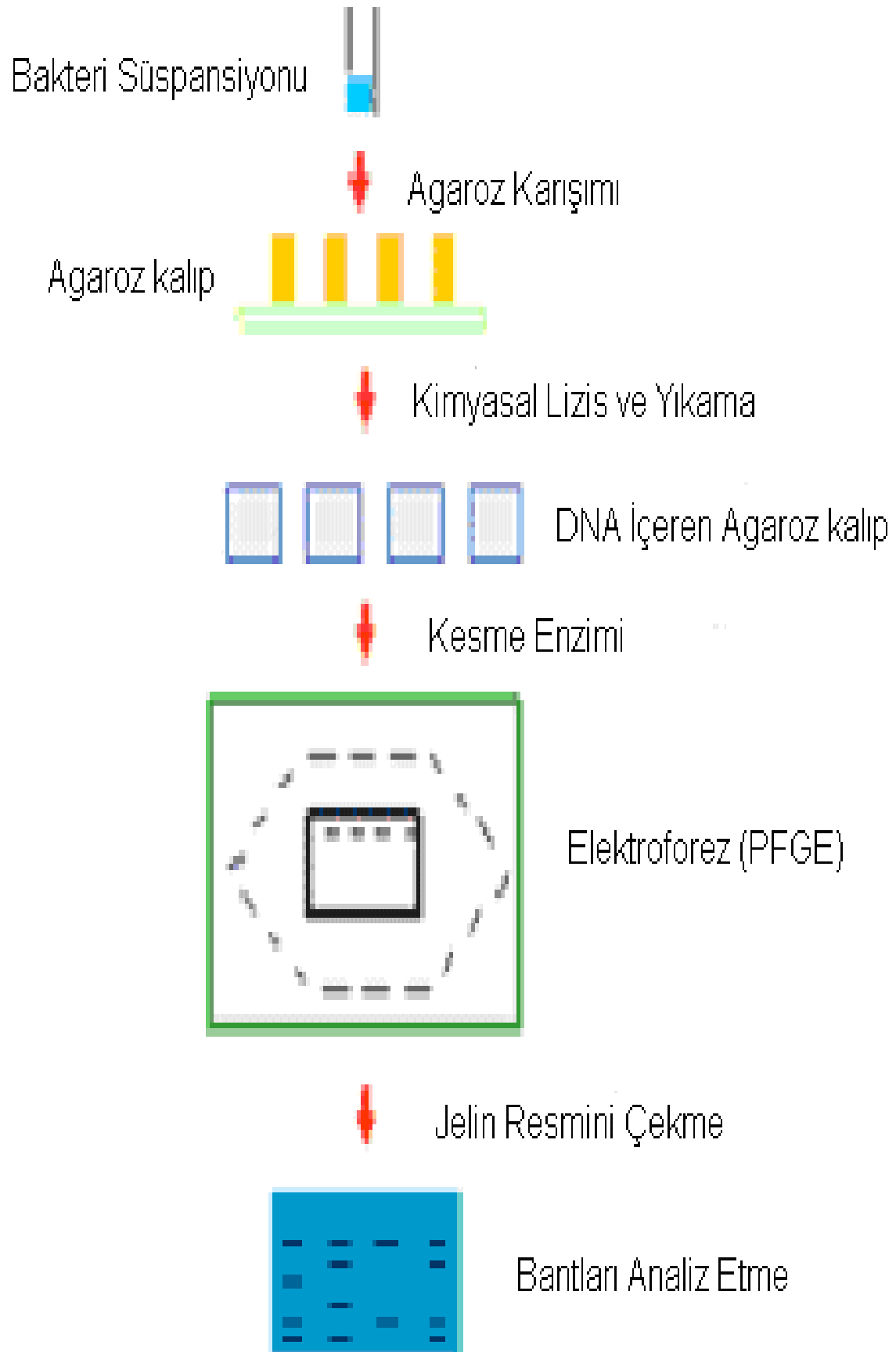
Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tekniği, agaroz içine gömülü haldeki bakteriden, yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen tüm kromozomal DNA'nın, restriksiyon (kesme veya sınırlama) enzimi (RE) ile kesilmesi sonucu oluşan profilinin belirlenmesi esasına dayanır. Ayrıca PFGE, yüksek üretim kabiliyeti ve ayırım yapabilme gücüne sahip olan birden bire ortaya çıkan salgınlarda olduğu kadar epidemiyolojik çalışmalarda da kullanılmaktadır (Gouby vd., 1992; Finney, 1993; Goering, 1993;; Maslow vd., 1993; Schlichting vd., 1993; Swaminatha ve Matar, 1993; Leonard vd., 1995; Arda, 2000; Arai vd., 2007).

Pulsed Field Gel Electrophoresis, moleküler tiplendirme metotlarının “referans testi” olarak kabul edilmektedir (Olive and Bean, 1999). PFGE, prob hibridizasyon metotlarının yardımına başvurulmaksızın genomik (kromozomal) restriksiyon fragmentlerinin (parçalarının) basit bir şekilde gösterilmesine olanak veren bir metottur.

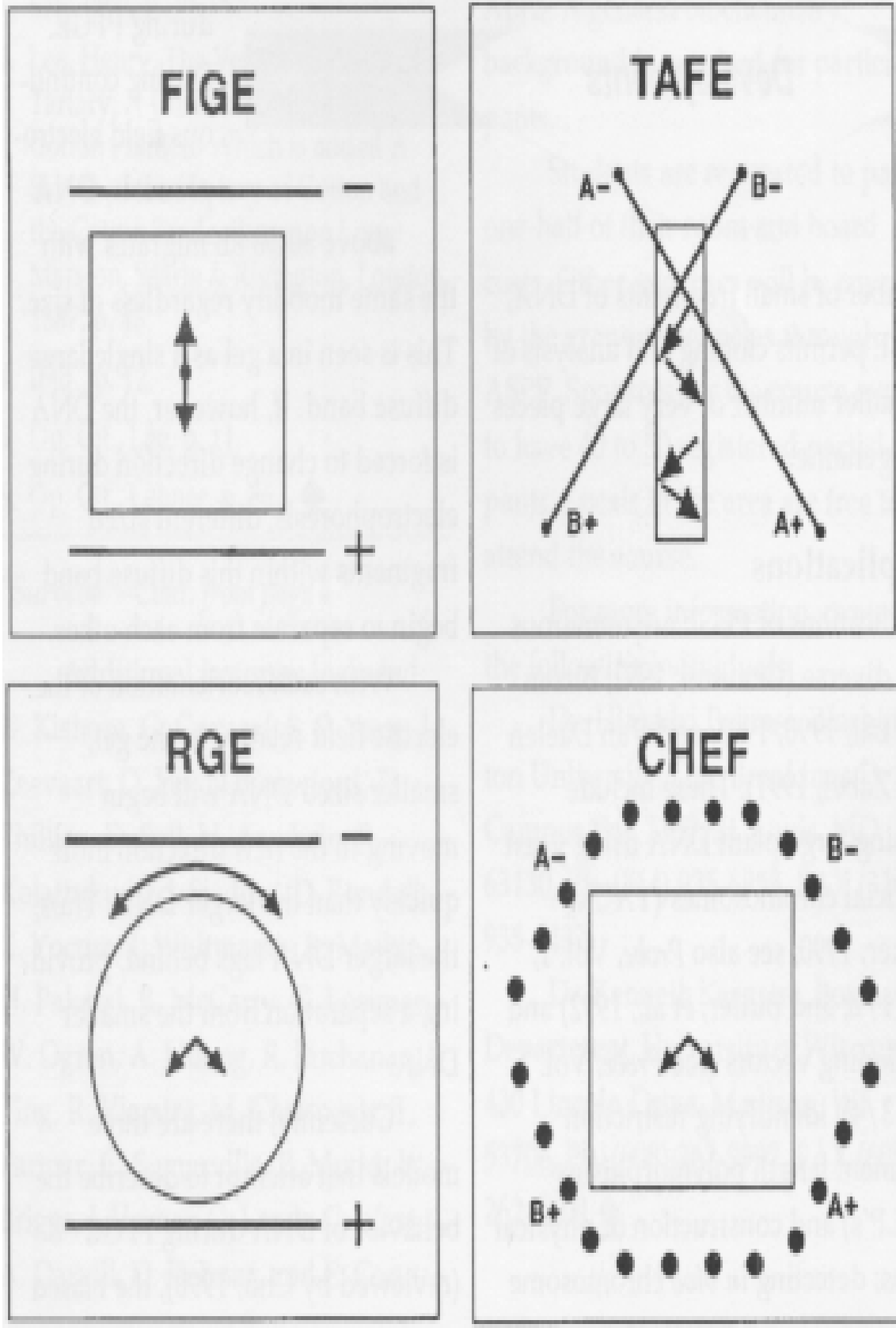
Ayrıca PFGE ile genomik DNA'nın 10–800 kb arasındaki çok büyük moleküler uzunluklara sahip fragmentlerin açık bir şekilde ayrılması mümkündür (Schwartz ve Cantor, 1984; Finney, 1993; Schwartz ve Cantor, 1984).

Dünyadaki bir çok referans laboratuvarlarında yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, bakteriyofaj ve serolojik metotlar kullanılmaktadır (Schlichting vd., 1993; Olsen vd., 1994). Ancak bu metotlar ne kadar faydalı olsalar da bakteriyel türlerin daha geniş bir tiplendirilmesinin yapılması için suş tiplendirme metotlarına gereksinim duyulmuştur. Şu anda PFGE bu ihtiyacı karşılayabilecek metotlardan biridir (Arbeit, 1995; Schlichting vd., 1993). Bakteri tiplendirilmesinde, yüksek bir üretim kabiliyeti ve ayırım yapabilme gücüne sahip olan PFGE, birden bire ortaya çıkan salgınlarda olduğu kadar endemik hastalıkların ortaya çıktığı popülasyonlardaki epidemiyolojik çalışmalarda da Gram negatif, Gram pozitif ve mycoplasma türlerinin ayırımında geniş bir şekilde faydalanılan bir metot olmuştur (Goering, 1993; Leonard vd., 1995; Maslow vd., 1993).

PFGE analizinde (Şekil 2.4), saf kültürden elde edilen bakteriler, erimiş agaroz jel içerisinde plug adı verilen kaplarda bloklandı ve bu agaroz blok, önce deterjan ve enzimle muamele edilerek bakterilerin kromozomu çıkarıldı ve sonra da spesifik bir restriksiyon enzimi ile seyrek bir şekilde kesme işlemi yapıldı. Oluşan fragmentleri içeren agaroz blok önceden belirlenen akım yönü (Şekil 2.5) değişiklikleri ile çalışan spesifik bir elektroforez aygıtında yürütme yapıldıktan sonra oluşan görünümü gözetlemek için ethidium bromide ile boyanarak yorumlanmaktadır (Murray vd., 1990; Goering ve Winters, 1992; Finney, 1993; Maslow vd., 1993; Swaminatha ve Matar, 1993; Matuchek vd., 1996; Olive and Bean, 1999; Arda, 2000; Durmaz vd., 2007).



Şekil 2.4. PFGE analizi (URL-5).



Şekil 2.5. PFGE'nin çeşitli akım yönleriyle çalışması (URL-6).

PFGE analiz sonuçlarının yorumlanmasında belli kriterler vardır.

-Aynı İzolat (Farksızlık): Aynı sayıda ve boyutlarda bant (Tablo 2.4) içeren izolatlar için kullanılmaktadır. Epidemiyolojik olarak yorumlandığında izolatların genetik olarak aynı olduğu kabul edilir (Gordillo vd., 1993; Miranda vd., 1991; Olsen vd., 1994; Tenover vd., 1995).

-Yakın ilişki İzolat: Salgın suş ile aralarında 2-3 bant (Tablo 2.5) farkı olan izolatlar için kullanılmaktadır. İzolat salgı suşuyla yakın ilişkili olarak değerlendirilir. Epidemiyolojik olarak yorumlandığında izolatların, salgın suşların bir parçası olma olasılığı vardır (Arbeit vd., 1993; Tenover vd., 1995).

-Muhtemel ilişki İzolat: Salgın suşlarıyla aralarında 4-6 bant (Tablo 2.5) farkı olan izolatlar için kullanılmaktadır. Bu izolatlar, salgın suşuyla aynı genetik soya sahiptir, fakat genetik olarak yakın ilişkili değildir. Epidemiyolojik olarak yorumlandığında izolatların, salgın suşlarla bağlantılarının çok az olduğu söylenmektedir (Tenover vd., 1995).

-İlişkisizlik: Salgın suşlarıyla aralarında 7 veya daha fazla bant (Tablo 2.5) farkı olan izolatlar için kullanılmaktadır. Epidemiyolojik olarak yorumlandığında izolatların, salgın suşlarla ilişkisiz olduğu söylenmektedir (Tenover vd., 1995).

Bu yorumlama kriterine göre, salgın suş ile izolatlar arasında fark yoksa böyle izolatlar Tip A olarak belirtilmekte, yakın veya muhtemelen ilişki varsa Tip A₁-A₂ olarak adlandırılmaktadır. Yakın veya muhtemelen ilişki izolatlar, büyük olasılıkla veya muhtemelen epidemiyolojik ilişkilidir diye rapor edilmektedir. Görünümler tatmin edici şekilde birbirinden farklıysa Tip B- Tip C olarak ifade edilmekte ve izolatların birbiriyle epidemiyolojik bağlantılarının olmadığı yönünde rapor edilmektedir (Arman,1998; Moellering, 1995; Kaygusuz, 2000; Craig, 1998).

Tablo 2.4. PFGE yorumlama kriteri (Tenover vd., 1995).

Kategori	Genetik Olay Sayısı	Fragment Farklılık Sayısı	Epidemiyolojik Yorumlama
Farksızlık	0	0	İzolat, kontrol ile farksız
Yakın ilişki	1	2-3	İzolat, kontrolün büyük olasılıkla parçasıdır.
Muhtemel ilişki	2	4-6	İzolat, kontrolün düşük olasılıkla parçasıdır
İlişkisizlik	≥3	≥7	İzolat, kontrol ile tamamen farklıdır.

2.1.6. Koruma ve Kontrol

Genellikle, balıkları korumak, tedavi etmekten daha ucuz, kolay ve etkilidir. Bir balıkçılık işletmesinde enfeksiyon ortaya çıktıktan sonra, bunun nedenini veya hangi hastalık olduğunu, nereden kaynaklandığını saptayınca kadar geçen süre içinde, hastalık ajanı mikroorganizma birçok balığa ve havuza bulaşarak yayılmakta ve dolayısıyla enfeksiyonu önlemek çok zor olmaktadır. Ölümün meydana geldiği durumlarda ise enfeksiyon daha tehlikeli olmakta ve işletmeyi büyük zararlara uğratmaktadır. Ayrıca sağaltım ve koruma masrafları da artmaktadır. Böyle durumlarda çoğu zaman, hastalığı sağaltmak olanaksızlaşabileceği gibi, portörlerin ve kronik enfeksiyonların oluşması yanısıra, antibiyotiklere dirençli bakteriyel ajanların, asemptomatik taşıyıcıların da artmasına yol açmaktadır. İşletmeye patojenik etkenlerin girmesini önlemek, balıkları çeşitli enfeksiyonlardan korumak ve hastalığı kontrol altına alabilmek için kuluçkahane ve havuzların kontrolü, su aktarmalı havuzların kullanılmaması, kuluçka evi ve havuzlardaki suların kontrolü, iyi bakım-beslemenin uygulanması, her türlü stres faktörünün minimal düzeye indirilmesi, popülasyonun normal sınırlarda olması, havuz, araç ve gereçlerin periyodik dezenfeksiyonu ve immunizasyon gibi biyogüvenlik önlemlerinin uygulanması gereklidir (Munson ve Hauck, 1993; Arda vd., 2005).

Anaç balıkların *F. psychrophilum* ile kontaminasyon olmuş doku, sperma veya yumurtaları potansiyel taşıyıcı olabilir. Eğer *F. psychrophilum* yumurtanın perivitellin boşluğuna yerleşmiş ise iyodoform dezenfeksiyonu etkili olmaz. Yüzeysel dezenfeksiyonlarda rutin olarak iyodoform (50 mg 1 litre suda 30 dakika veya 100 mg 1 litre suda 10 dakika) tedavi amaçlı kullanılır. Yumurtaların dezenfeksiyonunda ayrıca hidrojen peroksit (100 mg 1 litre suda) veya glutaraldehid (200 mg 1 litre suda) banyo şeklinde 20 dakika süreyle tavsiye edilir (Baranson, 1995; Rangdale, 1997; Timur ve Timur, 2003).

Diğer bakteriyel balık patojenleri ile karşılaştırıldığında, *F. psychrophilum* ile ilgili olarak spesifik antijen immunitesi ve deneysel aşı geliştirme bilgilerinin yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Balık serumundaki komplement sistem humoral savunmada rol oynamasına rağmen, *F. psychrophilum* ile doğal enfekte olmuş gökkuşağı alabalığı yavrularında etkene immun yanıtın yetersiz kaldığı ifade edilmiştir (Nematollahi vd., 2003; Ekman 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

Etkenin özellikle gökkuşağı alabalığı yavrularında bağışıklık sistemini baskı altına alarak enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir. Etkene yönelik lisanslı aşı bulunmamaktadır. Deneysel olarak periton içine uygulanan bakterin aşısının, yavru alabalıkta bağışıklık sağlamadığı belirtilmiştir (Nematollahi vd., 2003; Ekman 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

2.1.7. Sağaltım

Psikrofiloz enfeksiyonu da dahil diğer bakteriyel balık hastalıklarında, birçok antibiyotiğin tek başına veya kombine edilerek hastalıkların kesin teşhisi yani etken izolasyonu ve identifikasyonu yapılmadan bilinçsizce ve yaygın bir şekilde kullanılması dirençli bakteri suşlarının gelişmesine (Bowser 1999; Midtlyng 2002) ve kullanımını takiben yasal bekletme sürelerine tam olarak uyulmaması sonucu balık ve diğer su ürünlerinde kalıntıya neden olduğu vurgulanmıştır (Björklund vd., 1990; Anonim, 2003).

Enfeksiyon çıktığında, havuzlardaki hasta balıklar ayrılarak akvaryumlara alınırlar. Bunlar, antibiyogram test sonucuna göre, yemlere katılan antibiyotikler ve sulfanamidlerle sağaltılmaya çalışılır. Kuluçkahanedeki balıklar için de aynı antibiyotikler ve sulfanamidler uygulanır (Arda, 1973; Arda vd., 2005).

Hastalığın eksternal formlarında, antiseptik veya antibiyotik banyolardan yararlanılabilir (Arda vd., 2005). Kimyasal banyoların *F. psychrophilum*'a karşı etkisi sınırlıdır. Çünkü bakteri genellikle sistemik enfeksiyonlar meydana getirir. Yavru balıklar 0.5 µg nitrofuran 1ml suya veya 10–15 mg nitrofuran 1 litre suya ilave edilerek 60 dakika süreyle banyo yaptırılır. Yine furpyrinol (1 mg/ 1 litre suya karıştırılarak) de 40–50 dakika süreyle banyo tarzında uygulanmaktadır (Arda, 1973; Çolak, 1982).

Enfeksiyonun eksternal lezyonlarının tedavisinde; 10–50 mg oksitetrasiklin bir litre suya ya da 2 mg quaternar ammonium bir litre ilave edilerek balıklara banyo yaptırılması tavsiye edilir. Bu tedavinin kavdal yüzgeç erozyonlarına karşı etkisi azdır. Böyle olaylarda 2 mg potasyum permanganat bir litre suya karıştırılarak balıklara banyo yaptırılır. Sulfisoxole günlük 220 mg miktarında 1 kg yeme katılarak 10 gün süreyle veya 88 mg Sulfisoxole günlük 1 kg yeme katılarak 26 gün süreyle; 220–440 mg Sulfamerazin günlük 1 kg yeme katılarak standart diyet; 75 mg oksitetrasiklin günlük 1 kg yeme katılarak 10 gün süreyle yemlere katılarak verilir (Cipriano ve Holt, 2005). Bir kg balığa 50-75 mg Terramisin günlük doz olarak 10 gün süreyle (Arda, 1973); 1.5 mg Furanance bir litre suya katılarak bir saat süreyle 3 gün uygulanır (Cengizler, 2000). Bir kg balığa 80 – 100 mg

Amoksisilin bir gün süreyle 7 gün boyunca yemlere katılarak verilir (Baranson, 1995; Rangdale vd., 1997; Rimaila- Parmanen vd., 1997).

2.2. Bakterilerin Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

Antibakteriyel ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle ilaçların bakteriyostatik ve bakterisit aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler (Baker vd., 1991; Jorgensen, 1997; Gülay, 1999; Lalitha, 2004):

1. Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri
2. Disk difüzyon yöntemi
3. Gradyent difüzyon (Etest®) yöntemi
4. Antibakteriyel ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması olarak sıralanabilir

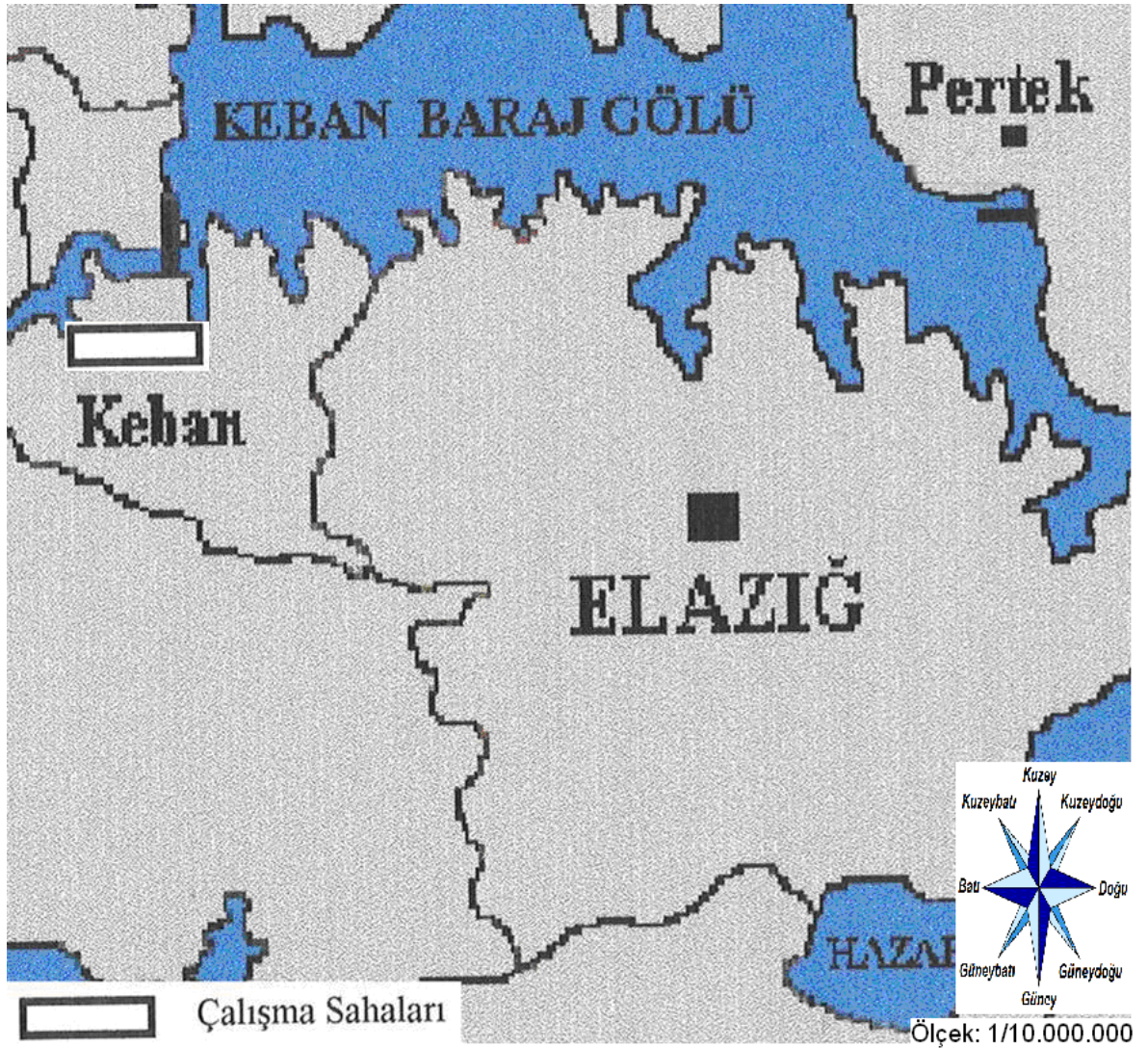
Verilen literatür bilgilerinden yararlanılarak bu çalışmada; Elazığ ili Keban ilçesinde bulunan alabalık işletmelerindeki kuluçkahanelerde rastlanan Psikrofiloz hastalığının etkeni olan *F. psychrophilum*'un fenotipik ve genotipik özellikleri incelendi.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Alabalık Yavru Üretimi Yapan İşletmelerin Yeri

Bu çalışmaya konu olan yavru alabalık yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmeler Elazığ iline 45 km uzaklıktaki Keban ilçesinde (Şekil 3.1) bulunmaktadır.



Şekil 3.1. Yavru üretimi yapan gökkuşağı alabalığı işletmelerinin bulunduğu Keban ilçesi.

3.1.1.1. Balıkların Elde Edildiği İşletmelerin Konum ve Kapasiteleri

3.1.1.1.1. I Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler

Elazığ'ın Keban ilçesine 1 km uzaklıkta olan bu işletme, ilçenin girişinde yer almaktadır (Şekil 3.2). İşletme; kuluçkahane, anaç, genç ve yavru havuzlarından oluşmaktadır. Burada yılda 20.000.000 adet yavru alabalık yetiştirilmekte ve 4500–5000 ton balık üretimi yapılmaktadır. Bu işletmelerde; döllenmiş yumurtaların konulduğu kuluçka dolabı, keseli yavruların yemlemeye kadar geçen süre içinde tutuldukları tekneler, ön yavru ve anaç balık havuzları bulunmaktadır. Yavrular yemleme başladıktan sonra ön yavru besleme havuzlarına alınarak 5 g'a kadar büyütülür. Daha sonra bu yavrular Keban, Karakaya, Çat baraj gölleri ve Fırat nehrinde bulunan kafeslere taşınmaktadır.

Bu işletmeden 8 ay boyunca 40 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilen 40 adet yumurta, 50 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 40 örnek, 2 ml'lik spermillerden 50 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 100 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek ve bağırsak örnekleri, 64 adet su ve 30 adet de yem örnekleri olmak üzere toplam 974 adet örnek alındı. Ayrıca işletmedeki sağlıklı gökkuşığı alabalıklarından örnekler alınarak *F. psychrophilum* yönünden portör olup olmadıkları kontrol edildi.

3.1.1.1.2. II Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler

Elazığ'ın Keban ilçesine 2 km uzaklıkta olan bu işletme, Keban hidroelektrik santraline yakın bir yerde bulunmaktadır (Şekil 3.2). İşletme; kuluçkahane, anaç, genç ve yavru havuzlarından oluşmaktadır. Burada yıllık 250 ton balık üretimi yapılmaktadır. Yumurtaların alındığı ve yemlemeye kadar geçen süre içinde tutuldukları tekneler kuluçkahanede bulunmaktadır. Yavruların bir kısmı yemleme başladıktan sonra yavru havuzlarına taşınmaktadır.

Bu işletmeden 8 ay boyunca 40 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilen 40 adet yumurta, 55 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 50 örnek, 2 ml'lik spermillerden 55 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 150 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı,

hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek ve bağırsak örnekleri ile 60 adet su ve 30 adet yem örnekleri olmak üzere toplam 1040 adet örnek alındı. Ayrıca işletmedeki sağlıklı gökkuşağı alabalıklarından örnekler alınarak *F. psychrophilum* yönünden portör olup olmadıkları kontrol edildi.

3.1.1.1.3. III Nolu Gökkuşağı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler

Elazığ'ın Keban ilçesine 3 km uzaklıkta olan bu işletme, Keban baraj suyunun döküldüğü Fırat nehri kıyısında yer (Şekil 3.2) almaktadır. İşletmede, kuluçkahane, anaç, genç ve yavru kafesler bulunmaktadır. Burada yılda 1.000.000 adet yavru alabalık yetiştirilmekte ve yıllık 350–500 ton balık üretimi yapılmaktadır. Bu işletmenin Fırat nehrinde 2 adet ve Keban baraj gölünde 1 adet kafes işletmesi bulunmaktadır. Kuluçkahane ve ön yavru besleme havuzları Fırat nehri kıyısında bulunan binada yer almaktadır. Yavrular yemleme başladıktan sonra ön yavru büyütme havuzlarına alınarak 5 g'a kadar büyütülmektedir. Daha sonra bu yavrular Keban barajında bulunan kafeslere taşınmaktadır.

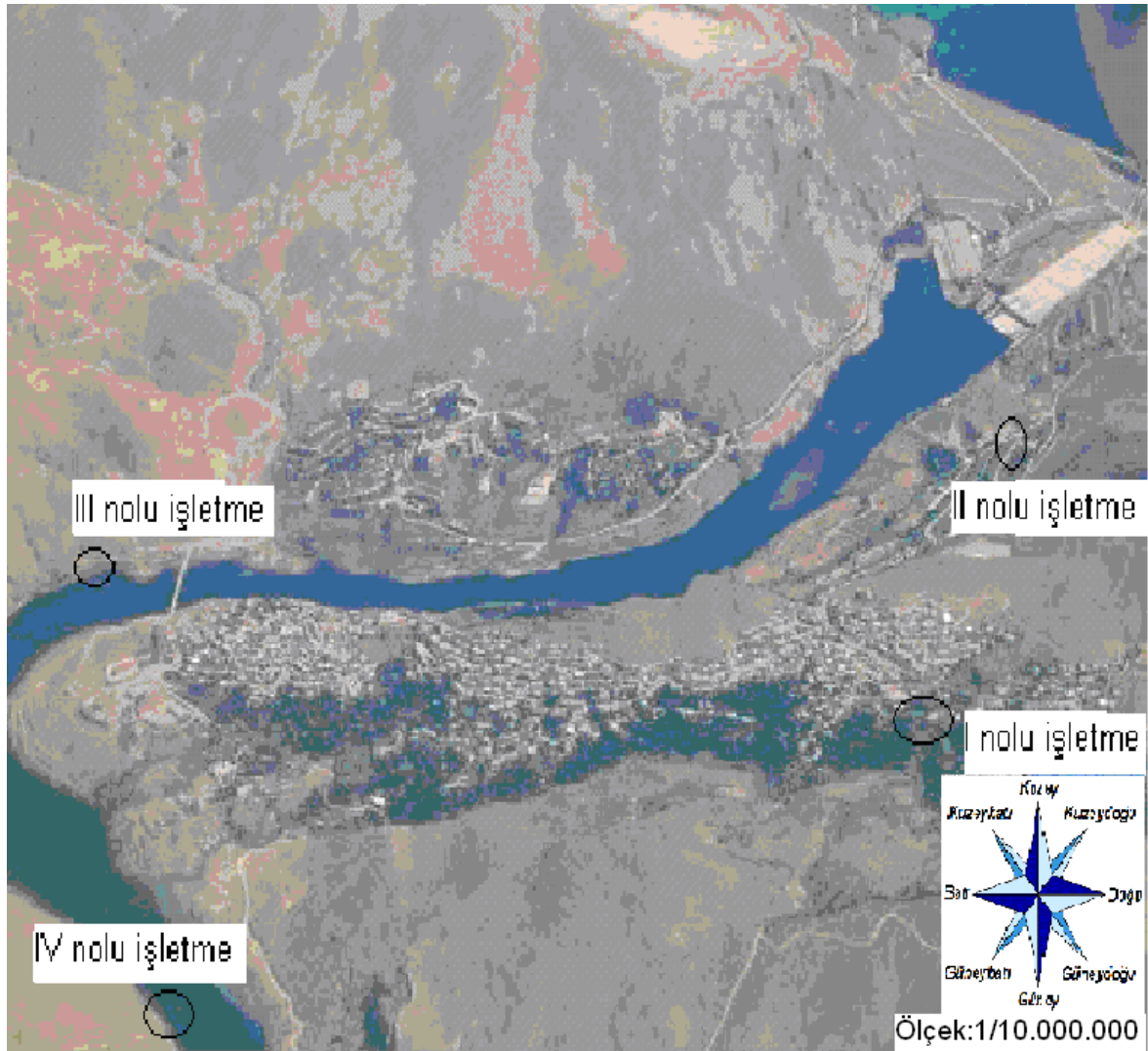
Bu işletmeden 8 ay boyunca 50 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilen 50 adet yumurta, 60 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 50 örnek, 2 ml'lik spermlerden 40 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 120 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak örnekleri, 40 adet su ve 30 adet yem örnekleri olmak üzere toplam 1000 adet örnek alındı. Ayrıca işletmedeki sağlıklı gökkuşağı alabalıklarından örnekler alınarak *F. psychrophilum* yönünden portör olup olmadıkları kontrol edildi.

3.1.1.1.4. IV Nolu Gökkuşağı Alabalığı Üretim İşletmesi ve Alınan Örnekler

Elazığ'ın Keban ilçesine 5 km uzaklıkta olan bu işletme, Keban baraj suyunun döküldüğü Fırat nehir kıyısında yer (Şekil 3.2) almaktadır. İşletmede kuluçkahane, anaç, genç ve yavru kafesler bulunmaktadır. Burada yılda 2.000.000 adet yavru alabalık yetiştirilmekte ve yıllık 850–1000 ton alabalık üretimi yapılmaktadır. Bu işletmenin Fırat nehrinde 1 adet ve Keban baraj gölünde 1 adet kafes işletmesi bulunmaktadır. Kuluçkahane, ön yavru besleme havuzları Fırat nehri kıyısında bulunan binada yer almaktadır. Yavrular yemleme başladıktan sonra ön yavru büyütme havuzlarına alınarak 5

g'a kadar büyütülür. Daha sonra bu yavrular Keban barajında bulunan kafeslere taşınmaktadır.

Bu işletmeden 8 ay boyunca 45 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilen 45 adet yumurta, 55 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 55 örnek, 2 ml'lik spermlerden 40 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 140 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak örnekleri, 40 adet su ve 30 adet yem örnekleri olmak üzere toplam 1010 adet örnek alındı. Ayrıca işletmedeki sağlıklı gökkuşağı alabalıklarından örnekler alınarak *F. psychrophilum* yönünden portör olup olmadıkları kontrol edildi.



Şekil 3.2. Keban ilçesinde bulunan yavru gökkuşağı alabalığı işletmelerinin konumları.

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.1. *Flavobacterium psychrophilum*'un İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

F. psychrophilum izolasyonu için Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (Sıvı besiyeri) (CB), Modified (Modifiye) Anacker ve Ordal Agar (MAOA), Modified Anacker ve Ordal Broth (MAOB), Tryptone (Trypton) Yeast Extract (Maya özü) Salt (Tuz) Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Extract Salt Broth (TYES-B), Enriched (Zenginleştirilmiş) Anacker ve Ordal + Fetal Bovine (Sığır Fetüs) Serum + Agar (EAO+FBS+A), Enriched Anacker ve Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+B), Tryptone Yeast Extract Salt Agar + Tobramycin (TYES-A+T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum Agar (TYFBS-A) spesifik besiyerleri (Tablo 3.1) kullanıldı (Pacha, 1968; Kusuda, 1982; Daskalov vd., 1999; Austin ve Austin, 1987; Madetoja ve Wiklund, 2002; Starliper vd., 2007; Kumagai vd., 2004; Toshio vd., 2006; Stenholm vd., 2008; Holt, 1993; Holt, 1987; Vastos vd., 2003).

Tablo 3.1. *F. psychrophilum*'un izolasyonu için hazırlanan besiyerleri.

CYTOPHAGA AGAR Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Agar: 9 g Distile su: 1000 ml	CYTOPHAGA BROTH Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Distile su: 1000 ml
MODIFIED ANACKER VE ORDAL AGAR (MAOA) Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Agar: 10–12 g Distile su: 1000 ml	MODIFIED ANACKER VE ORDAL BROTH (MAOB) Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Distile su: 1000 ml

Tablo 3.1'in devamı

TRYPTONE YEAST EXTRACT SALT AGAR (TYES-A) Tryptone: 4 g Yeast extract: 0,4 g MgSO₄.7H₂O: 0,5 g CaCl₂.2H₂O: 0,5 g Agar: 11g Distile su: 1000 ml pH: 7,2	TRYPTONE YEAST EXTRACT SALT BROTH (TYES-B) Tryptone: 4 g Yeast extract: 0,4 g MgSO₄.7H₂O: 0,5 g CaCl₂.2H₂O: 0,5 g Distile su: 1000 ml pH: 7,2
ENRICHED ANACKER AND ORDAL + FETAL BOVINE SERUM+ AGAR (EAO+FBS AGAR) Tryptone: 5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,5 g MgSO₄.7H₂O: 0,5 g Sodyum asetat: 0,2 g Fetal Bovine Serum: 50 ml Agar: 10 g Distile su: 1000 ml	ENRICHED ANACKER AND ORDAL + FETAL BOVINE SERUM (EAO+FBS BROTH) Tryptone: 5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,5 g MgSO₄.7H₂O: 0,5 g Sodyum asetat: 0,2 g Fetal Bovine Serum: 50 ml Distile su: 1000 ml
TRYPTONE YEAST EXTRACT SALT AGAR+ TOBRAMYCİN (TYESA+ T) Tryptone: 4 g Yeast extract: 0,4 g MgSO₄.7H₂O: 0,5 g CaCl₂.2H₂O: 0,5 g Agar: 11g Tobramycin: 5 µg/ml Distile su: 1000 ml pH: 7,2	TRYPTONE YEAST EXTRACT FETAL BOVINE SERUM (TYFBS) AGAR Tryptone: 0,5 g Yeast Extract: 0,2 g Agar: 20 g FBS: 50 ml Distile su: 1000 ml pH: 7,2

3.1.2.2. *Flavobacterium psychrophilum*'un İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri

3.1.2.2.1. Cytophaga Broth

Cytophaga broth (sıvı besiyeri) hazırlanmasında; 0,5 g tripton, 0,5 g yeast extract, 0,2 g beef (sığır eti) extract, 0,2 g sodyum asetat ve 1000 ml distile su (pH 7,2–7,4) kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra tüplere 4'er ml aktarıldı ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Wiklund vd., 1994; Soltani vd., 1995; Nematollahi vd., 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

3.1.2.2.2. Tryptone Yeast Extract Salts Broth (TYES-B)

Tryptone yeast extract salts sıvı besiyerinin hazırlanmasında; 4 g tryptone, 0,4 g yeast extract, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 0,5 g CaCl₂.2H₂O ve 1000 ml distile su (pH 7.2) kullanıldı. Karışım içerisindeki maddeler eriyene kadar 45–50°C'ye ayarlı benmariye (su banyosuna) konuldu. Kapalı deney tüplerine 5 ml miktarında paylaştırıldı ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Holt vd., 1993).

3.1.2.2.3. Nitrat Broth

Nitrat broth'un hazırlanmasında; 3,0 g beef extract, 5,0 g pepton, 1,0 g potasyum nitrat ve 1000 ml distile su kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra içerisindeki maddeler eriyene kadar 45–50°C'ye ayarlı benmariye konuldu. Kapalı deney tüplerine 5'er ml aktarıldı ve 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Bilgehan, 1995).

3.1.2.2.4. Oksidasyon- Fermentasyon Besiyeri (O/F)

Hugh – Leifson besiyerinden 11 g tartıldı ve 1000 ml distile suya karıştırılarak, 45–50°C'deki benmariye bırakıldı. Daha sonra tüplere 4'er ml aktararak 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Arda, 2000).

3.1.2.2.5. Jelatin Hidrolizi

TYES agar karışımı 45–50°C'ye ayarlı benmaride homojen hale gelene kadar bekletildi ve pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda

sterilize edildi. Bu besiyerine % 4 oranında steril jelatin ilave edilerek, petri kaplarına döküldü (Bilgehan 1995; İnce 2005).

3.1.2.2.6. Metil Kırmızısı - Voges Proskauer (MR-VP)

Metil Kırmızısı - Voges Proskauer (MR-VP) ortamından 17 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar 45–50°C'ye ayarlı benmariye konuldu. Bu karışımdan tüplere 4'er ml aktarıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Arda, 2000).

3.1.2.2.7. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glukan)

Hazırlanacak Cytophaga agar besiyeri içerisine % 0,003 kongo kırmızısı ilave edildi. Karışım hazırlandıktan sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve 45–50°C'ye ayarlı benmaride soğutuldu. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Lorenzen, 1994; Lorenzen vd., 1997).

3.1.2.2.8. Simmons Sitrat Yatık Agar

Simmons Sitrat ortamından 23 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar 45–50°C'ye ayarlı benmariye konuldu. Tüplere bu karışımdan 4'er ml aktarıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve otoklavdan çıkarıldıktan sonra tüpler 45° eğimli olacak şekilde konularak soğutuldu (Arda, 2000).

3.1.2.2.9. Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptic Soy Agar karışımından 40 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

3.1.2.2.10. Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptic Soy Broth karışımından 30 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

3.1.2.2.11. Plate Count Agar (PCA)

Plate Count Agar karışımından 22,5 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

3.1.2.2.12. Mueller-Hinton Agar (MHA)

Mueller-Hinton Agar karışımından 34 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı.

3.1.2.2.13. Kanlı Agar

TSA ortamından 40 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. Yaklaşık 45–50°C’ye kadar soğutulduktan sonra % 5 steril defibrine koyun kanı eklendi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

3.1.2.2.14. MacConkey Agar (MCA)

Macconkey Agar ortamından 51,5 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. Yaklaşık 45–50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

3.1.2.2.15. NaCl içeren TYES

Hazırlanan TYES agar besiyeri içersine sırasıyla % 0, % 0,5, % 1,5 ve % 3 NaCl ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Bilgehan, 1995; Lorenzen vd., 1997; Ekman, 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

3.1.2.2.16. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Hazır TSIA besiyerinde yeteri miktarda tartılıp distile su ile sulandırıldı ve eriyene kadar su banyosunda bekletildi. Kapaklı deney tüplerine 5 ml miktarında paylaştırıldı ve 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Cowan, 1974; Arda, 2000).

3.1.2.2.17. İndol Besiyeri

İndol besiyerinin hazırlanmasında; 10 g pepton, 5 g NaCl, 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi. (Cowan, 1974; Arda, 2000).

3.1.2.2.18. Eskülin Besiyeri

Eskülin besiyeri hazırlanmasında; 10 g pepton, 5 g NaCl, 1 g escülin 0,5 g ferik amonyum 1000 distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Kapaklı deney tüplerine 5 ml miktarında paylaştırıldı ve 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Arda, 2000).

3.1.2.2.19. Nişastalı Agar

Nişastalı agar hazırlanmasında; 10 g beef extract, 10 g pepton, 5 g NaCl, 10 g nişasta, 20 g agar 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Cowan, 1974; URL–2).

3.1.2.2.20. Jelatin Broth

Jelatin broth hazırlanmasında; 10 g sığır ekstraktı, 10 g pepton, 5 g NaCl 1000 ml distile su, % 10 oranında jelatin ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Kapaklı deney tüplerine 5 ml miktarında paylaştırıldı ve 121°C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (URL–2).

3.1.2.2.21. Kazein Hidrolizi

TYES agara % 2 süt tozu ilave edilerek hazırlandı.

3.1.2.2.22. Tween 20 ve 80 Hidrolizi

TYES agara ayrı ayrı % 1'lik Tween 20 ve Tween 80 ilave edilerek hazırlandı.

3.1.2.2.23. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Fizyolojik tuzlu su; 8,5 g NaCl, 1000 ml distile suya eklenerek hazırlandı.

3.1.3. Kimyasallar ve Ayıraçlar

3.1.3.1. % 20 Potasyum Hidroksit

Potasyum Hidroksit (KOH) 20 g,
Distile su 100 ml ilave edilerek hazırlandı.

3.1.3.2. Hidrojen Peroksit (% 3'lük)

H₂O₂ 3 ml,
Distile su 100 ml ilave edilerek hazırlandı.

3.1.3.3. Gram Boyama Ayıraçları

- a) Kristal viole eriği
- b) Lugol eriği
- c) % 96'lık etil alkol
- d) Sulu fuksin eriği

3.1.3.4. Kovaks İndol Ayıracı

Isoamylalkol 15 ml,
p-dimethylaminobenzaldehit 1 g,
0,1 M konsantre HCl 5 ml,
p-dimethylaminobenzaldehit isoamylalkol içinde 50–55°C'lik su banyosunda eritildi ve soğutuldu. Asit ilave edildi (Cowan, 1974).

3.1.3.5. Oksidaz Ayıracı

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 g,

Distile Su 100 ml,

Kimyasal madde distile su içerisinde eritildi. Işık almayacağı bir şişe içinde ve buzdolabında muhafaza edildi. Otooksidasyonu geçiktirmek için % 1 askorbik asit ilave edildi (Cowan, 1974).

3.1.3.6. Lugol Solusyonu (1/5)

Lugol (stok) solusyonu:

İyot (I) 5 g,

Potasyum iyodür 10 g,

Distile su 100 ml,

I ve KI 10ml distile su ile havanda ezilerek eritildi. 100mL tamamlandı.

Stok lugol solusyonu 1 ml,

Distile su 5 ml,

Stok lugol solusyonundan 1 ml ve 5 ml distile su ilavesiyle hazırlandı.

3.1.3.7. 400 ppm Povidin/iodin Solüsyonu

% 10'luk polivinilpirolidon (Batticon)'dan 400 ppm dozunda hazırlandı.

3.1.3.8. Metil Kırmızısı Ayıracı

Metil kırmızısı ayıracının hazırlanmasında 0,05 g metil kırmızısı, 150 ml etil alkol ve 100 ml distile su kullanıldı. Metil kırmızısı etil alkolde eritildikten sonra üzerine distile su eklendi (Bilgehan, 1995).

3.1.3.9. Fenol Kırmızısı Ayıracı (% 0,2'lik)

Bir havanda 0,2 g fenol kırmızısı üzerine 23,5 ml 20 normal sodyum hidroksit eriği azar azar eklenerek eritildi. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak balon jode çalkalandıktan sonra renkli şişeler içerisinde oda ısısında saklandı (Bilgehan, 1995).

3.1.3.10. Nitrat A Ayıracı

1 g sülfanilik asit,

100 ml N asetik asit ilave edilerek hazırlandı.

3.1.3.11. Nitrat B Ayıracı

0,6 ml alfa-naftilamin,

100 ml N asetik asit ilave edilerek hazırlandı.

3.1.3.12. 1/80 Normal’lik Amonyum Oksalat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$)

0,4441 g Amonyum Oksalat saf suda çözündürüldü ve saf su ile 500 ml’ye tamamlandı.

3.1.3.13. 1/80 Normal’lik Potasyum Permanganat (KMnO_4)

Bir behere 1 litre saf su konularak kaynatıldı. Daha sonra 0,395 g KMnO_4 ilave edilerek, iyice karıştırıldı ve çözündürüldü 15 dakika süreyle kaynatıldı. Ağzı kapatılarak soğumaya bırakıldı. Soğumuş çözelti cam pamuğundan süzüldü. Bu çözelti bir balon jode kaynatılıp soğutulmuş su ile 1 litreye tamamlandı.

3.1.3.14. 1/3 Seyreltilmiş Sülfirik Asit (H_2SO_4)

Bir hacim H_2SO_4 3 hacim safsu eklenerek hazırlandı.

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

3.1.4.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar

3.1.4.1.1. Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, P2308, St. Louis, MO)

Mililitresinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

3.1.4.1.2. TNES buffer tampon solüsyonu

20 mM Tris, pH 8,0,

150 mM NaCl,

10 mM EDTA,

% 0,2 SDS,

Yukarıdaki maddeler tartılıp ihtiyaç duyulan miktarda hazırlandı ve her örnek için 300 µl kullanıldı.

3.1.4.1.3. Phenol Equilibrated, Stabilized: Chloroform: Isoamyl alcohol 25:24:1 (A0889, Applichem, Darmstadt)

Phenol equilibrated, stabilized 500 ml/l

Chloroform 480 ml/l

Isoamyl alcohol 20 ml/l

pH (20°C) 7,6–8,0

Bu karışımdan her bir örnek için 600 µl miktarında kullanıldı.

3.1.4.1.4. Sodyum Asetat Kristalle

DNA'nın presipitasyonu amacı ile süspansiyona 0,1 volüm (3M) miktarında ilave edildi.

3.1.4.1.5. Absolute Ethanol (Mutlak Alkol, % 96 Etilalkol)

DNA'nın belirli ekstraksiyon aşamalarında kullanılmak üzere % 95, % 90 ve % 70 oranlarında hazırlandı.

3.1.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar

3.1.4.2.1. 10x PZR Buffer (MBI Fermentas)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25°C),

200 mM (NH₄)₂SO₄,

% 0,1 Tween 20,

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

3.1.4.2.2. MgCl₂ (MBI Fermentas)

MgCl₂ (25 mM), her PZR numunesi için 5 µl miktarında kullanıldı.

3.1.4.2.3. dNTP Set (100mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; MBI Fermentas)

Her deoksinükleotitten eşit oranda alındı ve steril distile su ile 1/20 oranında sulandırıldı. Her PZR numunesi için 4 µl kullanıldı.

3.1.4.2.4. Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas)

Her PZR numunesi için 1,25 U (0,25 µl) kullanıldı.

3.1.4.2.5. Primerler

Çalışmada kullanılan tüm primerler Integrated DNA Technologies (IDT) firmasından temin edildi. Primerler her PZR numunesi için ortalama 25–50 pmol olacak şekilde sulandırıldı.

3.1.5. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

3.1.5.1. 5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Tris 54,4 g,

Borik Asit 27,2 g,

EDTA 4,6 g,

Yukarıdaki maddeler tartılıp distile su ile 1 litre'ye tamamlandı ve pH 8,3'e ayarlandı. Elektroforez solüsyonu olarak 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

3.1.5.2. Agarose LE, (Promega, Madison)

PZR ürünlerinin gözlenmesi için hazırlanan agaroz jeli 1x TBE ile % 1,5 oranında hazırlandı.

3.1.5.3. 100 bp DNA Ladder (50µg/100µl; MBI Fermentas)

DNA Ladder 1/6 oranında sulandırıldı ve agaroz jel kuyucuğuna 5 µl yüklendi.

3.1.5.4. 6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (1 ml; MBI Fermentas)

Yükleme boyası 1/5 oranında sulandırıldı ve her 20 µl PZR ürünü için 5 µl kullanıldı.

3.1.5.5. Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt)

Ethidium bromide solüsyonundan 0,5 ml alınarak distile su ile 15 ml'ye tamamlandı. Agaroza jelin boyanması için 300 ml distile suya 600 µl ethidium bromide katılarak kullanıldı.

3.1.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Kullanılan Ayırıcılar

3.1.6.1. 50 ml 1M Tris Solüsyonu

6,05 g Tris,
Steril ultra saf su ile 50 ml ye tamamlandı.

3.1.6.2. 200 ml 0,5 M EDTA Solüsyonu

37,2 g EDTA,
Steril ultra saf su ile 200 ml ye tamamlandı.
pH: 8

3.1.6.3. 50 ml % 10 Sarcosyl Solüsyonu

5 g Sarcosyl
Steril ultra saf su ile 50 ml ye tamamlandı.

3.1.6.4. 250 ml HST (100 mM Tris, 100mM EDTA pH 8) Solüsyonu

25 ml 1 M Tris pH 8,
50 ml 0,5 M EDTA pH 8,
Steril ultra saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

3.1.6.5. 250 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 7.6) Solüsyonu

2,5 ml 1 M Tris-HCl,
0,05 ml 0.5 M EDTA,
Steril ultra saf su ile 250 ml ye tamamlandı.

3.1.6.6. 1000 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8)

10 ml 1 M Tris pH 8,
2 ml 0,5 M EDTA pH 8,
Steril ultra saf su ile 1000 ml ye tamamlandı.

3.1.6.7. 100 ml Hücre Lizis Buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 8 + % 1 Sarcosyl)

5 ml 1 M Tris pH 8,
10 ml 0,5 M EDTA pH 8,
10 ml % 10 Sarcosyl,
Steril ultra saf su ile 100 ml ye tamamlandı.

3.1.6.8. 50 ml Hücre Lizis solüsyon I (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA)

2,5 ml 1 M Tris-HCl,
5 ml 0,5 M EDTA,
Steril ultra saf su ile 50 ml ye tamamlandı.

3.1.6.9. 50 ml Hücre Lizis Solüsyon II (0.5 M EDTA, % 1 sarcosyl)

50 ml 0,5 M EDTA,
0,5 g sarcosyl eklenerek çözdürüldü.

3.1.6.10. 25 ml 10X H buffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 1000 Mm NaCl, 10 mM Dithioerythritol)

12,5 ml 1 M Tris-HCl,
0,238 g MgCl₂,
1,430 g NaCl,
0,0385 g DTE,
Steril ultra saf su ile 25 ml ye tamamlandı.

3.1.6.11. 15 ml % 20 SeaKem Gold (SKG)

3 g SeaKem Gold (SKG)

Steril ultra saf su ile 15 ml ye tamamlandı.

3.1.6.12. 500 ml 10 X TBE

54,4 g Tris,

27,2 g Borik Asit,

4,6 g EDTA,

Steril ultra saf su ile 500 ml ye tamamlandı.

3.1.7. Antibakteriyel Duyarlılık Testleri

Çalışma kapsamında kullanılan antibakteriyel tanı disklerinin isimleri ve miktarları Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan antibakteriyel diskler, miktarları ve standart zon çapları (Anonim, 2000; Anonim, 2001).

Antibakteriyeler ve disk içerikleri (µg /Ü)	Dirençli ≤ mm (R)	Orta derece duyarlı mm (I)	Duyarlı ≥ mm (S)
Gentamisin (CN) (10 µg)	12	13–14	15
Amoksisilin (AX) (25 µg)	8	9–10	11
Amoksisilin/Klavulanik asit (AMC) (30 µg)	14	15–19	20
Amikasin (AK) (30 µg)	14	15–16	17
Ampisilin (AMP) (10 µg)	13	14–16	17
Kloramfenikol (C)(30 µg)	12	13–17	18
Seftriakson (CAZ) (30 µg)	2	3	4
Sefazolin (CZ)(30 µg)	14	15–17	18
Sefoperazon (CEP)(75 µg)	15	16–20	21
İmipenem (İPM) (10 units)	13	14–15	16
Eritromisin (E) (15 µg)	13	14–22	23
Enoksasin (EN) (10 µg)	14	15–17	18
Klaritromisin (CLR) (15 µg)	13	14–17	18
Siprofloksasin (CIP) (5 µg)	15	16–20	21
Nitrofurantin (F/M) (300 µg)	14	15–16	17

Tablo 3.2'nin devamı

Sulfametoksazol (SMZ) (100 µg)	10	11–15	16
Penisilin (P) (10 Ünite)	14	-	15
Oksitetrasiklin (OT) (30 µg)	14	15–18	19
Piperasillin (PIL) (100 µg)	17	18–20	21
Furazolidone (FP) (100 µg)	10	11–12	13
Basitrasin (B) (30 µg)	8	9–12	13
Optokin (OP) (30 µg)	5	6–14	15
Batrim - Trimetoprim + Sulfametoksazol (BC) (1,25µg+23,7 µg)	19	20–28	29
Enrofloksasin (ENR) (5 µg)	15	16–20	21
Florfenikol (FFC) (30 µg)	14	15–18	19
Streptomisin (S) (10 µg)	11	12–14	15
Neomisin (N) (30 µg)	12	13–16	17
Klindamisin (CC) (2 µg)	15	16–18	19
Ofloksasin (OFX) (5 µg)	12	13–15	16
Vankomisin (VA) (30 µg)	14	15–16	17
Tobramisin (NN) (10 µg)	12	13–14	15
Sefoksitin (FOX) (30µg)	14	15–17	18
Nalidiksik Asit (NA) (3 0µg)	13	14–18	19
Netilmisin (NET) (30 µg)	12	13–14	15
Aztreonam (ATM) (30 µg)	15	16–21	22
Linkomisin (LC) (10 µg)	9	10–11	12
Trimetoprim (TMP) (5µg)	20	21–28	29

3.1.8. Referans Kültür

İşletmelerden izole edilen *F. psychrophilum* şüpheli izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi; PZR tekniğinin herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek ve uygun DNA ekstraksiyon yöntemi uygulanması; ayrıca Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tekniğinin

optimizasyonunun yapılması ve gen tiplendirilmesinin gerçekleştirilmesi amacıyla *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu İspanya’da bulunan Centro de Biotecnología Animal laboratuvarından, *Esherichia coli* ise Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edildi.

3.1.9. Kullanılan Diğer Malzemeler

Yavru üretimi yapan dört farklı işletmede yumurta, sperm, ovaryum sıvısı, döllenmiş yumurta ve gözlenmiş yumurtaların laboratuvara taşınması için 10–15 ml’lik tüpler, 50–100 ml’lik erlenmayerler, 24 tüp alan sporlar, 15–20 litre’lik termos ve çok sayıda buz kalıpları kullanıldı. Besin keseli yavru ve yavruların kuluçka dolabında, kuluçka teknesinde ve havuzlardan alınması için 10–40 cm yarıçaplı kepçeler; yavruların taşınmasında kullanılan 10–20 litre’lik plastik poşetlerden yararlanıldı. Yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurtaların besin keseli yavru ve 5 g’dan küçük yavruların ezilmesi için kullanılan steril örnek poşeti ve Stomacher homojenizatörden faydalanıldı.

Laboratuvarda; petri kutusu, pipet, beher glass, balon, mezür, lam ve lamel gibi cam malzeme ve PZR siklusları için gerekli sıcaklık ve zamanın programlanabildiği ısıtma bloklarına sahip DNA Thermocycler (termal çevirici-PZR- cihazı), agaroz jel hazırlamada kullanılan mikrodalga fırın elektroforez ve güç kaynağı, ultraviyole transillüminatör kullanıldı.

PFGE (CHEF- DR II) analizi için gerekli akım voltajı, zaman ve sıcaklık programlandığı ısıtma ve soğutma bloklarına sahip PFGE cihazı, agaroz kalıbı spektrofotometre, çalkalayıcı benmari, derin dondurucu, otoklav, etüv, kuru hava sterilizatörü, mikrosantrifüj, mini çalkalayıcı, zirkonyum boncukları, eppendorf pipetleri, pH metre, hassas terazi, binoküler mikroskop, spor, bek alevi ve öze kullanıldı.

3.1.10. *Flavobacterium psychrophilum*’un Araştırıldığı Yumurta, Sperm, Ovaryum Sıvısı, Keseli Yavru, Yavru, Su ve Yem Örnekleri

Elazığ ili Keban ilçesinde faaliyet gösteren dört adet yavru üretimi yapan gökkuşağı alabalığı işletmesine 01.12.2008 ve 30.07.2009 tarihleri arasında ayda iki kez olmak üzere gidildi. Balıkların sağılmaya başlanmasından itibaren 15 günlük periyotlar halinde yumurta, sperm, ovaryum sıvısı, keseli yavru, yavru, su ve yem örnekleri alınmaya başlandı. Çalışmaya 8 ay boyunca devam edildi. Her bir işletmeden 16 kez örnekler alındı.

Mikrobiyolojik inceleme için hijyen kurallarına uygun olarak erkek gökkuşığı anaçlarından (Şekil 3.3) 2 ml sperm (Şekil 3.4); dişi gökkuşığı anaçlarından (Şekil 3.5) 2 ml ovaryum sıvısı (Şekil 3.6) ve 60 adet yumurta (Şekil 3.7); kuluçka dolabına yerleştirilen döllenmiş yumurtadan 30 adet (Şekil 3.8) ve gözlenmiş yumurtadan da (Şekil 3.9) 30 adet örnekler alındı.



Şekil 3.3. Erkek gökkuşığı alabalığı anaçlarından sperm sağımı.



Şekil 3.4. Gökkuşığı alabalığından sağım yoluyla alınan sperm.



Şekil 3.5. Dişi gökkuşığı alabalığı anaçlarından yumurta sağımı.



Şekil 3.6. Dişi Gökkuşığı anaçlarından alınan ovaryum sıvısı.



Şekil 3.7. Dişi gökkuşığı alabalığı yumurtaları.

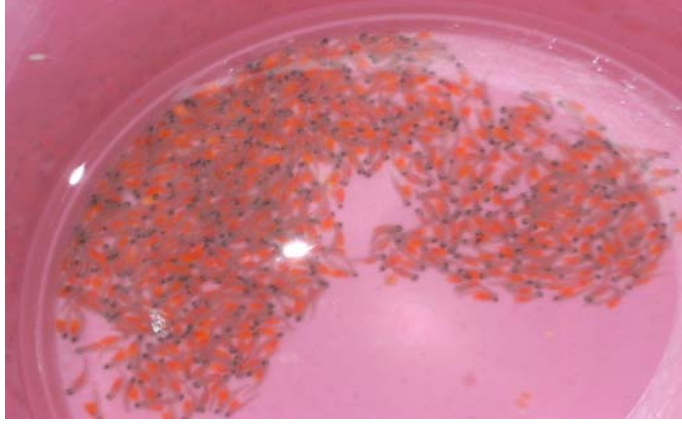


Şekil 3.8. Döllenmiş gökkuşığı alabalığı yumurtaları.



Şekil 3.9. Gözlenmiş gökkuşığı alabalığı yumurtaları.

Keseli alabalık yavrusu (Şekil 3.10) ve 5 gramdan küçük yavrular (Şekil 3.11) içerisinde hava bulunan balık taşıma poşetleriyle canlı olarak Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarına getirildi. Her örnek için 30 adet olacak şekilde steril edilmiş örnek poşetlere (Şekil 3.12-3.13) alınarak Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına taşındı.



Şekil 3.10. Gökkuşaklı alabalığının keseli yavruları.



Şekil 3.11. Besin kesesini absorbe etmiş gökkuşaklı alabalığı yavruları.



Şekil 3.12. Homojenizasyon için keseli alabalık yavrularının poşete yerleştirilmesi.



Şekil 3.13. Homojenizasyon için alabalık yavrularının poşete yerleştirilmesi.

Beş gramdan büyük yavru balıklar ise; her işletmeden 30'ar adet alındı. Bunlar içerisinde hava bulunan balık taşıma poşetleriyle (Şekil 3.14) canlı olarak laboratuvara taşındı.



Şekil 3.14. Beş gramdan büyük yavru balıkların poşetle taşınması.

Suyun bakteriyolojik incelenmesi için işletmelerde; kuluçka dolabı, anaç balık havuzu ve yavru balık havuzu ile kafeslere giren ve çıkan sudan steril plastik şişelere örnekler alındı ve termosla (soğutucu) F.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarına getirildi. Aynı gün içinde su örneklerinde organik madde miktarları ölçüldü. Her bir işletmeden 68 adet olmak üzere alınan 272 adet su örneği incelendi.

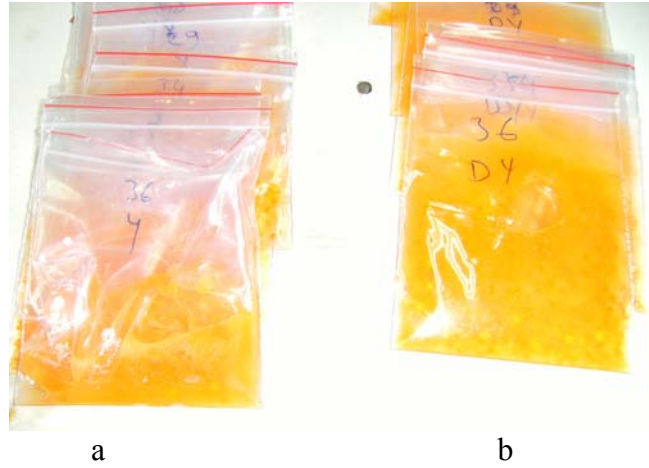
Her işletmenin kullandığı yemlerden örnekler alınarak steril kaplara bırakıldı. Bu yemler bir termosla (soğutucu) F.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarına getirildi. Her bir işletmeden 16 adet olmak üzere alınan 120 adet yem örneği incelendi.

3.2. Metot

3.2.1. *Flavobacterium psychrophilum*'un İzolasyonu

3.2.1.1. Gökkuşığı Alabalığının Yumurta, Dölenmiş Yumurta, Gözlenmiş Yumurta, Besin Keseli Yavru ve Yavru Örneklerinin Hazırlanması

Alabalık işletmelerinin her birinden alınan 60'ar adet balık yumurtasından 30'ar adeti direkt bakteriyolojik incelemeye alınırken, diğer 30'ar adeti ise 15 dakika süreyle 400 ppm povidin/iodin solüsyonunda yıkandı ve bu örnekler 3 kez steril distile sudan geçirildi (Rogers ve Chapman, 1990; Brown, vd., 1997). Yine her bir alabalık işletmesinden alınan 30'ar adet dölenmiş yumurta, 30'ar adet gözlenmiş yumurta, 30'ar adet besin keseli yavru ve 30'ar adet de 5 gramdan küçük yavru alabalık örnekleri özel poşetlere yerleştirilerek homojenizatörde homojen hale getirildi (Şekil 3.15;3.16;3.17;3.18).



Şekil 3.15. Homojenize alabalık yumurtası (a) ve döllenmiş yumurtası (b).



Şekil 3.16. Homojenize gözlenmiş alabalık yumurtası.



Şekil 3.17. Homojenize besin keseli alabalık yavrusu.



Şekil 3.18. Homojenize 5 gramdan küçük alabalık yavrusu.

3.2.1.2. Ticari Alabalık Yem Örneklerinin Hazırlanması

Her bir alabalık işletmesinden alınan 50'şer g anaç ve yavru alabalık yemleri laboratuvarında bakteriyolojik incelemeye tabi tutuldu. Yem örneklerinden 10'ar g tartılarak üzerine 90 ml % 0,1'lik steril peptonlu su ilave edildi ve homojenizatörde 2-3 dakika homojenize edildi. Bu homojenattan steril peptonlu su ile 10^{-6} ya kadar dilüsyonlar hazırlandı (Anonim, 1980).

3.2.1.3. Alabalık İşletmelerindeki Su Örneklerinin Hazırlanması

Her bir alabalık işletmesindeki kuluçka dolabı, ön yavru büyütme havuzları, yavru ve anaç havuzları ile kafeslerden alınan sular laboratuvarında bakteriyolojik incelemeye tabi tutuldu. Bu su örneklerinden 10'ar ml alınarak üzerine 90 ml % 0,1'lik steril peptonlu su eklenerek homojenizatörde 2–3 dakika homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenattan steril peptonlu su ile 10^{-6} ya kadar dilüsyonlar hazırlandı (Nedoluha ve Westhoff 1993; Anonim,1997).

3.2.4. Katı ve Sıvı Besiyerlerine Ekimler

Alabalık işletmelerinden *F. psychrophilum*'un izolasyonu için; alabalıkta direkt alınan yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla yıkanan yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru ve 5 gramdan küçük yavru örneklerinden elde edilen homojenatlar ile sperm ve ovaryum sıvıları 1/10'luk fizyolojik tuzlu suyla muamele edilerek dilüsyonlar hazırlandı. Bu dilüsyonlardan 0,5 ml alınıp CA, TYES-A, MAOA, EAO+FBS+A, TYES + Tobramycin agar üzerine aktarılıp steril bir öze yardımıyla yayıldı. Aynı dilüsyonlardan 0,5 ml alınarak CB, TYES-B, MAOB, EAO+FBS+B, TYES + TOBRAMYCİN+ sıvı besiyerine ilave edildi. Beş gramdan büyük yavruların da aseptik koşullar altında abdominal ensizyon yapılarak karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsaklarından aynı besiyerlerine ekimler yapıldı. Yem ve su örneklerinden de yine aynı katı ve sıvı besiyerlerine ekimler yapıldı. Bütün ekim yapılan besiyerleri 15 °C'de 5-7 gün süreyle soğutmalı etüvde inkübasyona bırakıldı (Pacha, 1968; Daskalov vd., 1999; Austin ve Austin, 1999; Madetoja ve Wiklund, 2002; Starliper vd., 2007; Kumagai vd., 2004; Toshio vd., 2006; Holt vd., 1993; Vastos vd., 2003).

3.2.3. *Flavobacterium psychrophilum*'un İdentifikasyonu

CA, TYES-A, MAOA, EAO+FBS+A, TYES + TOBRAMYCİN+A besiyerlerinde üreyen sarı renkteki kolonilerden subkültür elde etmek için TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerlerine ekimler yapıldı. Bu kolonilerden Gram boyama yapılarak etkenin boyama özelliği ve kültürün saflığı kontrol edildi. Gram negatif ve çomak şekilli bakterilerden öncelikle katalaz ve fleksirubin pigment testleri yapıldı. Bu testlerden katalaz yarı pozitif ve fleksirubin pigment oranj (portakal renginde) renk gösteren bakterilere; sitokrom

oksidaz, metil red (MR), voges proskauer (VP), oksidasyon-fermentasyon (O/F), nitrat, kongo kırmızısı, sitrat, indol, ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase (ONPG), dekarboksilase (OD), üreaz, hidrojen sülfür (H₂S) testleri ile karbonhidratların fermentasyonu, jelatin, hemoliz, nişasta, eskülün, kazein, tween 20 ve tween 80 hidrolizi gibi biyokimyasal testleri uygulandı ve hareket muayenesi yapıldı (Bilgehan 1995, Lorenzen 1994, Lorenzen vd., 1997).

3.2.3.1. Gram Boyama

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyeri üzerinde üreyen sarı renkteki her bir koloniden preparatlar hazırlanarak gram boyama yapıldı ve mikroskop altında bakterilerin gram boyanma özelliklerine bakıldı (Covan, 1974; Bilgehan, 1992).

3.2.3.2. Katalaz Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerlerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerinden steril bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınarak, temiz bir lamın üzerine konuldu. Üzerine 1–2 damla % 30'luk hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılıp bir svap çubuğu ile karıştırıldı. Lam üzerinde oksijen açığa çıkışına bağlı olarak gaz oluşturan bakterilerin katalaz testi pozitif olarak değerlendirildi. Katalaz negatif bakterilerde ise herhangi bir gaz oluşumu gözlenmedi (Bilgehan, 1995; Arda, 2000).

3.2.3.3. Fleksirubin Pigment Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonileri, steril bir öze yardımıyla % 20'lik potasyum hidroksit (KOH) çözeltisiyle emdirilmiş kurutma kağıtlarına temas ettirilerek renk oluşumuna bakıldı. Turuncu-kahverengi renk oluşumu, fleksirubin pigment üretiminin pozitif olduğunu gösterdi (Lorenzen, 1994, Lorenzen vd., 1997).

3.2.3.4. Oksidaz (Sitokrom Oksidaz) Testi

Şeritler halinde kesilmiş steril kurutma kağıdı üzerine oksidaz ayırıcı damlatılarak emdirildi. Steril bir öze yardımıyla TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerlerinden alınan şüpheli *F. psychrophilum* kolonileri bu şerit üzerine sürüldü. Bir dakika içinde mor renk görülmesi halinde oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (Covan, 1974; Bilgehan, 1995).

3.2.3.5. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glikan) Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerden steril bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınarak, içerisinde % 0,003'lük kongo kırmızısı bulunan TYES-A besiyerine ekim yapıldı. Üreyen kolonilerin kırmızı renk alması, pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Lorenzen, 1994, Lorenzen vd., 1997).

3.2.3.6. İndol Testi ve Hareket Muayenesi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde bulunan şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerden steril iğne uçlu bir öze yardımıyla bolca alınıp Sülfür-İndole-Motility (SIM) besiyerine ekim yapılarak, 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Bu kültür üzerine 0.5 ml'lik kovacs ayırıcı ilave edildi. İki dakika içerisinde besiyeri üzerinde oluşan kırmızı halka pozitif, sarımsı halka ise negatif indol reaksiyonu olarak değerlendirildi. Ayrıca besiyerinde batırma hattı boyunca sınırlı bir üreme oluşursa hareket negatif, besiyerinde homojen bir bulanıklık meydana gelirse hareket pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3.7. Metil Red (MR) - Voges Proskauer (VP) Testleri

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerinden steril bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınarak tüplerdeki Clark – Lups broth'a ekim yapıldı ve 15 °C'de 5–7 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. Üretilen kültürün, yarısı alınarak üzerine 4–5 damla metil red solüsyonundan damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif metil kırmızısı testi kabul edildi. Kültürün kalan yarısına ise 3 ml % 5'lik alfanaftol solüsyonundan ilave edilerek karıştırıldı. Bunun üzerine % 40'lık KOH çözeltisinden 1 ml ilave edilerek 2–5 dakika içerisinde pembe renk oluşumu Voges Proskauer (VP) testi pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995; Arda, 2000).

3.2.3.8. Nitrat Redüksiyon Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp nitrat broth'a ekilerek 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Daha sonra bu kültüre sırasıyla nitrat ayıraçlarından Nitrat A ve Nitrat B damlatıldı. Besiyeri renginin kırmızı renk alması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.2.3.9. Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) Testleri

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerinden steril iğne uçlu bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınarak, 2 tüpte bulunan Hugh ve Leifson besiyerine dik bir şekilde ekim yapıldı. Tüplerden birisine 1cm kalınlıkta olacak biçiminde sıvı steril parafin ilave edildi. Diğer tüpe ise herhangi bir işlem uygulanmadı. Tüplerin ağzı iyice kapatılarak 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Parafinsiz tüpte sarı renk oluşması ve parafinli tüpte renk değişimi olmaması oksidasyon pozitif, her iki tüpte de sarı renk oluşması fermentasyon pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995; Arda, 2000).

3.2.3.10. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase (ONPG) Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde bulunan şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınarak, ONPG broth'a ekildikten sonra 15°C'de 5–7 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. Bu kültürler santrifüje edilerek üst kısım atıldı. Bakteri tortusuna 0.25 ml fizyolojik su ilave edilerek homojen bir süspansiyon hazırlandı. Buna bir damla toluene konularak iyice çalkalandı. Tüp 15°C de 5–10 dakika benmariye bırakıldı. Sonra, buna 0.25 ml ONPG solusyonu katıldı ve tekrar benmaride 20 dakika süreyle bekletildi. Tüplerde sarı rengin meydana gelmesi ONPG pozitif ve renksiz olması da negatif olarak değerlendirildi (Arda, 2000).

3.2.3.11. Dekarboksilase Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kolonilerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınarak, Miller besiyerine ekilerek 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Kültürler her gün muayene edildi. Besiyeri, mor bir renk alması pozitif, sarı renk oluşması ise negatif olarak değerlendirildi (Arda, 2000).

3.2.3.12. Jelatin Hidrolizasyon Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, % 4 jelatin içeren TYES besiyerine ekim yapılarak 15 °C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Bu besiyerinde üreyen kolonilerin üzerine amonyum sülfat çözeltisi döküldü. Jelatini hidrolize eden kolonilerin

etrafında açık-şeffaf bir zon oluşumu, pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995; İnce 2005).

3.2.3.13. Simmons Sitrat Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril iğne uçlu bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınarak, Simmons sitrat besiyeri bulunan tüplere dik olarak ekildi. Bu tüpler 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyerinde orijinal yeşil renginin muhafaza edilmesi negatif, ekim hattı boyunca üreme ile birlikte koyu mavi rengin meydana gelmesi ise pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.2.3.14. Üreaz Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril iğne uclu bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınıp, Üre besiyeri bulunan tüplere ekilerek 15 °C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyeri renginin kırmızı renk alması pozitif, renk değişimi olmaması yani sarı renkte olması ise negatif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.2.3.15. Hidrojen Sülfür (H₂S) Oluşumu

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril iğne uçlu bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınıp, TSIA besiyeri bulunan tüplere ekilerek 15 °C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Bu besiyerinin yüzeyinden başlayıp dibe doğru ilerleyen siyah renk oluşumu H₂S pozitif, siyah rengin oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3.16. Glukoz ve Laktoz Testleri

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril iğne uçlu bir öze yardımıyla yeterli miktarda alınıp, TSIA besiyeri bulunan tüplere ekilerek 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Bu besiyerinin dip kısmının renginin sarıya dönüşmesi glikoz pozitif, rengin kırmızı olması ise negatif; besiyerinin yatık kısmının renginin sarıya dönüşmesi laktoz pozitif, kırmızı rengin varlığı ise negatif olarak değerlendirildi.

3.2.3.17. Hemoliz Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde % 5 koyun kanı bulunan TYES agara ekim yapılarak 15 °C’de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyerinde üreyen kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon beta hemoliz, yeşil zon ise alfa hemoliz olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1992).

3.2.3.18. Nişasta Hidrolizasyon Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, nişastalı agara ekim yapılarak 15°C’de 5–7 gün süreyle inkube edildi. Besiyeri üzerinde üreyen kolonilere 1/5’lik lugol solusyonundan bir damla damlatıldı ve 5 dakika sonra bu solüsyon döküldü. Koloni etrafında şeffaf zon oluşumu pozitif, koloni etrafında zon oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (URL–2).

3.2.3.19. Eskülin Hidrolizasyon Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, eskülin broth’a ekim yapılarak 15°C’de 5–7 gün süreyle inkube edildi. Besiyerinin rengi siyah veya kahverengine dönüşmüş ise eskülin pozitif, renkte değişme olmamış ise eskülin negatif olarak değerlendirildi (Covan, 1974).

3.2.3.20. Kazein Hidrolizasyon Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde % 10 süt tozu bulunan TYES-A besiyerine ekilerek 15°C’de 5–7 gün süreyle inkube edildi. Üreyen kolonilerin etrafında açık renk oluşursa kazeinin hidrolizi pozitif, kolonilerin etrafında hafif opaklaşma görülürse kazein hidrolizi testi negatif olarak değerlendirildi (Pacha, 1968; Arda, 2000).

3.2.3.21. Tween 20 ve Tween 80 Hidrolizasyon Testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde % 1 tween 20 ve % 1 tween 80 bulunan TYES-A besiyerlerine ekim yapılarak 15°C’de 5–7 gün süreyle inkube edildi. Besiyerinde üreyen kolonilerin etrafında şeffaf veya opak bir zon görülmesi Tween 20 ve Tween 80 hidrolizi testinin pozitif olduğunu gösterdi.

3.2.3.22. Karbonhidrat Fermantasyon Testleri

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde farklı karbonhidratlar (arabinoz, mannitol, rafinoz, ramnoz, salisin, sorbitol, sakkaroz, trehaloz, ksiloz) ve asitlik indikatörü bulunan besiyerlerine ekim yapılarak 15°C’de 5–7 gün süreyle inkube edildi. Pembe rengin kırmızıya dönüştüğü tüpler pozitif olarak değerlendirildi (Austin ve Austin 1987; Bilgehan, 1992) .

3.2.3.23. Çeşitli Sıcaklıklarda (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37°C) Üreme

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, TYES-A ve TYES-B besiyerlerine ekimler yapıldı ve 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37°C’lerde 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyerlerinde üremenin varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3.24. Çeşitli Tuzluluk Oranlarında (% 0.0, 0.5, 1.0, 2.0) Üreme

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde % 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 NaCl bulunan TYES-A ve TYES-B besiyerlerine ekim yapılarak 15°C’de 5-7 gün süreyle inkube edildi. Besiyerlerinde üremenin varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3.25. Tryptic Soy Agar, Tryptic Soy Broth, Plate Count, Mueller-Hinton

Kanlı ve Macconkey Agarlarda Üreme

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *F. psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, Tryptic Soy Broth, Tryptic

Soy, Plate Count, Mueller-Hinton, Kanlı ve Macconkey agarlara ekimler yapılarak 15°C’de 5–7 gün süreyle etüvde inkübe edildi. Besiyerlerinde üremenin oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)’unda *Flavobacterium psychrophilum*’un Teyit Edilmesi İçin DNA İzolasyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyon tekniğini optimize etmek amacıyla referans *F. psychrophilum* suşuyla denemeler yapıldı. Bunun için referans suştan Tryptone Yeast Extract Salt Agara (TYES-A) yapılan ekimlerden sonra üreyen kolonilerden öze ile örnek alınarak steril eppendorf tüp içerisindeki 300 µl distile suda iyice süspanse edildi. Aynı tüpe 300 µl K tamponu (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, % 0,2 Sodyum Dodesil Sülfat-SDS) ve 5 µl proteinaz K ilave edildi. Bu tüpler 37°C’de 2 saat süreyle çalkalamalı benmaride tutulduktan sonra 15 dakika süreyle kaynamaya bırakıldı. Kaynatma işleminden sonra süspansiyona 600 µl Tris-HCl ile satüre edilmiş fenol ilave edildi. Bu süspansiyon 5 dakika süreyle elle iyice çalkalanıp ve 10 dakika süreyle yüksek devirde (13.000 g) santrifüje tabi tutuldu. Bu işlemten sonra eppendorfların üst kısmında gözle görülebilecek bir çizgiyle ayrılmış olan üst faz, alt faza dokunmadan bir mikropipet vasıtasıyla başka bir eppendorfa aktarıldı ve sonra sodyum asetat ve etanol ile DNA’nın presipitasyonu (dibe çöktürme) işlemine geçildi. DNA süspansiyonuna 0.1 volüm 3 M sodyum asetat ve 2.5 volüm saf alkol ilave edildi. Süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra -20°C’de bir saat bekletildi. Daha sonra süspansiyon 13.000 g’de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatant (üst faz) uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan kısım, önce 300 µl % 90’lık alkol eklenerek 13.000 g’de 10 dakika süreyle santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Sonradan da elde edilen pelet 300 µl % 70’lik alkol ilave edilerek 13.000 g’de 5 dakika süreyle santrifüj yapıp, alkol dökülerek tüpe yapışık pelet bir saat süreyle kurumaya bırakıldı. Sonra bu kısım kurutulduktan sonra 50–100 µl’lik distile su ile süspanse edildi ve bu süspansiyondan 5 µl alınarak PZR’de hedef DNA olarak kullanıldı.

3.2.5. DNA’nın Çoğaltılması İçin PZR Karışımının Hazırlanması ve Uygulanması

Toplam 50 µl’lik hacimde hazırlanan PZR karışımında; 5 µl 10x PZR buffer (750 mM Tris-HCl, pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Tween - 20) , 5 µl 25 mM MgCl₂,

deoksini kleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas) ve *Flavobacterium* cinsi ve *F. psychrophilum* türüne ait spesifik iki tane primer çifti kullanıldı. *Flavobacterium* cinsi için; GYRA-FP1F (5'-GAAACCGGTGCACAGAAGG-3') ve GYRA-FP1R (5'-CCTGTGGCTCCGTTTATTAA-3') primer çiftinin (Suzuki vd., 2008) her birinden 50 pmol ve 5 µl template (kalıp) DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları Techne TC-512 gradient thermalcycler (Techne, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94  C'de 5 dakika  n denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94  C'de 30 saniye denaturasyon, 56  C'de 30 saniye hibridizasyon, 72  C'de 90 saniye DNA sentezi ve 72  C'de 5 dakika son uzatma işlemi yapıldı. *F. psychrophilum* türü için; PSY1 190-206 (5'-GTT GGC ATC AAC ACA CT-3') ve PSY2 1278-1262 (5'-CGA TCC TAC TTG CGT AG-3') primer çiftinin (Suzuki vd., 2008) her birinden 50 pmol ve 5 µl template DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları Techne TC-512 gradient thermalcycler (Techne, İngiltere) cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94  C'de 5 dakika  n denaturasyon aşamasını takiben, toplam 35 PZR siklusu 94  C'de 30 saniye denaturasyon, 51  C'de 90 saniye hibridizasyon, 72  C'de 2 dakika DNA sentezi ve 72  C'de 5 dakika son uzatma işlemi yapıldı.

PZR'de amplifiye edilen DNA ürünlerinden, 7 µl alınıp, 3 µl blue orange yükleme solüsyonu ile karıştırılarak daha önce hazırlanan % 1,5'luk agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirildi. Son kuyucuğa da DNA markeri bırakıldı. Jel, Tris-borik asit-EDTA (TBE) buffer'ı kullanılarak % 1,5 'luk agaroz jelde 80 V 'da 1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı. Karanlık odada ultraviyole transill minat rde *F. psychrophilum*'a özgü DNA bant uzunluklarına (bp-base pair) bakılarak polaroid kamera sistemi ile fotoğrafı çekildi. Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla; gerek DNA ekstraksiyonu aşamasında gerekse PZR'de pozitif *F. psychrophilum* ve negatif kontrol olarak da *Escherichia coli* bakterileri kullanıldı.

3.2.6. *Flavobacterium psychrophilum*'un Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile Moleküler Alt Tiplendirilmesi

3.2.6.1. İzolatların Hazırlanması

Biyokimyasal veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmış olan *F. psychrophilum*'dan TYES-A ve EAO+FBS agar besiyerlerine ekimler yapıldı. Bu besiyerleri 15°C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Kültür numarası yazılmış falcon tüplerine 3 ml'lik Hücre Süspansiyon Buffer-HSB (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) solüsyonu eklendi. Besiyerlerinde oluşan kolonilerden tek düşen bir tanesi seçilip, steril pamuklu swab yardımıyla yeterince örnek alınarak, bufferlı tüpler içerisine süspansiyon edildi (Maslow ve diğ., 1993; Arai, vd., 2007; Chen vd., 2008; Del Cerro vd., 2010). Bu süspansiyondan 2 ml spektro küvetine alınıp, 610 nm'lik dalga boyuna uyarlanmış spektrofotometrede 1,2 yoğunlukta olacak şekilde ayarlandı.

3.2.6.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi

Spektrofotometrede yoğunluğu ayarlanan *F. psychrophilum*'lu süspansiyondan agaroz kalıp hazırlamak için 1,5 ml'lik eppendorf tüplere kültür ve referans numarası yazıldı. Bu tüplerin herbirine Hücre Süspansiyon Buffer solüsyonundan 400'er µl dağıtıldı. Üzerine 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) eklenip, yavaşça birkaç kez pipetaj yapılarak karıştırıldı. TE buffer solüsyonuyla hazırlanan ve 56°C'deki çalkalamalı benmaride bekletilen % 1,2'lik seakom gold (düşük erime ısı) agaroz karışımından 400 µl alınıp, içerisine Hücre Süspansiyon Buffer'ı bulunan tüplere eklendi ve yavaşça birkaç kez pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu agarozlu bakteri karışımı 56°C'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride bekletildi. Agaroz dökülecek kalıplar (10 mm x 5 mm x 1,5 mm) üzerine kültür numarası yazılıp, kuyucuklara bu karışımdan dağıtıldı. Kuyucuklarda hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Her bakteri örneği için 2 adet agaroz kalıp döküldü. Bu kalıpların katılaşması için oda sıcaklığında 10–15 dakika bekletildi (CDC, 2010).

3.2.6.3. PFGE için *Flavobacterium psychrophilum*'un DNA İzolasyonu

Hazırlanan agaroz kalıplardan DNA izolasyonu yapmak için 50 ml'lik Polypropylene vida kapaklı tüpler veya 50 ml Oak Ridge tüplerine kültür ve referans numarası yazıldı. Örnek sayısına göre her tüp için 5 ml Hücre Lysis Buffer-HLB (50 mM

Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl) ve 25 µl Proteinase K (20 mg/ml) eklenerek karışım hazırlandı. Bu karışımdan her tüpe 5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Kuyucukta katılaştıran agarozlu kalıplar steril öze yardımıyla içerisinde Hücre Lysis Buffer ve Proteinase K bulunan Polypropylene veya Oak Ridge bu tüplerine bırakıldı. Bu tüpler metal sporlara yerleştirilerek 50°C'ye ayarlı çalkalamalı benmaride 2 saat süreyle bekletildi. Daha sonra bu tüplerde bulunan agaroz kalıpların steril ultra saf su ve steril Tris EDTA (TE) Buffer (10 mM Tris: 1 mM EDTA, pH 8.0) ile yıkanması için, benmariden çıkarılan tüplerin kapakları açılıp, ızgaralı kapak kapatılarak dikkatli bir şekilde içindeki sıvı döküldü. Sonra 50°C'ye ayarlı benmaride bulunan steril ultra saf sudan 15 ml eklenip, 50°C'ye ayarlı çalkalamalı benmaride 15 dakika süreyle bekletildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Steril ultra saf suyla yıkama işleminden sonra tüplerin içindeki su dökülüp, 50°C'ye ayarlı benmaride bulunan TE buffer'dan her tüpe 15 ml olacak şekilde ilave edilerek 50°C'ye ayarlı çalkalamalı benmaride 15 dakika süreyle bekletildi. Bu TE buffer ile yıkama da aynı şekilde 3 kez tekrarlandı. Bu işlemlerden sonra agaroz kalıp içindeki DNA saflaştırılıp, restriksiyon enzimi (RE) ile kesilme işlemi için hazır hale getirilmiş oldu. Agaroz kalıplar enzim ile hemen kesilmeyecekse 4°C de TE buffer içinde uzun süre saklanabilmektedir (CDC, 2010).

3.2.6.4. DNA'nın Restriksiyon enzimi (RE) ile Kesim İşlemi İçin Hazırlanması

Polypropylene tüpler içinde bulunan agaroz kalıplardaki saflaştırılmış *F. psychrophilum*'un DNA'sı steril bir öze yardımıyla steril petri kabına alındı. Bu petri kabı buz kalıbı üzerine yerleştirildi. Sonra petri içindeki agaroz kalıp üzerinde kalan Hücre Süspansiyon Buffer sıvısı kağıt havlu ile kurulandı. Steril bir büstiri yardımıyla bu agaroz kalıptan 2 mm'lik bir parça kesildi (Arai vd., 2007; CDC, 2010).

3.2.6.4.1. DNA'nın *XhoI* Restriksiyon Enzimi (RE) ile Kesilmesi

F. psychrophilum DNA'sının *XhoI* Restriksiyon enzimi (RE) ile kesilme işlemi için yine 1,5 ml'lik eppendorf tüpler hazırlandı. Her bir eppendorf tüpe 10 µl Red buffer ve 90 µl ultra saf su eklenerek kesilmiş 2 mm'lik agaroz kalıp parçası bu sıvının içerisine bırakıldı. Metal spora yerleştirilen bu eppendorflar 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride 15 dakika süreyle bekletildi. Sonra her tüp içindeki 100 µl'lik sıvı otomatik pipet yardımıyla alındı. Yerine 10 µl Red buffer, 5 µl *XhoI* enzimi ve 85 µl ultra saf su

eklendi. Bu tüpler de metal spora yerleştirilerek 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride 20 saat süreyle bekletilerek enzim kesim işlemi tamamlanmış oldu (CDC, 2010).

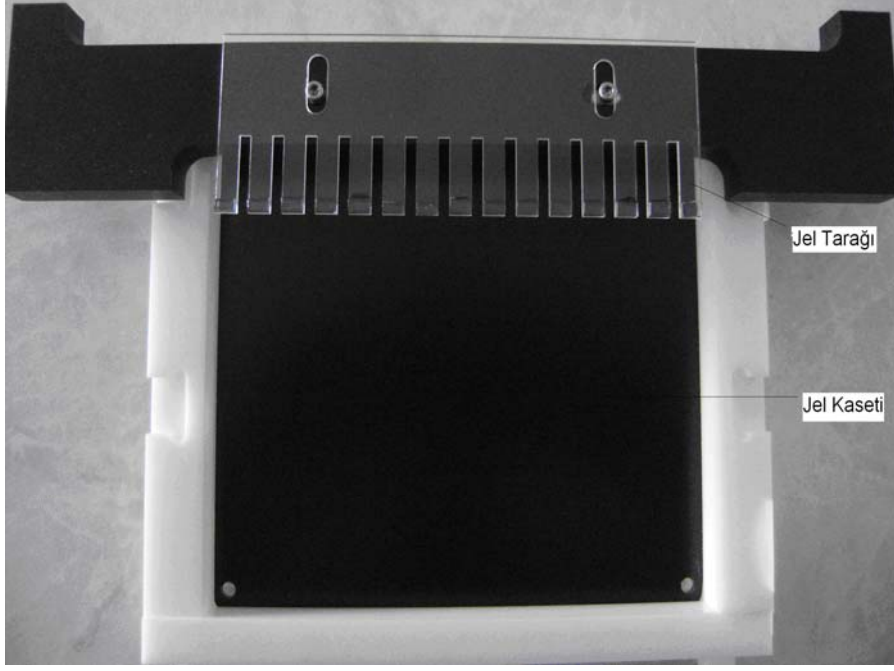
3.2.6.4.2. DNA'nın *BlnI* Restriksiyon enzimi (RE) ile kesilmesi

DNA'nın diğer bir enzim ile kesilme işlemi için de tekrar 1,5 ml'lik eppendorf tüpler hazırlandı. Her bir ependorf tüpe 10 µl V4 buffer ve 90 µl ultra saf su eklenerek 2 mm'lik agaroz kalıp bu sıvının içerisine bırakıldı. Metal spora yerleştirilen bu ependorflar 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride 15 dakika süreyle bekletildi. Bu sürenin sonunda her tüpteki 100 µl'lik sıvı otomatik pipet yardımıyla alındı. Yerine 10 µl V4 buffer, 1,6 µl *BlnI* enzimi ve 88,3 µl ultra saf su eklendi. Bu tüpler metal spora yerleştirilerek 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride 20 saat süreyle bekletilerek enzim kesim işlemi tamamlanmış oldu (CDC, 2010).

3.2.6.5. Enzimle Kesilmiş DNA'lı Agaroz Kalıpların Jel Kasetine Yerleştirilerek Üzerine Agaroz Jelin Dökülmesi ve Jel Bantlarının Analizi

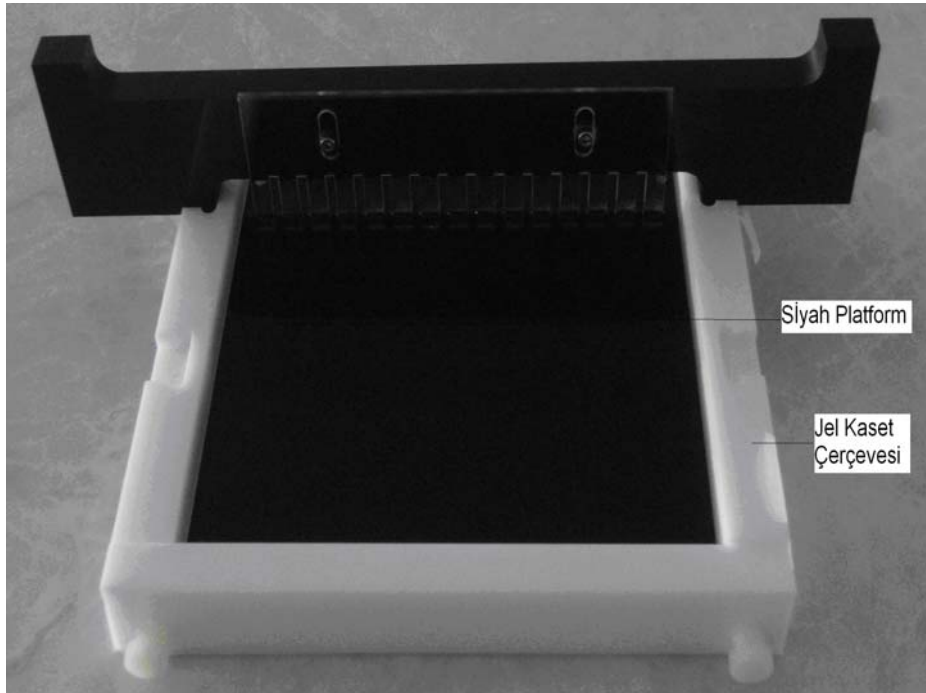
Hem PFGE jelin hazırlanmasında hem de PFGE tankını doldurmak için 0.5X TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) hazırlandı. SKG (% 1'lik) agaroz hazırlamak için; 1 g agaroz 100 ml'lik TBE (0.5 X TBE) solusyonuna katıldı ve agaroz eriyene kadar mikrodalga fırına bırakıldı. Erimiş agaroz, jel kasete dökülene kadar 55°C'ye ayarlanmış çalkalamalı benmaride bekletildi (CDC, 2010).

Benmaride, eppendorf tüplerde bekletilen enzimle kesilmiş agaroz kalıplar steril bir öze yardımıyla steril petri kabına alındı. Bu petri kabı buz kalıbı üzerine yerleştirildi. Sonra petri içindeki agaroz kalıp üzerinde kalan Hücre Süspansiyon Buffer sıvısı kağıt havlu ile kurulandı ve jel tarağının uç kısmına (Şekil 3.19) yerleştirildi (CDC, 2010).



Şekil 3.19. Jel tarağının uç kısmına agaroz kalıp yerleştirilmesi.

Bu jel tarağı jelin dökülecek kaset içerisine dik bir şekilde bırakıldı. Agaroz kalıpların jel tarağından düşmemesine dikkat edildi. Aksi takdirde düşen agaroz kalıp DNA'nın jelde ilerlemesine olduğu görüldü. Benmariden alınan % 1'lik SKG agaroz hava kabarcığı oluşturmadan dikkatli bir şekilde kaset (Şekil 3.20) içine döküldü (CDC, 2010).



Şekil 3.20. Agaroz kasetine Jel tarağının yerleştirilmesi ve agarozun dökülmesi.

Oda sıcaklığında 30–45 dakika sonra jel katılaşınca jel tarağı dikkatlice çıkarıldı. Bu jel tarağının kuyucuğu % 1'lik SKG agarozla dolduruldu. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve siyah platformla beraber PFGE jel tankının (Şekil 3.21) içindeki çerçeveye yerleştirildi. PFGE kapağı kapatıldı. PFGE cihazının soğutucusu açılarak 12°C'ye ayarlandı ve pompası ise bir dakikada 1 litre akacak şekilde düzenlendi. PFGE cihazında jel agaroz 6 Volt akım, 1–12 vuruş aralığında 18,5 saat süreyle yürütüldü (Chen vd., 2008; CDC, 2010).



Şekil 3.21. PFGE jel tankının içindeki DNA'nın yürütülmesi.

Sonra bu jel, 40 µl ethidium bromid (10mg/ml) boyasını içeren 400 ml ultra saf su içine alındı. Bu boya içerisinde jel 30 dakika süreyle bekletildi. Jel görüntüleme sisteminde (infinity 3000 WL, Vilber Lourmat, Fransa) UV ışıktaki DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi ve TIFF formatında kayıt edildi. BioD 1++ (infinity capt software, Vilber Lourmat, Fransa) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi (Maslow vd., 1993; Arai, vd., 2007; Chen vd., 2008; Del Cerro vd., 2010).

3.2.7. Antibakteriyel Testleri

Antibakteriyel duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemine göre yapıldı (Bauer vd., 1966; Plumb, ve Browser, 1983; Koneman vd., 1997; Arda, 2000; Furones 2001). İdentifiye edilen *F. psychrophilum* 4 ml TYES broth bulunan tüplere ekilerek 15°C’de 5–7 gün süreyle etüvde inkübe edildi. Tüplerdeki bakteri yoğunluğu 0,5 McFarland standart yoğunluğuna eşit oluncaya kadar inkübasyona devam edildi. Mueller-Hinton agar besiyerine, TYES broth besiyerlerinde üreyen kültürden 0,1 ml steril pipet ile aktararak steril cam bagedle yayıldı. Steril bir pens yardımıyla Standart antibakteriyel diskleri eşit aralıklarla petrideki besiyeri üzerine yerleştirildi. Petriler 15°C’de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her diskin çevresinde bulunan inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçüldü ve standart zon çapları ile karşılaştırıldı (Anonim, 2000; Anonim, 2001).

3.2.8. Su Sıcaklığı, Çözünmüş Oksijen, pH ve Organik Madde Miktarının Ölçülmesi

Su sıcaklığı ve çözünmüş oksijen YSI 5775 portatif cihazı (Şekil 3.22) ile, pH ise Checker 1 HANNA portatif pH metre (Şekil 3.23) ile ölçüldü.

Organik madde miktarları ise titrimetrik metota göre belirlendi (Skoog ve West, 1971). Balık işletmelerindeki organik madde miktarını ölçmek için 50 ml su örneği 100 ml’lik erlene alındı. Üzerine 5ml seyreltik H₂SO₄ (1 hacim H₂SO₄, 3 hacim saf su) ilave edildi. Daha sonra 5 ml KMnO₄ (1/80 N’lik) çözeltisi eklendi. Çalkalamalı su banyosunda bu erlenler 70°C’de 30 dakika süreyle bekletildi ve sonra 5ml’lik Amonyum oksalat (1/80 N’lik) ilave edildi. Su örneklerinin rengi seffaf hale dönüştü. Renk hafif pembe oluncaya kadar KMnO₄ çözeltisiyle titre edildi. Harcanan KMnO₄ miktarının 2 katı organik madde miktarı olarak değerlendirildi (Şengül ve Türkman, 1991).

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizlerde MINITAB–130 kullanıldı. İşletmeler arasında bakteri sayısı bakımından fark olup olmadığı one-way ANOVA programı ile test edildi.

Bakteri sayısı ile su kalite parametreleri arasında bir ilişki olup olmadığı ise Pearson korelasyon analizi ile test edildi.

4. BULGULAR

Alabalık yavru üretimi yapan 4 ayrı işletmeden alınan yumurta, döllenmiş yumurta, ovaryum sıvısı, sperm, gözlenmiş yumurta, keseli yavru, 5 gramdan küçük yavru, 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek ve bağırsak örnekleri, su ve yem örnekleri *F. psychrophilum* yönüyle ayrı ayrı analiz edildi. Ayrıca her bir işletmedeki sağlıklı alabalıklar *F. psychrophilum*'un oluşturabileceği klinik tablo bakımından da gözden geçirildi.

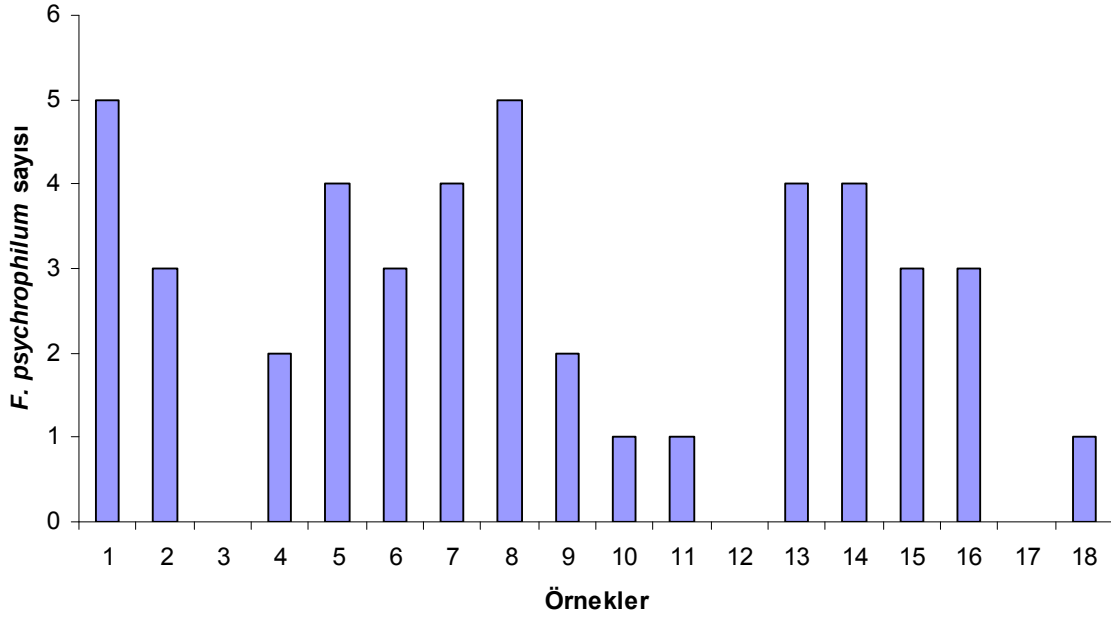
4.1. I Nolu Gökkuşluğu Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi

Bu işletmeden alınan; 40 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş 40 adet yumurta, 50 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 40 örnek, 2 ml'lik spermelerden 50 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 100 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek ve bağırsak örnekleri, 64 adet su ve 30 adet de yem örnekleri olmak üzere toplam 974 adet örnek (Tablo 4.1) laboratuvarında *F. psychrophilum* yönüyle incelendi.

Bu örneklerden 45 adet (% 4,62) *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.1; Şekil 4.1). Bu suşların 5'i (% 12,5) yumurtadan, 2'si (% 5) povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurtadan, 4'ü (% 8) döllenmiş yumurtadan, 3'ü (% 7,5) ovaryum sıvısından, 3'ü (% 5) gözlenmiş yumurtadan, 4'ü (% 4) keseli yavrudan ve 5'i ise (% 5) 5 gramdan küçük yavrulardan izole edildi. Beş gramdan büyük sağlıklı yavruların dalağından 2 adet (% 4), karaciğerinden 1 adet (% 2) ve böbreğinden 1 adet (% 2) *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapıldı. Yine 5 gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalağından 4 adet (% 8), karaciğerinden 4 adet (% 8), böbreğinden 3 adet (% 6), bağırsağından 3 adet (% 6) ve işletmedeki sudan da 1 adet (% 1,5) *F. psychrophilum* izole edildi. Yem, sperm ve sağlıklı alabalık yavrularının bağırsak örneklerinden ise *F. psychrophilum* etkeni izole edilemedi.

Tablo 4.1. I nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı ve yüzde oranı.

İncelenen Örnekler		Örnek Sayısı	İzole Edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> Sayısı	Yüzde Oranı
Yumurta		40	5	12,5
Ovaryum Sıvısı (2 ml'lik)		40	3	7,5
Sperm (2 ml'lik)		50	0	0
Povidin/iodin ile Dezenfekte Edilmiş Yumurta		40	2	5
Döllenmiş Yumurta		50	4	8
Gözlenmiş Yumurta		60	3	5
Keseli Yavru		100	4	4
5 Gramdan Küçük Yavru Alabalık		100	5	5
5 Gramdan Büyük Sağlıklı Yavru Alabalık	Dalak	50	2	4
	Karaciğer	50	1	2
	Böbrek	50	1	2
	Bağırsak	50	0	0
5 Gramdan Büyük Hastalıktan Şüpheli veya Yeni Ölmüş Yavru Alabalık	Dalak	50	4	8
	Karaciğer	50	4	8
	Böbrek	50	3	6
	Bağırsak	50	3	6
Yem		30	0	0
Su		64	1	1,5
TOPLAM		974	45	4,62



1: Yumurta, **2:** Ovaryum sıvısı, **3:** Sperm, **4:** Povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, **5:** Döllenmiş yumurta, **6:** Gözlenmiş yumurta, **7:** Keseli yavru, **8:** Beş gramdan küçük yavru alabalık, **9:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, **10:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, **11:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, **12:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, **13:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, **14:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, **15:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, **16:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı, **17:** Yem, **18:** Su

Şekil 4.1. I nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı.

Bu işletmede sağımı yapılan anaç alabalıklarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmedi. Ancak, sağım sonrasında strese bağlı olarak balık ölümlerine, yaralanmalara ve mantarlaşmaya rastlandı. Yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavru aşamalarında da mantarlaşmaya bağlı olarak deformasyon ve ölümler görüldü. Yavrularda ise yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra (0,2-2 g ağırlıkla) büyük kayıplara yol açan Bakteriyel soğuk su hastalığı semptomları tespit edildi. Yapılan incelemelerde işletmede günde 300–400 yavru alabalığın öldüğü (Şekil 4.2) saptandı. Yaklaşık 2 hafta kadar süren bu salgından dolayı yavru balıklarda % 20’lik bir kayıp meydana geldiği görüldü.



Şekil 4.2. İşletmede görülen toplu alabalık ölümleri.

Yavruların bulundukları havuzlarda yapılan incelemelerde hastalıklı gökkuşağı alabalıklarının iştahsız, durgun ve su yüzeyinde yüzdükleri, ayrıca bazı balıkların spiral yüzme hareketleri yaptıkları ve denge problemi yaşadıkları görüldü. Öte yandan bazı balıklarda asitese bağlı olarak karın boşluğunda şişkinlik (Şekil 4.3), ekzoftalmus (Şekil 4.4), derinin renginde koyulaşma (Şekil 4.5) ve birkaç balığın dorsal ve kaval yüzgecinde beyaz renkte lezyonların şekillendiği (Şekil 4.6) ve hastalığın ilerlemiş olduğu balıklarda kaval yüzgecin tamamen tahrip olduğu ve radiusların (Şekil 4.7) ortaya çıktığı gözlemlendi.



Şekil 4.3. Hasta alabalıkta görülen asites.



Şekil 4.4. Hasta alabalıkda görülen ekzoftalmus.



Şekil 4.5. Hastalıklı alabalıklarda deride koyulaşma.



Şekil 4.6. Hastalıklı alabalığın dorsal ve kaval yüzgecinde oluşan beyaz renkteki lezyonlar.



Şekil 4.7. Hastalıklı alabalıkta kaval yüzgecin tahrip olması ve radiusların ortaya çıkması.

Enfekte gökkuşağı alabalık yavrularının abdominal ensizyonla iç organları açığa çıkarıldı (Şekil 4.8; 4.9). Karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi. Hastalıklı yavru alabalıkların karın boşluklarında sarı renkli bir sıvı birikiminin ve bağırsaklarda iltihapların olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.8. Hastalıklı yavru alabalığın iç organlarının çıkarılması.



Şekil 4.9. Hastalıklı alabalığın iç organları.

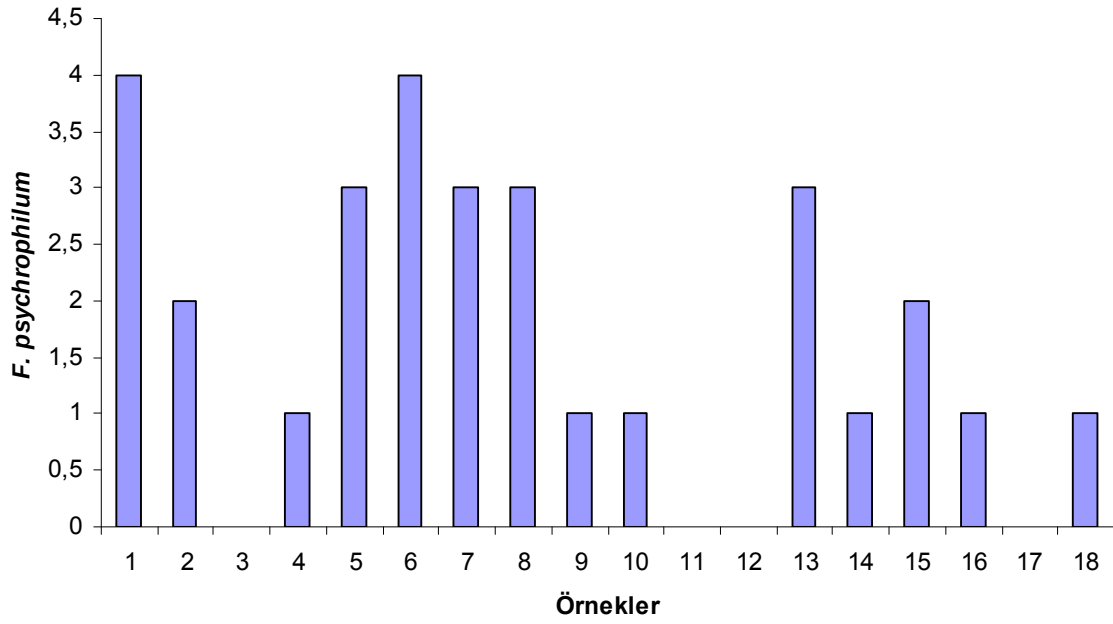
4.2. II Nolu Gökkuşığı Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi

Bu işletmeden alınan 40 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş 40 adet yumurta, 55 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 50 örnek, 2 ml'lik spermlerden 55 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 150 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek ve bağırsak örnekleri ile 60 adet su ve 30 adet yem örnekleri olmak üzere toplam 1040 adet örnek (Tablo 4.2) laboratuvarında *F. psychrophilum* yönüyle incelendi.

Bu örneklerden 30 adet (% 2,88) *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.2; Şekil 4.10). Bu suşların 4'ü (% 10) yumurtadan, 1'i (% 2,5) povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurtadan, 3'ü (% 5,45) döllenmiş yumurtadan, 2'si (% 4) ovaryum sıvısından, 4'ü (% 6,66) gözlenmiş yumurtadan, 3'ü (% 2) keseli yavrudan ve 3'ü (% 3) 5 gramdan küçük yavrulardan izole edildi. Beş gramdan büyük sağlıklı yavruların dalağından 1 adet (% 2) ve karaciğerinden 1 adet (% 2) *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapıldı. Yine 5 gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalağından 3 adet (% 6), karaciğerinden 1 adet (% 2), böbreğinden 2 adet (% 4), bağırsağından 1 adet (% 2) ve işletmedeki sudan da 1 adet (% 1,66) *F. psychrophilum* izole edildi. Yem, sperm ve sağlıklı alabalık yavrularının böbreği ile bağırsak örneklerinden ise *F. psychrophilum* etkeni izole edilemedi.

Tablo 4.2. II nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı ve yüzde oranı.

İncelenen Örnekler		Örnek Sayısı	İzole Edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> Sayısı	Yüzde Oranı
Yumurta		40	4	10
Ovaryum Sıvısı (2 ml'lik)		50	2	4
Sperm (2 ml'lik)		55	0	0
Povidin/iodin ile Dezenfekte Edilmiş Yumurta		40	1	2,5
Döllenmiş Yumurta		55	3	5,45
Gözlenmiş Yumurta		60	4	6,66
Keseli Yavru		150	3	2
5 Gramdan Küçük Yavru Alabalık		100	3	3
5 Gramdan Büyük Sağlıklı Yavru Alabalık	Dalak	50	1	2
	Karaciğer	50	1	2
	Böbrek	50	0	0
	Bağırsak	50	0	0
5 Gramdan Büyük Hastalıktan Şüpheli veya Yeni Ölmüş Yavru Alabalık	Dalak	50	3	6
	Karaciğer	50	1	2
	Böbrek	50	2	4
	Bağırsak	50	1	2
Yem		30	0	0
Su		60	1	1,66
TOPLAM		1040	30	2,88



1: Yumurta, **2:** Ovaryum sıvısı, **3:** Sperm, **4:** Povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, **5:** Döllenmiş yumurta, **6:** Gözlenmiş yumurta, **7:** Keseli yavru, **8:** Beş gramdan küçük yavru alabalık, **9:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, **10:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, **11:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, **12:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, **13:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, **14:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, **15:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, **16:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı, **17:** Yem, **18:** Su

Şekil 4.10. II nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı.

Bu işletmede sağımı yapılan anaç alabalıklarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmedi. Ancak, sağım sonrasında strese bağlı olarak balık ölümlerine, yaralanmalara ve mantarlaşmaya rastlandı. Yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavru aşamalarında da mantarlaşmaya bağlı olarak bozulma ve ölümler görüldü. Yavrularda ise yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra büyük kayıplara yol açan Bakteriyel soğuk su hastalığı semptomları tespit edildi. Yapılan incelemelerde işletmede günde 350–450 yavru alabalığın öldüğü (Şekil 4.2) saptandı. Yaklaşık 2 hafta kadar süren bu salgından dolayı yavru balıklarda % 30'luk kayıp meydana geldi.

Havuzların kontrolünde yavru alabalıkların iştahsız, durgun ve su yüzeyinde yüzdükleri, ayrıca bazı balıkların spiral yüzme hareketleri yaptıkları ve denge problemi yaşadıkları görüldü. Öte yandan bazı balıklarda karın boşluğunda sıvı birikimine bağlı olarak şişkinlik (Şekil 4.3), ekzoftalmus (Şekil 4.4), derinin renginde koyulaşma (Şekil 4.5) ve birkaç balığın dorsal ve kaval yüzgecinde beyaz renkte lezyonların şekillendiği ve

hastalığın ilerlemiş durumlarında balıklarda kavdal yüzgecin tamamen tahrip olduğu ve radiusların ortaya çıktığı gözlemlendi (Şekil 4.6–4.7).

Enfekte gökkuşağı alabalık yavrularının abdominal ensizyonla iç organları açığa çıkarıldı (Şekil 4.8-4.9). Karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi. Hastalıklı yavru alabalıkların karın boşluklarında sarı renkli bir sıvı birikiminin ve bağırsaklarda iltihapların olduğu gözlemlendi.

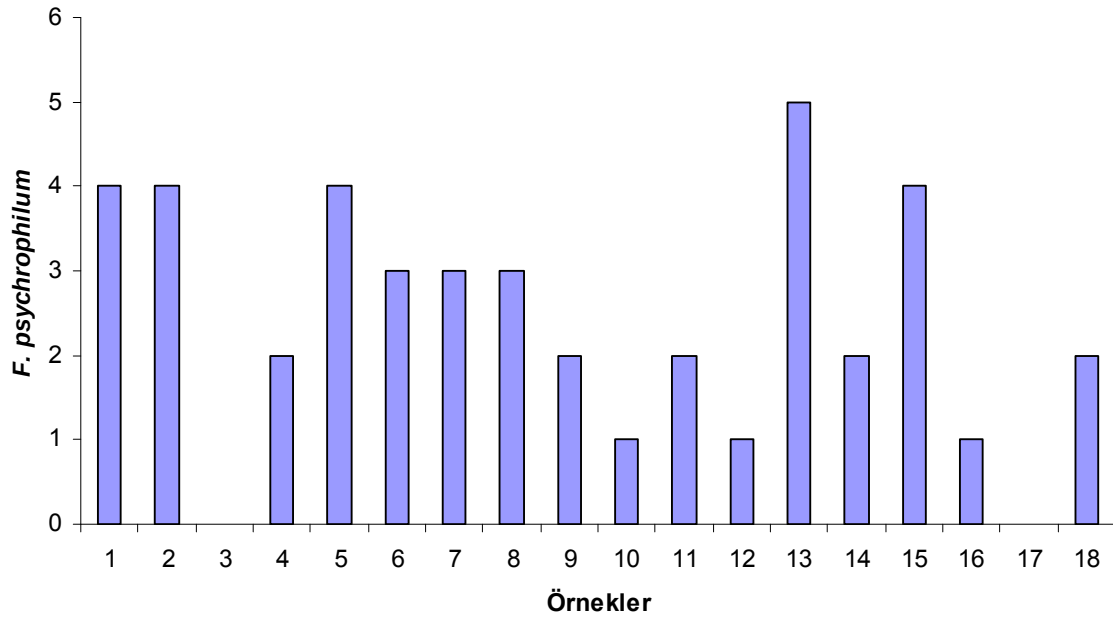
4.3. III Nolu Gökkuşağı Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi

Bu işletmeden alınan; 50 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş 50 adet yumurta, 60 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 50 örnek, 2 ml'lik spermlerden 40 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 120 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak örnekleri, 40 adet su ve 30 adet yem örnekleri olmak üzere toplam 1000 adet örnek (Tablo 4.3) laboratuvarında *F. psychrophilum* yönüyle incelendi.

Bu örneklerden 43 adet (% 4,3) *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.3; Şekil 11). Bu suşların 4'ü (% 8) yumurtadan, 2'si (% 4) povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurtadan, 4'ü (% 6,66) döllenmiş yumurtadan, 4'ü (% 8) ovaryum sıvısında, 3'ü (% 5) gözlenmiş yumurtadan, 3'ü (% 2,5) keseli yavrudan ve 3'ü (% 3) 5 gramdan küçük yavruardan izole edildi. Beş gramdan büyük sağlıklı yavruların dalağından 2 adet (% 4), karaciğerinden 1 adet (% 2) böbreğinden 2 adet (% 4) ve bağırsağından 1 adet (% 2) *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapıldı. Yine 5 gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalağından 5 adet (% 10), karaciğerinden 2 adet (% 4) böbreğinden 4 adet (% 8), bağırsağından 1 adet (% 2) ve işletmedeki sudan da 2 adet (% 5) *F. psychrophilum* izole edildi. Yem ve sperm örneklerinden ise *F. psychrophilum* etkeni izole edilemedi.

Tablo 4.3. III nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı ve yüzde oranı.

İncelenen Örnekler		Örnek Sayısı	İzole Edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> Sayısı	Yüzde Oranı
Yumurta		50	4	8
Ovaryum Sıvısı (2 ml’lik)		50	4	8
Sperm (2 ml’lik)		40	0	0
Povidin/iodin ile Dezenfekte Edilmiş Yumurta		50	2	4
Döllenmiş Yumurta		60	4	6,66
Gözlenmiş Yumurta		60	3	5
Keseli Yavru		120	3	2,5
5 Gramdan Küçük Yavru Alabalık		100	3	3
5 Gramdan Büyük Sağlıklı Yavru Alabalık	Dalak	50	2	4
	Karaciğer	50	1	2
	Böbrek	50	2	4
	Bağırsak	50	1	2
5 Gramdan Büyük, Hastalıktan Şüpheli veya Yeni Ölmüş Yavru Alabalık	Dalak	50	5	10
	Karaciğer	50	2	4
	Böbrek	50	4	8
	Bağırsak	50	1	2
Yem		30	0	0
Su		40	2	5
TOPLAM		1000	43	4,3



1: Yumurta, **2:** Ovaryum sıvısı, **3:** Sperm, **4:** Povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, **5:** Dölllenmiş yumurta, **6:** Gözlenmiş yumurta, **7:** Keseli yavru, **8:** Beş gramdan küçük yavru alabalık, **9:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, **10:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, **11:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, **12:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, **13:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, **14:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, **15:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, **16:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı, **17:** Yem, **18:** Su

Şekil 4.11. III nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı.

Bu işletmede sağımı yapılan anaç alabalıklarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmedi. Ancak, sağım sonrasında strese bağlı olarak balık ölümlerine, yaralanmalara ve mantarlaşmaya rastlandı. Yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavru aşamalarında da mantarlaşmaya bağlı olarak bozulma ve ölümler görüldü. Yavrularda ise yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra büyük kayıplara yol açan Bakteriyel soğuk su hastalığı semptomları tespit edildi. Yapılan incelemelerde işletmelerde günde 250–350 yavru alabalığın öldüğü saptandı (Şekil 4.2). Yaklaşık 2 hafta kadar süren bu salgından dolayı yavru balıklarda % 35’lik kayıp meydana geldi.

Havuzların kontrolünde yavru alabalıkların iştahsız, durgun ve su yüzeyinde yüzdükleri, ayrıca bazı balıkların spiral yüzme hareketleri yaptıkları ve denge problemi yaşadıkları görüldü. Öte yandan bazı balıklarda karın boşluğunda sıvı birikimine bağlı olarak şişkinlik (Şekil 4.3), ekzoftalmus (Şekil 4.4), derinin renginde koyulaşma (Şekil 4.5) ve birkaç balığın dorsal ve kaudal yüzgecinde beyaz renkte lezyonların şekillendiği ve

hastalığın ilerlemiş durumlarında balıklarda kavdal yüzgecin tamamen tahrip olduğu ve radiusların ortaya çıktığı gözlemlendi(Şekil 4.6; 4.7)

Enfekte gökkuşağı alabalık yavrularının abdominal ensizyonla iç organları açığa çıkarıldı (Şekil 4.8; 4.9). Karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi. Hastalıklı yavru alabalıkların karın boşluklarında sarı renkli bir sıvı birikiminin ve bağırsaklarda iltihapların olduğu gözlemlendi.

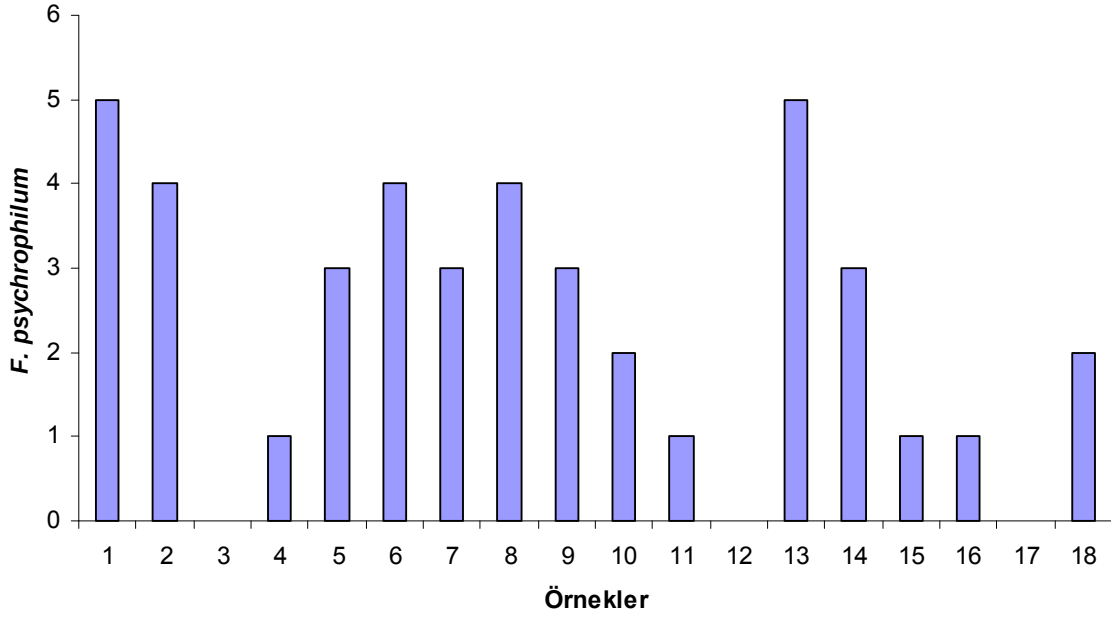
4.4. IV Nolu Gökkuşağı Alabalığı Üretim İşletmesinin İncelenmesi

Bu işletmeden alınan; 45 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş 45 adet yumurta, 55 adet döllenmiş yumurta, 2 ml'lik ovaryum sıvısından 55 örnek, 2 ml'lik spermlerden 40 örnek, 60 adet gözlenmiş yumurta, 140 adet keseli yavru, 100 adet 5 gramdan küçük yavru ile 100 adet 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavruların dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak örnekleri, 40 adet su ve 30 adet yem örnekleri olmak üzere toplam 1010 adet örnek (Tablo 4.4) laboratuvarında *F. psychrophilum* yönüyle incelendi.

Bu örneklerde 42 adet (% 4,15) *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.4; Şekil 12). Bu suşların 5'i (% 11,1) yumurtadan, 1'i (% 1,8) povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurtadan, 3'ü (% 7,5) döllenmiş yumurtadan, 4'ü (% 8,88) ovaryum sıvısından, 4'ü (% 6,66) gözlenmiş yumurtadan, 3'ü (% 2,14) keseli yavrudan ve 4'ü ise (% 4) 5 gramdan küçük yavrulardan izole edildi. Beş gramdan büyük sağlıklı yavruların dalağından 3 adet (% 6), karaciğerinden 2 adet (% 4) ve böbreğinden 1 adet (% 2) *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapıldı. Yine 5 gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık dalağından 5 adet (% 10), karaciğerinden 3 adet (% 6), böbreğinden 1 adet (% 2), bağırsağından 1 adet (% 2) ve işletmedeki sudan da 2 adet (% 5) *F. psychrophilum* izole edildi. Yem ve sperm örneklerinden ise *F. psychrophilum* etkeni izole edilemedi.

Tablo 4.4. IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı ve yüzde oranı.

İncelenen Örnekler		Örnek Sayısı	İzole Edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> Sayısı	Yüzde Oranı
Yumurta		45	5	11,1
Ovaryum Sıvısı (2 ml'lik)		45	4	8,88
Sperm (2 ml'lik)		55	0	0
Povidin/iodin ile Dezenfekte Edilmiş Yumurta		55	1	1,8
Döllenmiş Yumurta		40	3	7,5
Gözlenmiş Yumurta		60	4	6,66
Keseli Yavru		140	3	2,14
5 Gramdan Küçük Yavru Alabalık		100	4	4
5 Gramdan Büyük Sağlıklı Yavru Alabalık	Dalak	50	3	6
	Karaciğer	50	2	4
	Böbrek	50	1	2
	Bağırsak	50	0	0
5 Gramdan Büyük Hastalıktan Şüpheli veya Yeni Ölmüş Yavru Alabalık	Dalak	50	5	10
	Karaciğer	50	3	6
	Böbrek	50	1	2
	Bağırsak	50	1	2
Yem		30	0	0
Su		40	2	5
TOPLAM		1010	42	4,15



1: Yumurta, **2:** Ovaryum sıvısı, **3:** Sperm, **4:** Povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, **5:** Dölllenmiş yumurta, **6:** Gözlenmiş yumurta, **7:** Keseli yavru, **8:** Beş gramdan küçük yavru alabalık, **9:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, **10:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, **11:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, **12:** Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, **13:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, **14:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, **15:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, **16:** Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı, **17:** Yem, **18:** Su

Şekil 4.12. IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı.

Bu işletmede sağımı yapılan anaç alabalıklarda herhangi bir hastalık belirtisi görülmedi. Ancak, sağım sonrasında strese bağlı olarak balık ölümlerine, yaralanmalara ve mantarlaşmaya rastlandı. Yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavru aşamalarında da mantarlaşmaya bağlı olarak bozulma ve ölümler görüldü. Yavrularda ise yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra büyük kayıplara yol açan Bakteriyel soğuk su hastalığı semptomları tespit edildi. Yapılan incelemelerde özellikle işletmelerde günde 550–550 (Şekil 4.2) yavru alabalığın öldüğü saptandı. Yaklaşık 2 hafta kadar süren bu salgından dolayı yavru balıklarda % 40’lık kayıp meydana geldi.

Havuzların kontrolünde yavru alabalıkların iştahsız, durgun ve su yüzeyinde yüzdükleri, ayrıca bazı balıkların spiral yüzme hareketleri yaptıkları ve denge problemi yaşadıkları görüldü. Öte yandan bazı balıklarda karın boşluğunda sıvı birikimine bağlı olarak şişkinlik (Şekil 4.3), ekzoftalmus (Şekil 4.4), derinin renginde koyulaşma (Şekil 4.5) ve birkaç balığın dorsal ve kaudal yüzgecinde beyaz renkte lezyonların şekillendiği ve

hastalığın ilerlemiş durumlarında balıklarda kavdal yüzgecin tamamen tahrip olduğu ve radiusların (Şekil 4.6–4.7) ortaya çıktığı gözlemlendi.

Enfekte gökkuşağı alabalık yavrularının iç organları açığa (Şekil 4.8-4.9) çıkarıldı. Karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi. Hastalıklı yavru alabalıkların karın boşluklarında sarı renkli jelatinimsi bir sıvı birikiminin ve bağırsaklarda iltihapların olduğu gözlemlendi.

4.5. I, II, III, IV Nolu Gökkuşağı Alabalığı Üretim İşletmelerinin İncelenmesi

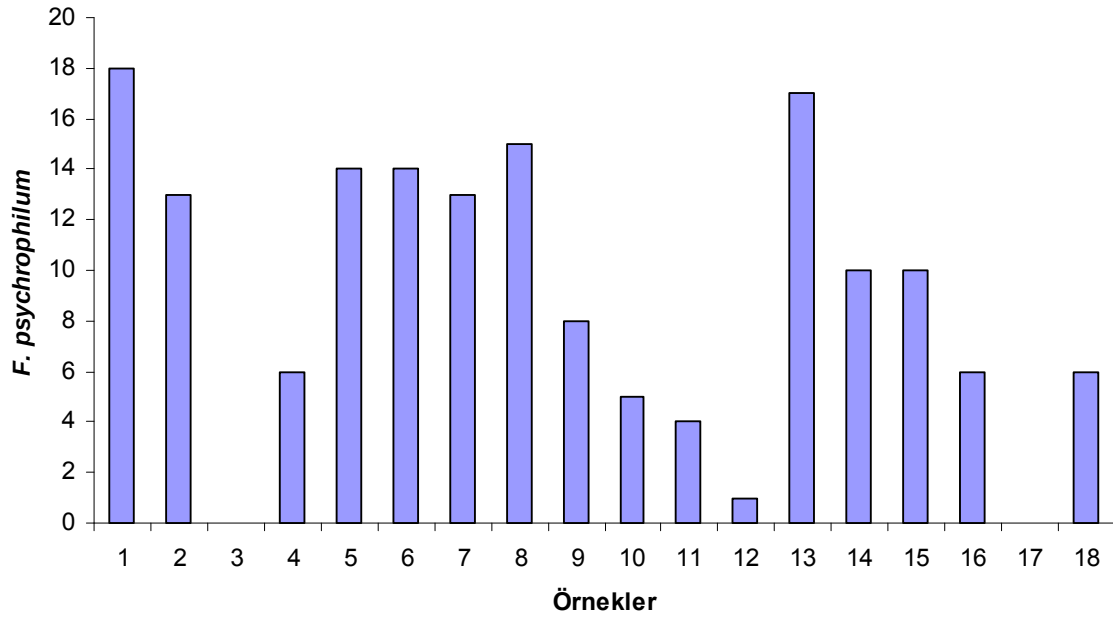
Elazığ'ın Keban ilçesinde bulunan 4 işletmede 8 ay boyunca *F. psychrophilum* bakterisi araştırıldı. Buna göre; 175 adet yumurta, 185 adet ovaryum sıvısı (2 ml'lik), 200 adet sperm (2 ml'lik) 185 adet povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, 205 adet döllenmiş yumurta, 180 adet gözlenmiş yumurta, 510 adet keseli yavru, 500 adet 5 gramdan küçük yavru, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, 200 adet 5 gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, 200 adet hastalıktan şüpheli ve yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı 120 adet yem ve 204 adet su örneği olmak üzere toplam 4024 adet örnek incelendi (Tablo 4.5).

Bu örneklerde 160 adet (% 3,97) *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.5; Şekil 4.13). Bu suşların 18'i (% 10,28) yumurtadan, 13'ü (% 7,02) ovaryum sıvısından, 6'ı (%3,24) povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurtadan, 14'ü (% 6,82) döllenmiş yumurtadan, 14'ü (% 7,77) gözlenmiş yumurtadan, 13'ü (% 2,54) keseli yavrudan ve 15'i ise (% 3,75) 5 gramdan küçük yavrulardan izole edildi. Beş gramdan büyük sağlıklı yavruların dalağından 8 adet (% 4), karaciğerinden 5 adet (% 2,5), böbreğinden 4 adet (% 2) ve bağırsağından 1 adet (% 0,5) *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapıldı. Yine 5 gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık dalağından 17 adet (% 8,5), karaciğerinden 10 adet (% 5), böbreğinden 10 adet (% 5), bağırsağından 6 adet (% 3) ve işletmedeki sudan da 6 adet (% 2,94) *F. psychrophilum* izole edildi. Bütün işletmelerdeki yem ve sperm örneklerinden ise *F. psychrophilum* etkeni izole edilemedi.

Tablo 4.5. I, II, III, IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı ve yüzdesi.

ÖRNEK ALINAN YER		ÖRNEK ALINAN İŞLETMELER						
		I Nolu işletme	II Nolu işletme	III Nolu işletme	IV Nolu işletme	Toplam Materyal Sayısı	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> sayısı	Yüzde Oranı
Yumurta		40	40	50	45	175	18	10,28
Ovaryum Sıvısı (2 ml'lik)		40	50	50	45	185	13	7,02
Sperm (2 ml'lik)		50	55	40	55	200	0	0
Povidin/iodin ile dezenfekte edilmiş yumurta		40	40	50	55	185	6	3,24
Döllenmiş Yumurta		50	55	60	40	205	14	6,82
Gözlenmiş Yumurta		60	60	60	60	240	14	7,77
Keseli Yavru		100	150	120	140	510	13	2,54
5 Gramdan Küçük Yavru Alabalık		100	100	100	100	400	15	3,75
5 Gramdan Büyük Sağlıklı Yavru alabalık	Dalak	50	50	50	50	200	8	4
	Karaciğer	50	50	50	50	200	5	2,5
	Böbrek	50	50	50	50	200	4	2
	Bağırsak	50	50	50	50	200	1	0,5
5 Gramdan Büyük Hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş Yavru Alabalık	Dalak	50	50	50	50	200	17	8,5
	Karaciğer	50	50	50	50	200	10	5
	Böbrek	50	50	50	50	200	10	5
	Bağırsak	50	50	50	50	200	6	3
Yem		30	30	30	30	120	0	0
Su		64	60	40	40	204	6	2,94

* İzole edilen *Flavobacterium psychrophilum* sayısı bakımından işletmeler arasında fark bulunamamıştır ($P>0,05$, $F_{3,68}=1,05$).



1: Yumurta, 2: Ovaryum sıvısı, 3: Sperm, 4: Povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, 5: Dölenmiş yumurta, 6: Gözlenmiş yumurta, 7: Keseli yavru, 8: Beş gramdan küçük yavru alabalık, 9: Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık dalağı, 10: Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık karaciğeri, 11: Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık böbreği, 12: Beş gramdan büyük sağlıklı yavru alabalık bağırsağı, 13: Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık dalağı, 14: Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık karaciğeri, 15: Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık böbreği, 16: Beş gramdan büyük hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş yavru alabalık bağırsağı, 17: Yem, 18: Su

Şekil 4.13. I, II, III, IV nolu işletmeden alınan örneklerden izole edilen *F. psychrophilum* sayısı.

4.6. *Flavobacterium psychrophilum*'un İzolasyonu

4.6.1. Yumurta, Povidin/İodin Solüsyonuyla Dezenfekte Edilmiş Yumurta, Sperm, Ovaryum sıvısı, Dölenmiş Yumurta, Gözlenmiş Yumurta Keseli Yavru ve Yavru Örneklerinden Besiyelerine Yapılan Ekimler

Yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta ve keseli yavru örnekleri homojenizatörde kolayca homojenize edildi. Ancak dölenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta ve 5 gramdan küçük yavru örneklerini homojenizatörde homojen hale getirmek hem zor hem de uzun zaman aldı. Sperm ve ovaryum sıvısı, sıvı halde olduklarından dolayı ekim öncesi homojenizatörden geçirilmedi. Yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta ve dölenmiş yumurta homojen edildikten sonra sarı renkte homojen bir sıvı; gözlenmiş yumurta ve keseli yavru siyah renkte homojen bir sıvı; 5 gramdan küçük yavru alabalıklarda ise siyah renkte ve kanlı homojen bir sıvı elde edildi.

Beş gramdan büyük sağlıklı ve hasta alabalıkların iç organlarını çıkarmak zor olduğu gibi uzun bir zaman da gereksinim duyulmuştur. Yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, sperm, ovaryum sıvısı, dölenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru, 5 gramdan küçük yavru, yem ve su örneklerinden hazırlanmış süspansiyonlar ile 5 gramdan büyük sağlıklı ve hasta alabalıkların karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsaklarından TYES-A, CA, MAOA, EAO+FBS+A, TYES + Tobramycin agara ve TYES-B, CB, MAOB, EAO+FBS+B, TYES + TOBRAMYCİN+ broth'a ekimler yapıldı.

4.6.2. Katı Besiyerlerinde Üreme

TYES-A, CA, MAOA, EAO+FBS+A, TYES + Tobramycin agara yapılan ekimler 15°C'de 5–7 gün süreyle etüvde bekletildikten sonra çoğunluğu sarı renkte olmak üzere değişik koloniler (Şekil 4.14) saptandı. Bu sarı renkli kolonilerden TYES-A ve EAO+FBS+A'ya ekimler yapılarak sarı pigmentli saf kolonilerin (Şekil 4.15) oluştuğu görüldü.



Şekil 4.14. TYES-A ve EAO+FBS agarda ilk ekimden sonra çoğunluğu sarı renkte olan karışık koloniler.



Şekil 4.15. TYES –A ve EAO+FBS agarda üreyen saf koloniler.

4.7. *Flavobacterium psychrophilum*'un İdentifikasyonu

İzole edilen gram negatif çomak şekilli 160 adet suşun saf kültürlerinden fenotipik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi (Tablo 4.6). Bu suşlardan katalaz yarı pozitif; fleksirubin pigment, hemoliz, jelatin, kazein, tween 20 ve tween 80 hidrolizi pozitif ve sitokrom oksidaz, kongo kırmızısı, hareket, nitrat, sitrat, indol, metil red (MR), voges proskauer (VP), üreaz, hidrojen sülfür (H₂S), nişasta, eskülün, ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase (ONPG) ve dekarboksilase (OD) negatif olarak tespit edildi.

Tablo 4.6. *F. psychrophilum*'un fenotipik ve biyokimyasal özellikleri.

Fenotipik ve Biyokimyasal Özellikler	İzole Edilen 160 adet <i>Flavobacterium psychrophilum</i> Suşlarında ilk 20 tanesi																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Koloni rengi	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +	Zayıf +
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fleksirubin pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kongo red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmons sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üreaz testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.6'nın devamı.

Hemoliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskülin hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20 hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meliboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigolalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4.6'nin devamı.

Sukroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TYE agarda üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TYES-A'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSA'da üreme	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
TSB'da üreme	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Kanlı agar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
MCA'da üreme	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PCA'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MHA'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0°C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5°C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20°C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25°C'de üreme	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0,0 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

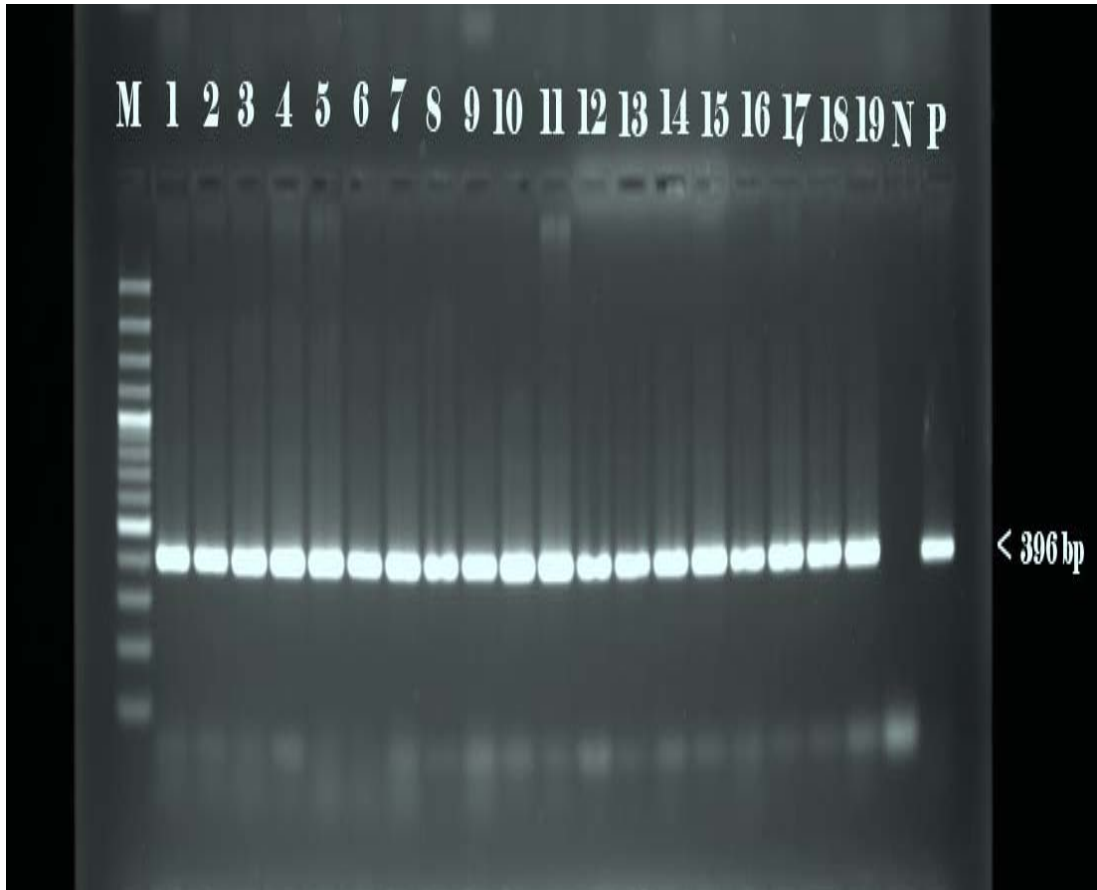
Tablo 4.6'nın devamı.

% 0,5 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 1,0 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 2,0 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

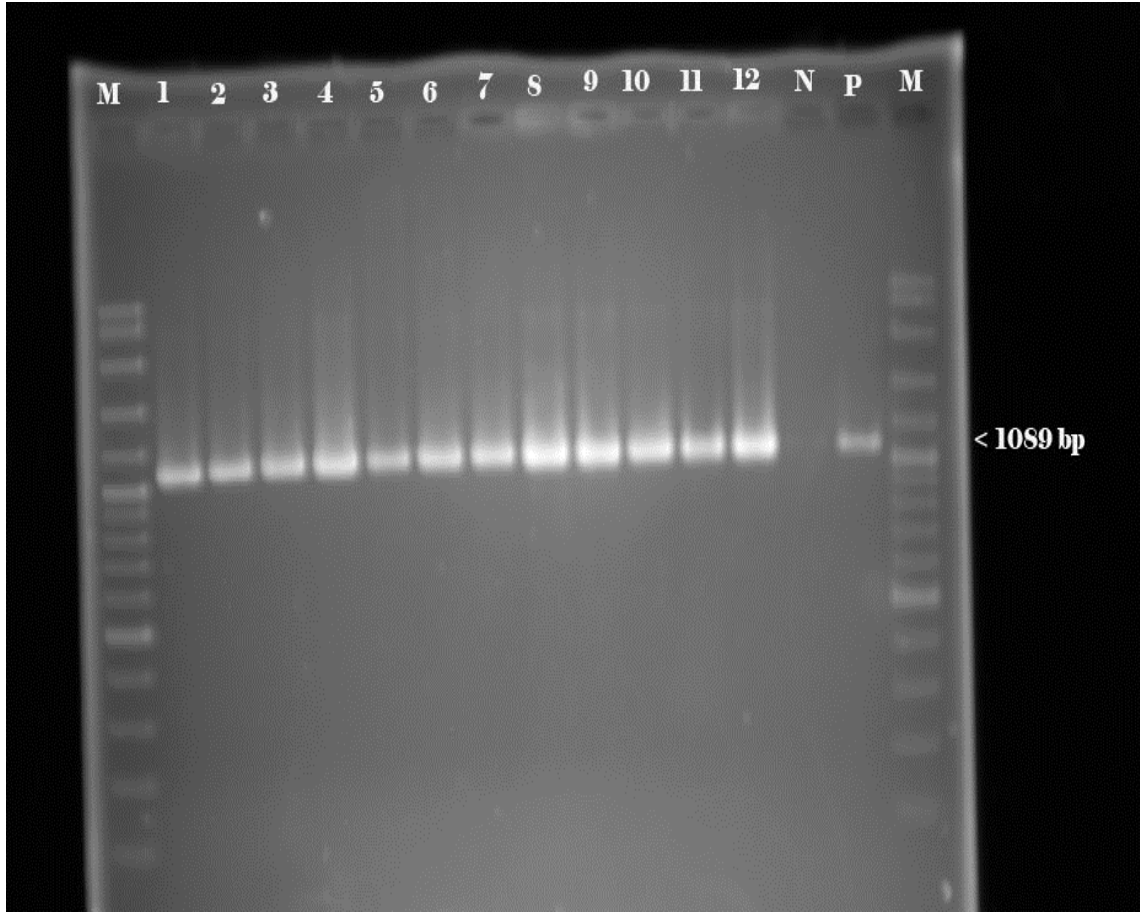
* _ : Negatif Reaksiyon, +: Pozitif Reaksiyon, **ONPG**: Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase, **H₂S**: Hidrojen Sülfür, **MCA**: MacConkey Agar, **O/F**: Oksidasyon/Fermentasyon, **OD**: Ornitindekarboksilaz, **TSA**: Tryptic Soy Agar, **TSB**: Tryptic Soy Broth, **PCA**: Plate Count Agar, **MHA**: Mueller-Hinton Agar.

4.8. DNA İzolasyonu Yapılan *Flavobacterium psychrophilum*'un Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Teyit Edilmesi

Keban'daki Gökkuşığı alabalığı işletmelerinden alınan 4024 adet örnekten 160 *F. psychrophilum* izole edildi. Bu izolatlar ile birlikte *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu (pozitif kontrol-P) ve *E. coli* (negatif kontrol-N)'nin DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu DNA'ların PZR ile amplifikasyonu yapıldı. Daha sonra bu ürünler % 1,5'lük agaroz jelde elektroforezden geçirildi. Jel ethidium bromide ile boyanıp, sonuçlar ultraviyole transilluminatörde değerlendirildi. Yüz atmış adet suşun hepsinde *Flavobacterium* cinsine ait primerlerle 396 bp uzunluğunda bantlar (Şekil 4.16) ve *F. psychrophilum* türüne ait PSY1 190–206, PSY2 1278–1262 primerlerle 1089 bp uzunluğunda bantlar görüldü (Şekil 4.17). Dolayısıyla 160 adet izolatın tamamının *F. psychrophilum* olduğu kanıtlandı.



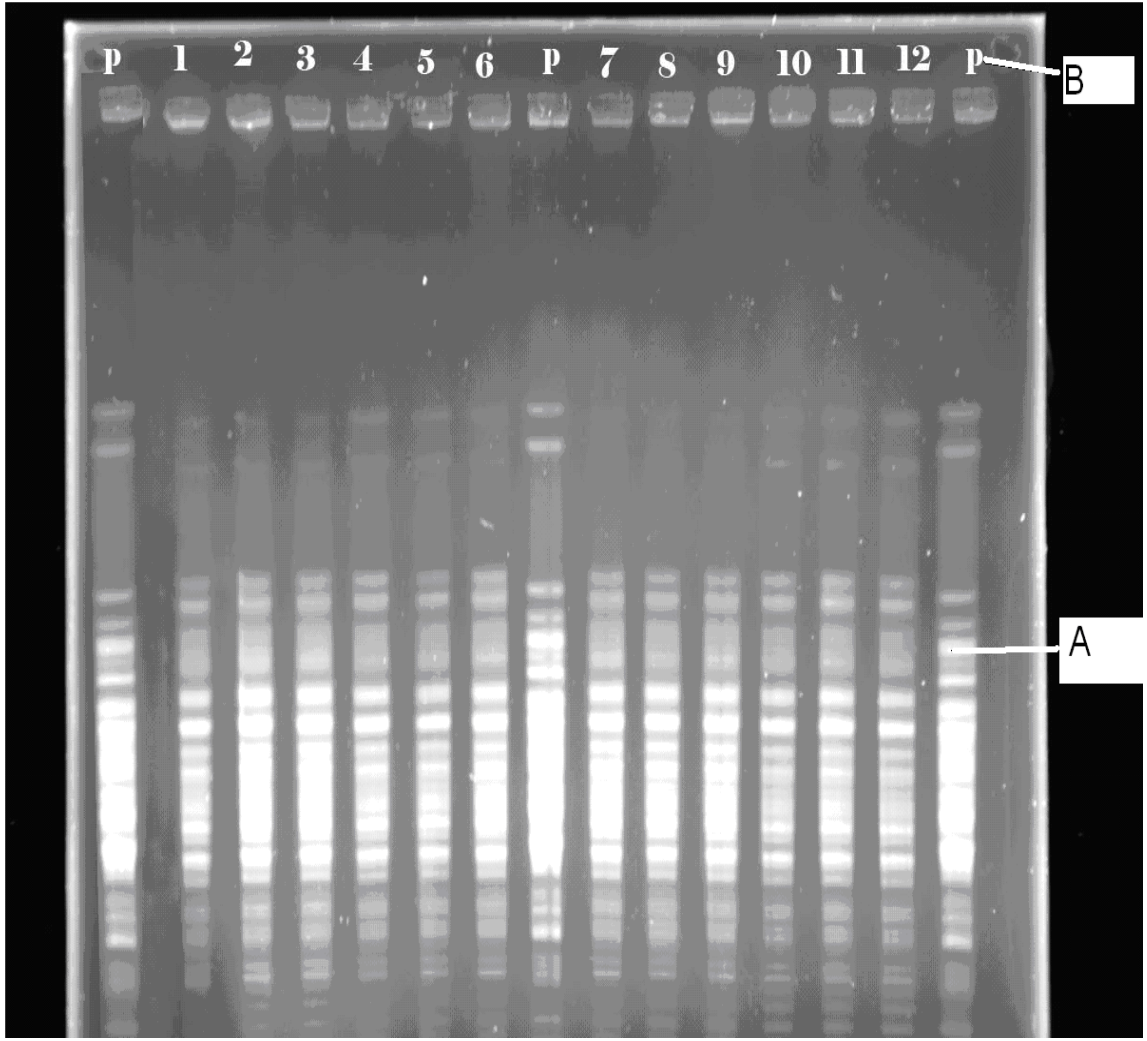
Şekil 4.16. DNA örneklerinin, GYRA-FP1F, GYRA-FP1R primer çifti kullanılarak PZR'de analizi sonucu oluşan *Flavobacterium* cinsine ait 396 bp'lik bantları gösteren agaroz jel; 1–19: İşletmelerden izole edilen *F. psychrophilum* örnekleri; M: 100 bp'lik moleküler marker; N: Negatif kontrol (*E. coli*) (MBI, Fermentas); P: Pozitif kontrol referans suş (*F. psychrophilum* NCIMB 1947^T).



Şekil 4.17. DNA örneklerinin, PSY1 190–206, PSY2 1278–1262 primer çifti kullanılarak PZR’de analizi sonucu oluşan *F. psychrophilum* türüne ait 1089 bp’lik bantları gösteren agaroz jel; 1–12: İşletmelerden izole edilen *F. psychrophilum* örnekleri; M: 100 bp’lik moleküler marker; N: Negatif kontrol (*E. coli*) (MBI, Fermantas); P: Pozitif kontrol referans suş (*F. psychrophilum* NCIMB 1947^T).

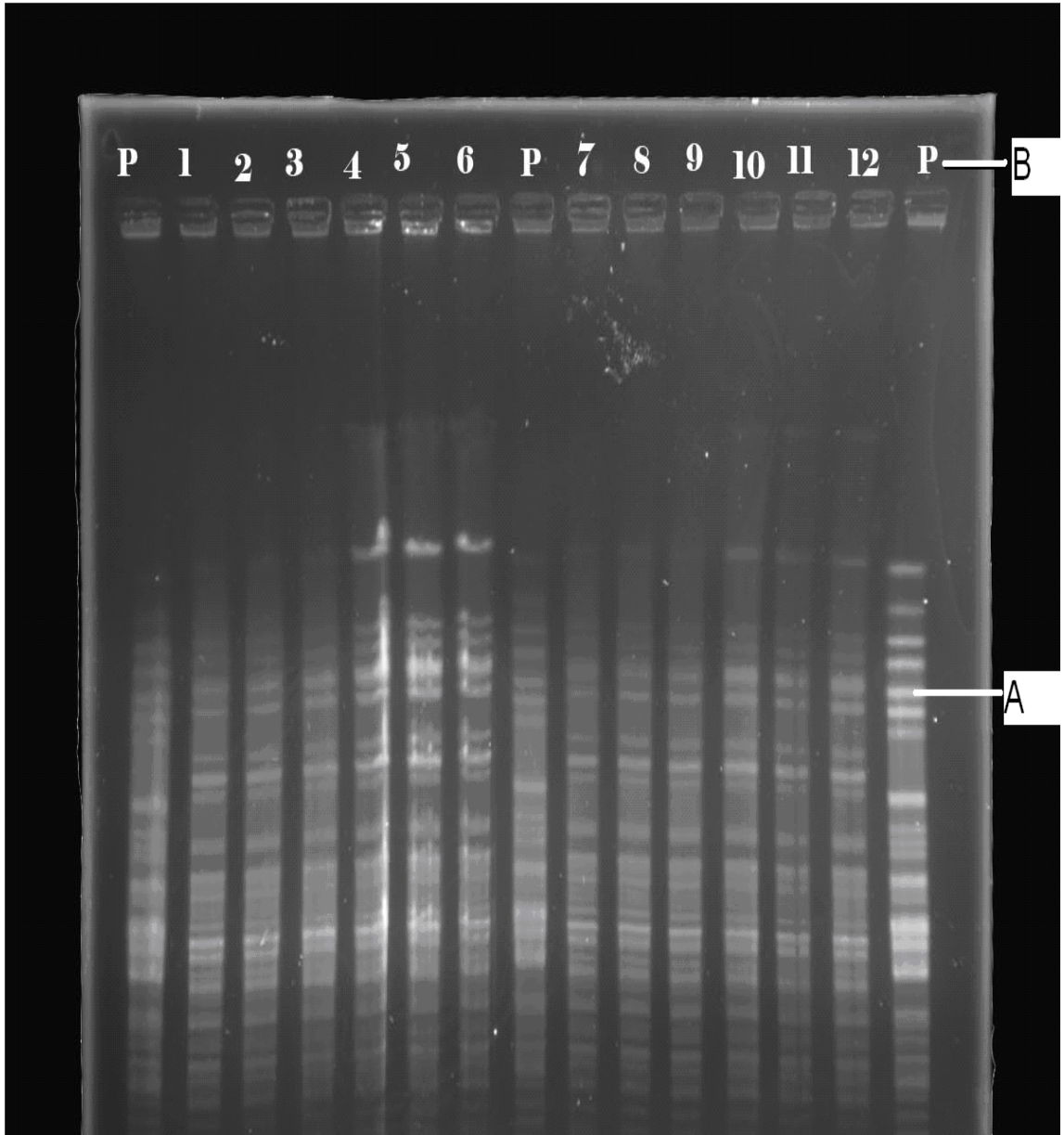
4.9. *Flavobacterium psychrophilum*’un Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile Moleküler Alt Tiplendirilmesi

Yumurta, ovaryum sıvısı, povidin/iodin ile dezenfekte edilmiş yumurta, döllenmiş yumurta, gözlanmış yumurta, keseli yavru, beş gramdan küçük yavru, beş gramdan büyük yavru dalağı, beş gramdan büyük yavru dalağı, beş gramdan büyük yavru karaciğeri, beş gramdan büyük yavru böbreği, beş gramdan büyük yavru bağırsağından *F. psychrophilum* olarak tanımlanan izolatlar *Xho*I enzimi ile PFGE analizine tabi tutuldu. PFGE analizi sonucunda dört farklı işletmeden elde edilen izolatların hepsinde aynı bant profili tespit edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. *F. psychrophilum*'un kromozomal DNA'sının *XhoI* enzimi ile kesilmesi sonucu agaroz jeldeki bantları (A); P: *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu (B); 1: Yumurta; 2: Ovaryum sıvısı; 3: Povidin/iodin ile dezenfekte edilmiş yumurta; 4: Döllenmiş yumurta; 5: Gözlanmış yumurta; 6: Keseli yavru; 7: Beş gramdan küçük yavru alabalık; 8: Beş gramdan büyük yavru alabalık dalağı; 9: Beş gramdan büyük yavru alabalık dalağı; 10: Beş gramdan büyük yavru alabalık karaciğeri; 11: Beş gramdan büyük yavru alabalık böbreği; 12: Beş gramdan büyük yavru alabalık bağırsağı.

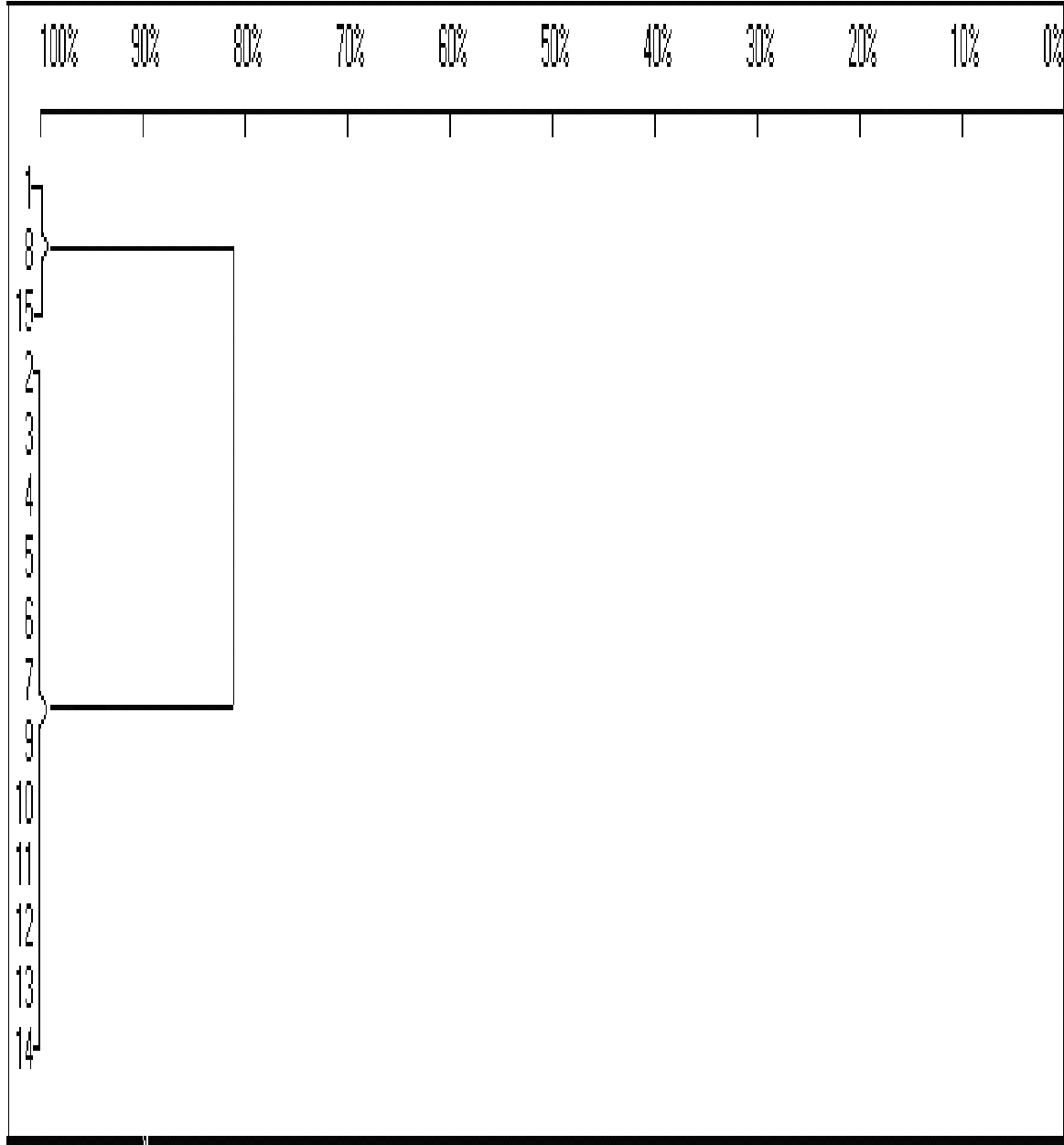
PZR ile teyit edilen 160 adet *F. psychrophilum* ve 3 adet *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşunu içeren agaroz kalıplardan DNA izolasyonu yapıldı. Bu agaroz kalıp DNA'larından 12 adet örnek seçildi. Bu örneklerle birlikte 3 adet referans suşu (P) içeren agaroz kalıplar *BlnI* enzimi ile PFGE analizine tabi tutuldu (Şekil 4.19). PFGE analizi sonucunda dört farklı işletmeden elde edilen izolatların hepsinde aynı bant profil tespit edildi.



Şekil 4.19. *F. psychrophilum*'un kromozomal DNA'sının *BlnI* enzimi ile kesim sonucu oluşan agaroz jeldeki bantları (A); **P:** *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu (B); **1:** Yumurta; **2:** Ovaryum sıvısı; **3:** Povidin/iodin ile dezenfekte edilmiş yumurta; **4:** Dölllenmiş yumurta; **5:** Gözlanmış yumurta; **6:** Keseli yavru; **7:** Beş gramdan küçük yavru alabalık; **8:** Beş gramdan büyük yavru alabalık dalağı; **9:** Beş gramdan büyük yavru alabalık dalağı; **10:** Beş gramdan büyük yavru alabalık karaciğeri; **11:** Beş gramdan büyük yavru alabalık böbreği; **12:** Beş gramdan büyük yavru alabalık bağırsağı.

Jel karşılaştırma yazılım sistemi kullanılarak bantların profil analizi yapıldığında *F. psychrophilum* suşu (2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14) ile referans suşları (1,8,15) arasında % 80 oranında akrabalık ilişkisi olduğu ortaya çıkarıldı (Şekil 4.20). Buna göre *F.*

psychrophilum NCIMB 1947^T referans suş ile işletmelerden elde edilen izolatlar arasında yakın ilişki olduğu görüldü. *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suş profili Tip A ve işletmelerden elde edilen izolatlar ise aynı profile sahip olup Tip A₁ olarak tiplendirildi.



Şekil 4.20. *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suş ve işletmelerden izole edilen *F. psychrophilum* PFGE profilleri. **1,8,15:** *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suş; **2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,13,14:** İşletmelerden izole edilen *F. psychrophilum*.

4.10. *Flavobacterium psychrophilum*'un Antibakteriyel Duyarlılık Test Sonuçları

F. psychrophilum'un izolasyonu ve identifikasyonunun ardından antibakteriyel duyarlılık test için 37 adet farklı antibakteriyel disk kullanıldı (Tablo 4.7). Buna göre *F. psychrophilum*'un antibakteriyellere olan duyarlılık dereceleriyle duyarlılık yüzde oranları ayrı ayrı belirlendi (Tablo 4.8). Ayrıca bu duyarlılık dereceleri ile duyarlılık yüzde oranları grafikte gösterildi.

4.10.1. *Flavobacterium psychrophilum*'un Antibakteriyel Duyarlılık Durumları

F. psychrophilum suşlarının çeşitli antibakteriyellere karşı duyarlılık durumlarına ait sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. Buna göre çalışmada izole edilen tüm *F. psychrophilum* izolatlarının balıklar için ruhsatlandırılmış olan Oksitetrasiklin, Florfenikol, Enrofloksasin ve Siprofloksasine karşı duyarlı oldukları tespit edildi.

Tablo 4.7. İzole edilen *F. psychrophilum*'un antibakteriyel duyarlılık durumları.

	Yumurta (n:18)			Ovaryum sıvısı (n:13)			Povidin /iodin ile dezenfekte edilmiş yumurta(n:6)			Döllenmiş yumurta (n:14)			Gözlenmiş Yumurta (n:14)			Keseli yavru (n:13)			5 gramdan küçük Yavru (n:15)			Dalak (n:25)			Karaciğer (n:15)			Böbrek (n:14)			Bağırsak (n:7)			Su (n:6)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
CN	15	0	3	10	0	3	4	0	2	10	0	4	12	0	2	11	0	2	11	0	4	20	0	5	12	0	3	11	0	3	5	0	2	5	0	1
AX	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
AMC	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
AK	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
AMP	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
C	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
CAZ	0	3	15	0	2	11	0	2	4		2	12	0	3	11	0	1	12	0	3	12	0	5	20	0	1	14	0	2	13		1	6	0	1	5
CZ	18	0	0	13		0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
CEP	0	3	15	0	2	11	0	2	4	0	2	12	0	3	11	0	1	12	0	3	12	0	5	20	0	1	14	0	2	13	0	1	6	0	1	5
İPM	0	4	14	0	3	10	0	3	3	0	3	11	0	4	10	0	3	11	0	5	10	0	5	20	0	1	14	0	1	14	0	2	5	0	2	4
E	6	7	5	8	2	3	2	3	1	10	2	2	8	2	4	6	3	4	7	8	0	15	6	4	9	3	3	10	3	1	5	2		3	3	0
EN	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
CLR	0	3	15	0	2	11	0	2	4	0	2	12	0	3	11	0	1	12	0	3	12	0	5	20	0	1	14	0	2	13	0	1	6	0	1	5
CIP	0	0	18	0	0	13	0	0	6	0		14	0	0	14	0		13	0		15	0		25	0		15	0	0	14	0	0	7	0	0	6

Tablo 4.7'nin devamı.

F/M	0	4	14	0	3	10	0	3	3	0	3	11	0	4	10	0	3	11	0	5	10	0	5	20	0	0	14	0	1	14	0	2	5	0	2	4
SMZ	6	7	5	8	2	3	2	3	1	10	2	2	8	2	4	6	3	4	7	8	0	15	6	4	9	3	3	10	3	1	5	2		3	3	0
P	16	1	1	13	0	0	4	1	1	10	2	2	11	3	1	9	2	2	11	4	0	20	4	1	12	2	1	9	4	1	6	1		4	0	2
OT	0	0	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6
PIL	0	3	15	0	2	11	0	2	4	0	2	12	0	3	11	0	1	12	0	3	12	0	5	20	0	1	14	0	2	13	0	1	6	0	1	5
FP	3	0	15	2	0	11	2	0	4	3	0	11	2	0	12	1	0	12	2	0	13	5	0	20	1	0	14	1	0	13	1	0	6	2	0	4
B	0	3	15	0	2	11	0	2	4	0	2	12	0	3	11	0	1	12	0	3	12	0	5	20	0	1	14	0	2	13		1	6	0	1	5
OP	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
BC	0	3	15	0	2	11	0	2	4	0	2	12	0	3	11	0	1	12	0	3	12	0	5	20	0	1	14	0	2	13	0	1	6	0	1	5
ENR	0	0	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6
FFC	0	0	18		0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6
S	7	0	11	3	0	10	4	0	2	3	0	11	4	0	10	2	0	11	2	0	13	1	0	24	2	0	13	3	0	11	2	0	5	3	0	3
N	18	0	0	13	0	0	6	0		14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
CC	16	1	1	13	0	0	4	1	1	10	2	2	11	3	1	9	2	2	11	4	0	20	4	1	12	2	1	9	4	1	6	1	0	4	0	2
OFX	15	0	3	10	0	3	4	0	2	10	0	4	12	0	2	11		2	11	0	4	20	0	5	12	0	3	11	0	3	5	0	2	5	0	1

Tablo 4.7'nin devamı.

VA	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13		0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
NN	0	4	14	0	3	10	0	3	3	0	3	11	0	4	10	0	3	11	0	5	10	0	5	20	0	0	14	0	1	14	0	2	5	0	2	4
FOX	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
NA	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
NET	0	4	14	0	3	10		3	3	0	3	11	0	4	10	0	3	11	0	5	10	0	5	20	0	0	14	0	1	14	0	2	5	0	2	4
ATM	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
LC	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0
TMP	18	0	0	13	0	0	6	0	0	14	0	0	14	0	0	13	0	0	15	0	0	25	0	0	15	0	0	14	0	0	7	0	0	6	0	0

* n: *Flavobacterium psychrophilum* sayısı

* **CN**: Gentamisin; **AX**: Amoksisilin; **AMC**: Amoksisilin/Klavulanik asit; **AK**: Amikasin; **AMP**: Ampisilin; **C**: Kloramfenikol; **CAZ**: Seftriakson; **CZ**: Sefazolin; **CEP**: Sefoperazon; **İPM**: İmipenem; **E**: Eritromisin; **EN**: Enoksasin; **CLR**: Klaritromisin; **CIP**: Siprofloksasin; **F/M**: Nitrofurantin; **SMZ**: Sulfametoksazol; **P**: Penisilin; **OT**: Oksitetrasiklin; **PIL**: Piperasillin; **FP**: Furazolidon; **B**: Basitrasin; **OP**: Optokin; **BC**: Batrim (Trimetoprim + Sulfametoksazol); **ENR**: Enrofloksasin; **FFC**: Florfenikol; **S**: Streptomisin; **N**: Neomisin; **CC**: Klindamisin; **OFX**: Ofloksasin; **VA**: Vankomisin; **NN**: Tobramisin; **FOX**: Sefoksitin; **NA**: Nalidiksik Asit; **NET**: Netilmisin; **ATM**: Aztreonam; **LC**: Linkomisin; **TMP**: Trimetoprim;

* R (Resistant-dirençli); I (intermediate sensitive-orta derecede duyarlı); S (Sensitive-duyarlı).

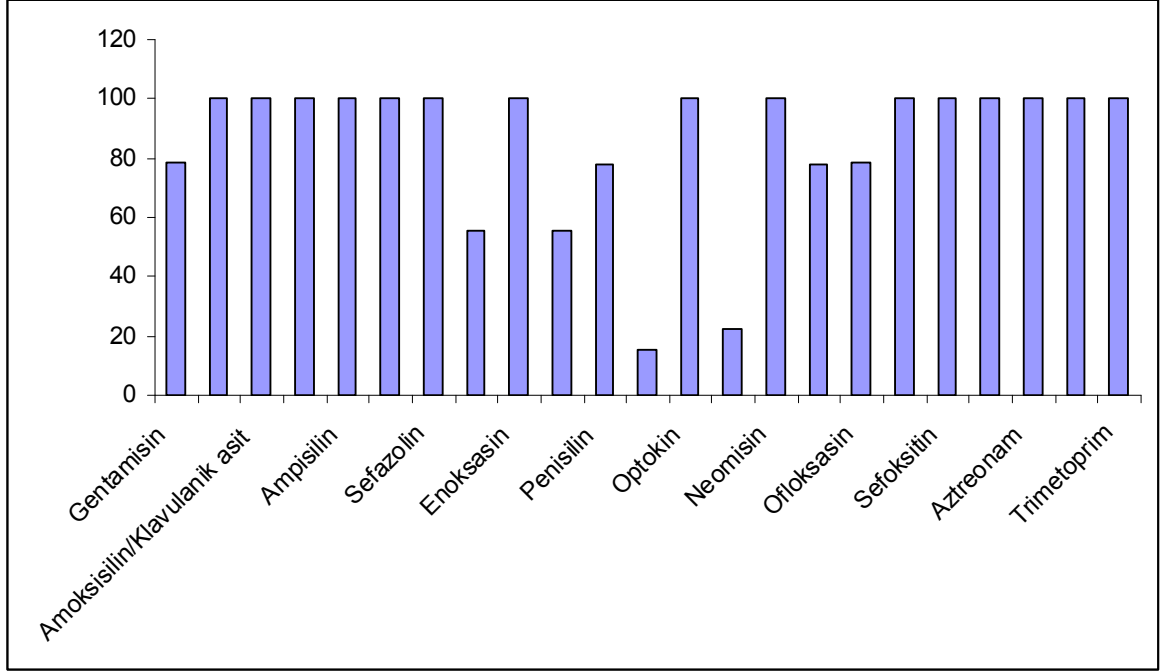
4.10.2. *Flavobacterium psychrophilum* suşlarının Antibakteriyel Duyarlılık Yüzde Oranları

F. psychrophilum suşlarının kullanılan antibakteriyellere karşı duyarlılık yüzde oranları da tespit edilip Tablo 4.8’de verildi. Antibakteriyel disk sonuçlarına göre, *F. psychrophilum* suşları; Amoksisilin, Amoksisilin/Klavulanik asit, Amikasin, Ampisilin, Kloramfenikol, Sefazolin, Enoksasin, Optokin, Neomisin, Vankomisin, Sefoksitin, Nalidiksik Asit, Aztreonam, Linkomisin ve Trimetoprim (% 100); Penisilin ve Klindamisin (% 78,12); Ofloksasin ve Gentamisin (% 78,75); Eritromisin ve Sulfametoksazol (% 55,62) ile Furazolidone (% 15,62) gibi antibakteriyellere karşı direnç gösterdiği görüldü. *F. psychrophilum*; Eritromisin ve Sulfametoksazol (% 28,12); İmipenem (% 21,87); Nitrofurantoin, Tobramisin ve Netilmisin (% 21,25); Seftriakson, Sefoperazon, Klaritromisin, Piperasillin, Basitrasin ve Trimetoprim + Sulfametoksazol (% 16,25); Penisilin ve Klindamisin (% 12,50) gibi antibakteriyellere de orta derecede duyarlı olduğu tespit edildi. Yine *F. psychrophilum*; Oksitetrasiklin, Florfenikol, Enrofloksasin ve Siprofloksasin (% 100) ile Furazolidone (% 84,37); Trimetoprim + Sulfametoksazol, Seftriakson, Sefoperazon, Klaritromisin ve Piperasillin (% 83,75); Tobramisin, Nitrofurantoin ve Netilmisin (% 78,75); İmipenem (% 78,12); Streptomisin (% 77,5); Ofloksasin (% 21,25); Eritromisin ve Sulfametoksazol (% 16,25); Penisilin ve Klindamisin (% 9,37) antibakteriyellerine ise duyarlı olduğu belirlendi.

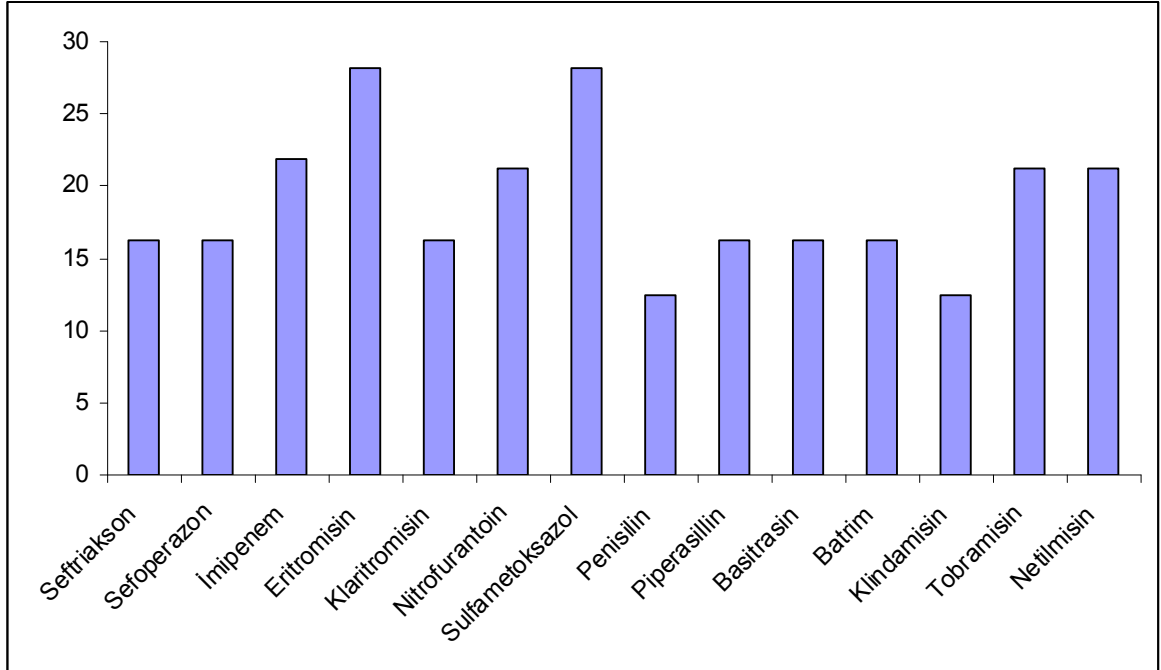
Tablo 4.8. *F. psychrophilum* suşlarının antibakteriyellere olan duyarlılık yüzde dağılımı (n:160).

Antibakteriyeller	Dirençli (R)		Orta derecede duyarlı (I)		Duyarlı (S)	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Gentamisin	126	78,75	0	0	34	21,25
Amokisilin	160	100	0	0	0	0
Amoksisilin/Klavulanik asit	160	100	0	0	0	0
Amikasin	160	100	0	0	0	0
Ampisilin	160	100	0	0	0	0
Kloramfenikol	160	100	0	0	0	0
Seftriakson	0	0	26	16,25	134	83,75
Sefazolin	160	100	0	0	0	0
Sefoperazon	0	0	26	16,25	134	83,75
İmipenem	0	0	35	21,875	125	78,125
Eritromisin	89	55,625	45	28,125	26	16,25
Enoksasin	160	100	0	0	0	0
Klaritromisin	0	0	26	16,25	134	83,75
Siprofloksasin	0	0	0	0	160	100
Nitrofurantoin	0	0	34	21,25	126	78,75
Sulfametoksazol	89	55,625	45	28,125	26	16,25
Penisilin	125	78,125	20	12,5	15	9,375
Oksitetrasiklin	0	0	0	0	160	100
Piperasillin	0	0	26	16,25	134	83,75
Furazolidone	25	15,625	0	0	135	84,375
Basitrasin	0	0	26	16,25	134	83,75
Optokin	160	100	0	0	0	0
Batrim	0	0	26	16,25	134	83,75
Enrofloksasin	0	0	0	0	160	100
Florfenikol	0	0	0	0	160	100
Streptomisin	36	22,5	0	0	124	77,5
Neomisin	160	100	0	0	0	0
Klindamisin	125	78,125	20	12,5	15	9,375
Ofloksasin	126	78,75	0	0	34	21,25
Vankomisin	160	100	0	0	0	0
Tobramisin	0	0	34	21,25	126	78,75
Sefoksitin	160	100	0	0	0	0
Nalidiksik Asit	160	100	0	0	0	0
Netilmisin	0	0	34	21,25	126	78,75
Aztreonam	160	100	0	0	0	0
Linkomisin	160	100	0	0	0	0
Trimetoprim	160	100	0	0	0	0

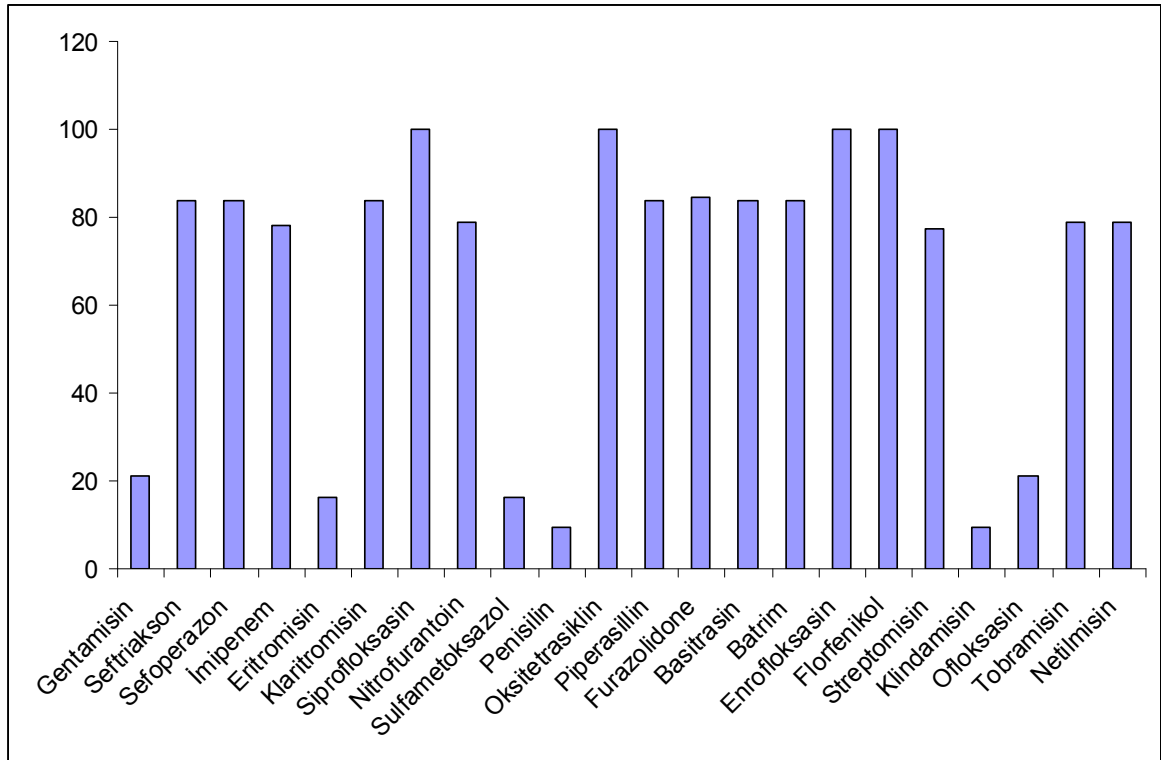
F. psychrophilum suşlarının direnç (Şekil 4.21), orta derecede duyarlılık (Şekil 4.22) ve duyarlılık (Şekil 4.23) yüzde oranı grafiklerle ifade edilmiştir.



Şekil 4.21. *F. psychrophilum* suşlarının antibakteriyellere olan dirençlilik yüzde oranları.



Şekil 4.22. *F. psychrophilum* suşlarının antibakteriyellere karşı orta derecede duyarlılık yüzde oranları.



Şekil 4.23. *F. psychrophilum* suşlarının antibakteriyellere karşı duyarlılık yüzde oranları.

4.11. İşletmelerde Kullanılan Suyun Sıcaklığı, Çözünmüş Oksijeni, pH, Organik Madde Miktarları ve *Flavobacterium psychrophilum* Sayıları

Keban'daki 4 alabalık yavru üretim işletmesinin su değerleri ayrı ayrı incelendi. Buna göre I nolu işletmede; su sıcaklığının 9–14,5°C, suyun oksijeninin 6–9,6 mg/l, suyun pH'sının 6,4–8 ve suyun organik madde miktarlarının 3,2–8,4 mg/l arasında değiştiği görüldü.

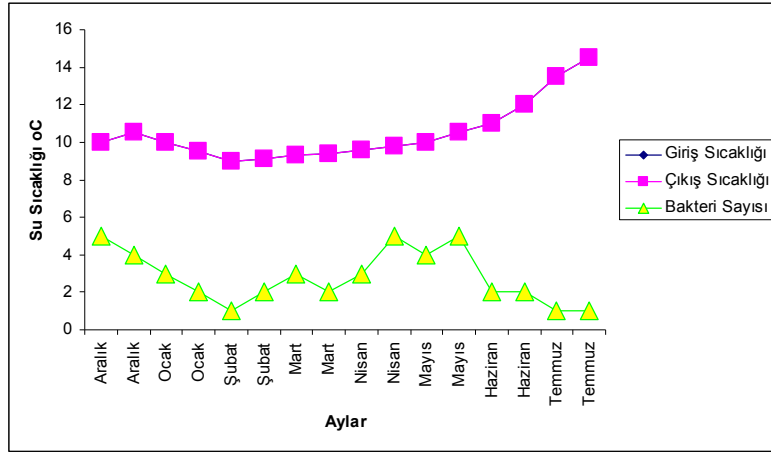
İşletmedeki suların *F. psychrophilum* yönüyle yapılan bakteriyolojik incelemesinde; Aralık ayında 9 adet, Ocak'da 5 adet, Şubat'da 3 adet, Mart'da 5 adet, Nisan'da 8 adet, Mayıs'da 9 adet, Haziran'da 4 adet ve Temmuz'da ise 2 adet olmak üzere 45 adet *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.9).

İstatistik değerlendirmeye göre; su sıcaklığı ile bakteri sayısı arasında negatif yönde bir ilişki bulundu ($r=-0,369$, $P<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısının azaldığı görüldü. Ancak suyun O₂, pH düzeyi ve organik madde miktarları arasında herhangi bir anlamlı ilişki ($r=-0,150$, $r=-0,084$, $r=-0,027$, $P>0,05$) bulunamadı. I nolu işletmede su parametrelerinin bakteri sayısı ile olan ilişkisini belirten grafikler çizildi (Şekil 4.24;4.25;4.36;4.27).

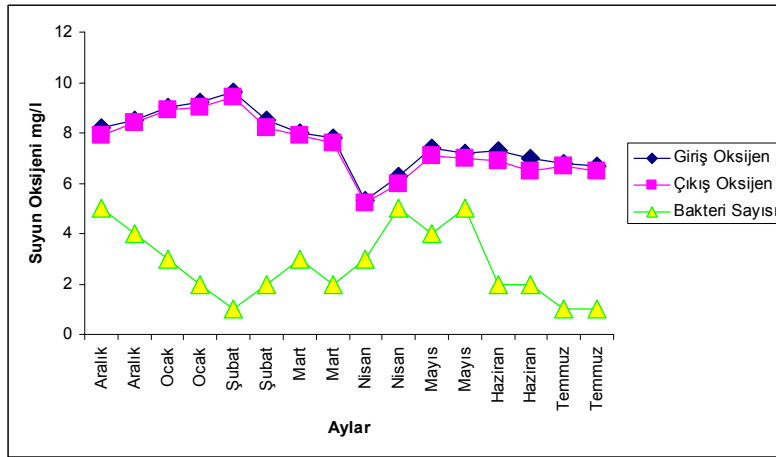
Tablo 4.9. I nolu işletmenin su parametreleri.

Su Parametreleri ve Bakteri Sayısı	Su Örneğinin Alındığı Aylar															
	Aralık	Aralık	Ocak	Ocak	Şubat	Şubat	Mart	Mart	Nisan	Nisan	Mayıs	Mayıs	Haziran	Haziran	Temmuz	Temmuz
Giriş Sıcaklığı	10	10,5	10	9,5	9	9,1	9,3	9,4	9,6	9,8	10	10,5	11	12	13,5	14,5
Çıkış Sıcaklığı	10	10,5	10	9,5	9	9,1	9,3	9,4	9,6	9,8	10	10,5	11	12	13,5	14,5
Giriş Oksijen	8,2	8,5	9	9,2	9,6	8,5	8	7,8	5,3	6,3	7,4	7,2	7,3	7	6,8	6,7
Çıkış Oksijen	7,9	8,4	8,9	9	9,4	8,2	7,9	7,6	5,2	6	7,1	7	6,9	6,5	6,7	6,5
Giriş pH	8	8,2	7,8	7,6	7,5	7,4	7,2	7,3	6,5	6,7	7,3	7,4	7,3	7,6	7,5	7,8
Çıkış pH	7,8	8,0	7,5	7,5	7,2	7,2	7,0	7,2	6,4	6,5	7,2	7,2	7	7,4	7,4	7,6
Giriş Organik Madde	4,8	3,2	5,4	5,7	6	6,3	8,2	7,8	7,4	7,0	6,3	6,1	5,7	4,4	5,0	6,0
Çıkış Organik Madde	5	3,5	5,8	6,2	6,5	6,7	8,4	8	7,9	7,4	6,6	6,5	6,3	4,8	5,5	6,2
Bakteri Sayısı	5	4	3	2	1	2	3	2	3	5	4	5	2	2	1	1

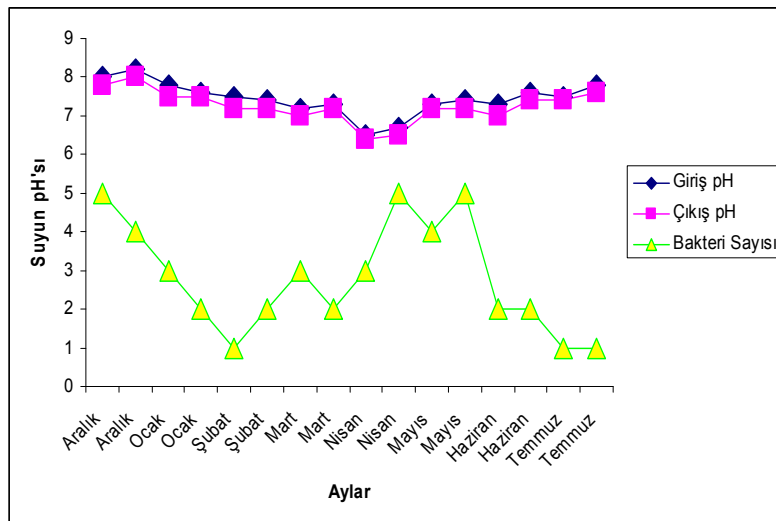
* I nolu işletmede, su sıcaklığı ile bakteri sayısı arasında negatif yönde bir ilişki bulunmuştur ($r=-0,369$, $P<0,05$). Sıcaklık artıkça bakteri sayısı azalmıştır. Ancak suyun O_2 , pH düzeyi ve organik madde miktarları arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamıştır ($r=-0,150$, $r=-0,084$, $r=-0,027$, $P>0,05$).



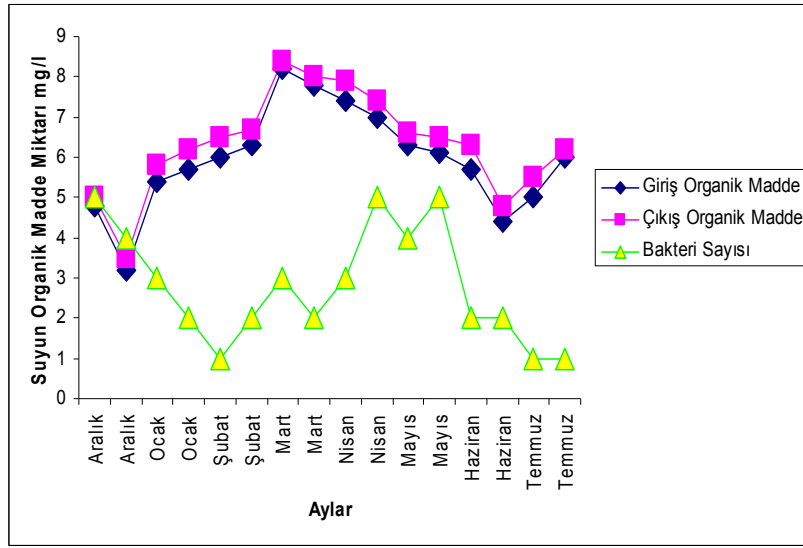
Şekil 4.24. I nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.25. I nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen miktarlarının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.26. I nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.27. I nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarlarının dağılımı.

II nolu işletmede; su sıcaklığının 7–11,5°C, suyun oksijeninin 8–10,5 mg/l, suyun pH'sının 6,5–7,9 ve suyun organik madde miktarlarının 3,2–8,4 mg/l arasında değiştiği görüldü.

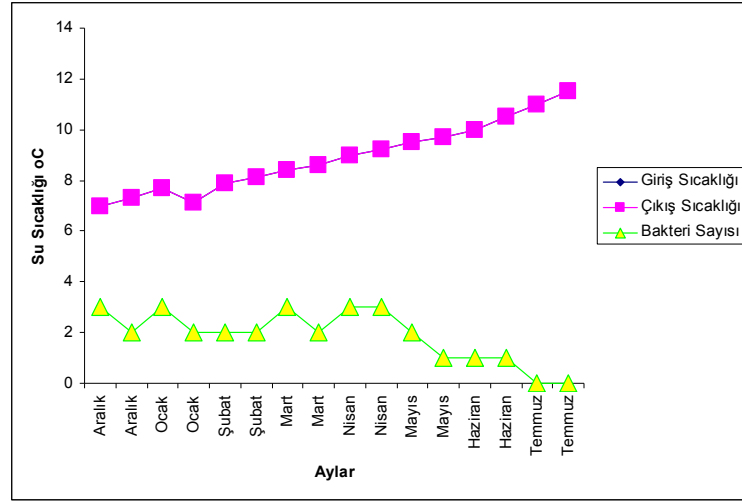
İşletmedeki suların *F. psychrophilum* yönüyle yapılan bakteriyolojik incelemesinde; Aralık ayında 5 adet, Ocak'da 5 adet, Şubat'da 4 adet, Mart'da 5 adet, Nisan'da 6 adet, Mayıs'da 3 adet ve Haziran'da ise 2 adet olmak üzere 30 adet *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.10).

İstatistik değerlendirmeye göre su sıcaklık ve pH ile bakteri sayısı arasında çok kuvvetli bir ilişki bulundu ($r=-0,754$, $r=0,713$ $p<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısı azaldığı görüldü. pH arttıkça bakteri sayısı arttı. Ayrıca O_2 ve organik madde miktarı ile bakteri sayısı arasında kuvvetli ilişki vardır ($r=0,575$, $r=0,546$ $p<0,05$). Sudaki O_2 ve organik madde miktarı arttıkça bakteri sayısı arttı. II nolu işletmede su parametrelerinin bakteri sayısı ile olan ilişkisini belirten grafikler çizildi (Şekil 4.28;4.29;4.30;4.31).

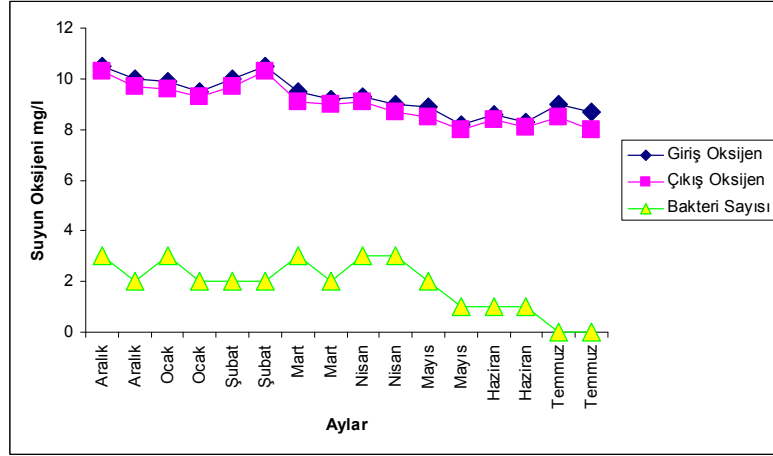
Tablo 4.10. II nolu işletmenin su parametreleri.

Su Parametreleri ve Bakteri Sayısı	Su Örneğinin Alındığı Aylar															
	Aralık	Aralık	Ocak	Ocak	Şubat	Şubat	Mart	Mart	Nisan	Nisan	Mayıs	Mayıs	Haziran	Haziran	Temmuz	Temmuz
Giriş Sıcaklığı	7	7,3	7,7	7,1	7,9	8,1	8,4	8,6	9	9,2	9,5	9,7	10	10,5	11	11,5
Çıkış Sıcaklığı	7	7,3	7,7	7,1	7,9	8,1	8,4	8,6	9	9,2	9,5	9,7	10	10,5	11	11,5
Giriş Oksijen	10,5	10	9,9	9,5	10	10,5	9,5	9,2	9,3	9	8,9	8,2	8,6	8,3	9	8,7
Çıkış Oksijen	10,3	9,7	9,6	9,3	9,7	10,3	9,1	9	9,1	8,7	8,5	8,0	8,4	8,1	8,5	8
Giriş pH	7,7	7,5	7,3	7,8	7,3	7,5	7,4	7,6	7,5	7,9	7,6	7,4	7,5	7,2	6,9	6,6
Çıkış pH	7,4	7,3	7,1	7,6	7,0	7,2	7,3	7,2	7,3	7,5	7,3	7,3	7,2	7,0	6,5	6,5
Giriş Organik Madde	4,5	5,2	6,8	7,3	8,1	8,6	9,5	9,2	8,2	7,7	7	6,7	5,5	5	4,5	5
Çıkış Organik Madde	5	5,7	7,2	7,7	8,4	9	9,9	9,5	8,6	7,8	7,5	6,9	5,9	5,3	4,8	5,3
Bakteri Sayısı	3	2	3	2	2	2	3	2	3	3	2	1	1	1	0	0

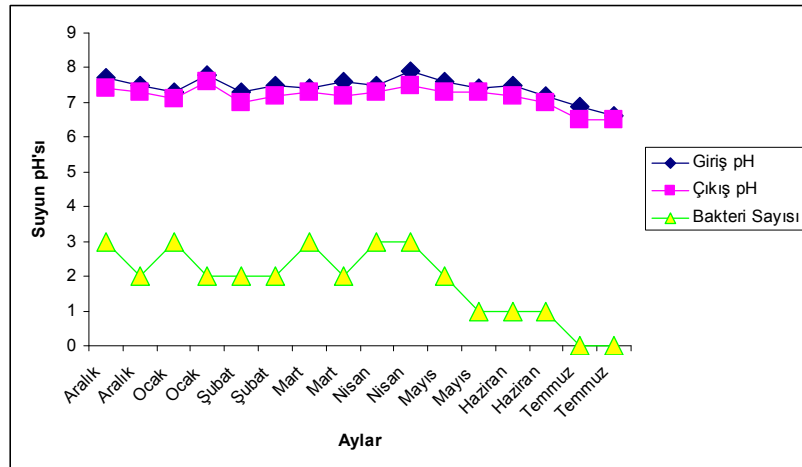
* II nolu işletmede, sıcaklık ve pH ile bakteri sayısı arasında çok kuvvetli bir ilişki bulunmuştur ($r=-0,754$, $r=0,713$ $p<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısı azalmıştır. pH arttıkça bakteri sayısı artmıştır. Ayrıca O_2 ve organik madde miktarı ile bakteri sayısı arasında kuvvetli ilişki vardır ($r=0,575$, $r=0,546$ $p<0,05$). Sudaki O_2 ve organik madde miktarı arttıkça bakteri sayısı artmıştır.



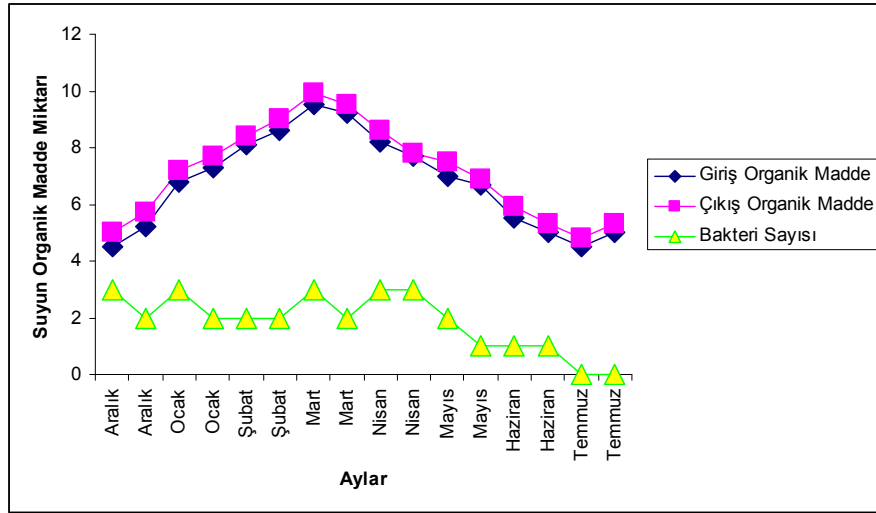
Şekil 4.28. II nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.29. II nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen miktarlarının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.30. II nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.31. II nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarlarının dağılımı.

III nolu işletmede; su sıcaklığının 7–13°C, suyun oksijeninin 8,4–13,8 mg/l, suyun pH'sının 6,5–8,9 ve suyun organik madde miktarlarının 3,6–8,5 mg/l arasında değiştiği görüldü.

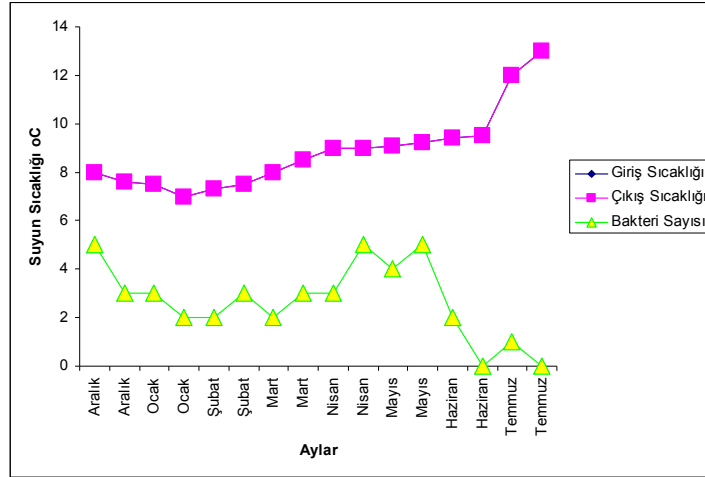
İşletmedeki suların *F. psychrophilum* yönüyle yapılan bakteriyolojik incelemesinde; Aralık ayında 8 adet, Ocak'da 5 adet, Şubat'da 5 adet, Mart'da 5 adet, Nisan'da 8 adet, Mayıs'da 9 adet, Haziran'da 2 adet ve Temmuz'da ise 1 adet olmak üzere 43 adet *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.11).

İstatistik değerlendirmeye göre; su sıcaklığı ve suyun oksijeni ile bakteri sayısı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur ($r=-0,447$ $r=0,530$ $p<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısı azaldı. Suyun oksijeni arttıkça bakteri sayısı arttı. Ancak pH düzeyi ve organik madde miktarları arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamıştır ($r=-0,003$, $r=0,027$, $P>0,05$). III nolu işletmede su parametrelerinin bakteri sayısı ile ilişkisini belirten grafikler çizildi (Şekil 4.32;4.33;4.34;4.35).

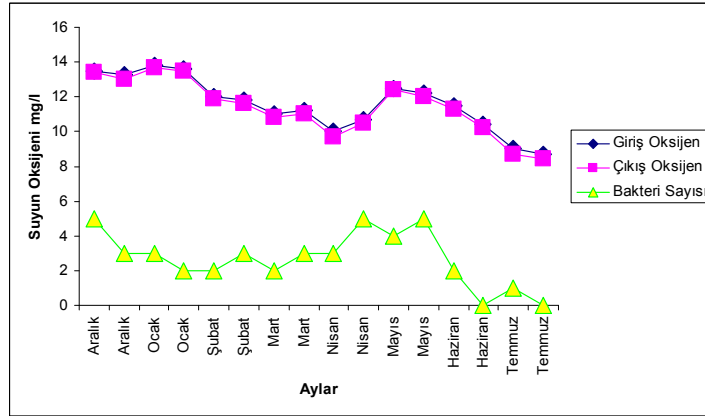
Tablo 4.11. III nolu işletmenin su parametreleri.

Su Parametreleri ve Bakteri Sayısı	Su Örneğinin Alındığı Aylar															
	Aralık	Aralık	Ocak	Ocak	Şubat	Şubat	Mart	Mart	Nisan	Nisan	Mayıs	Mayıs	Haziran	Haziran	Temmuz	Temmuz
Giriş Sıcaklığı	8	7,6	7,5	7	7,3	7,5	8	8,5	9	9	9,1	9,2	9,4	9,5	12	13
Çıkış Sıcaklığı	8	7,6	7,5	7	7,3	7,5	8	8,5	9	9	9,1	9,2	9,4	9,5	12	13
Giriş Oksijen	13,5	13,3	13,8	13,6	12	11,8	11	11,2	10	10,7	12,5	12,2	11,5	10,4	9	8,7
Çıkış Oksijen	13,4	13	13,7	13,5	11,9	11,6	10,8	11	9,7	10,5	12,4	12	11,3	10,2	8,7	8,4
Giriş pH	8,5	8,6	8,9	8,8	8,5	8,3	8,0	7,5	7,2	7,2	7,0	7,2	7,3	7,2	7,5	7,6
Çıkış pH	8,3	8,5	8,5	8,6	8,2	8,0	7,5	7,1	6,9	6,8	6,5	6,9	7,2	7,0	7,2	7,3
Giriş Organik madde	5,5	5	3,6	3,8	4	4,6	6	6,2	8,4	7,5	7,9	8,0	8,4	8,0	6,5	7
Çıkış Organik madde	6	5,6	4	4,3	4,3	5	6,7	6,9	8,3	7,7	8,3	8,5	9	8,5	7	7,3
Bakteri Sayısı	5	3	3	2	2	3	2	3	3	5	4	5	2	0	1	0

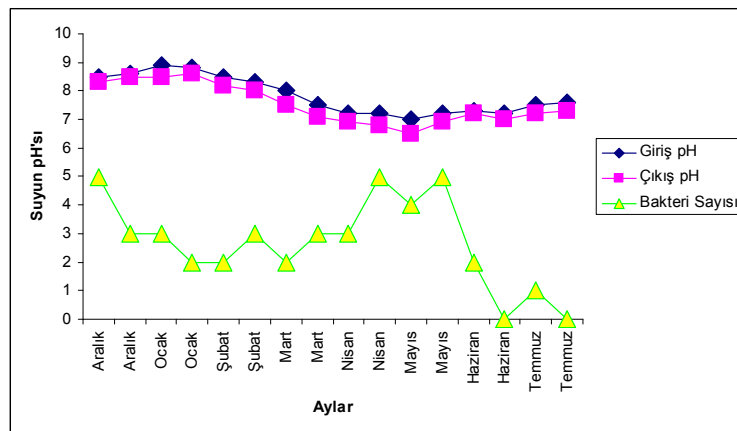
* III nolu işletmede, su sıcaklığı ve suyun oksijeni ile bakteri sayısı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur ($r=-0,447$ $r=0,530$ $p<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısı azalmıştır. Suyun oksijeni arttıkça bakteri sayısı artmıştır. Ancak pH düzeyi ve organik madde miktarları arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamıştır ($r=-0,003$, $r=0,027$, $P>0,05$).



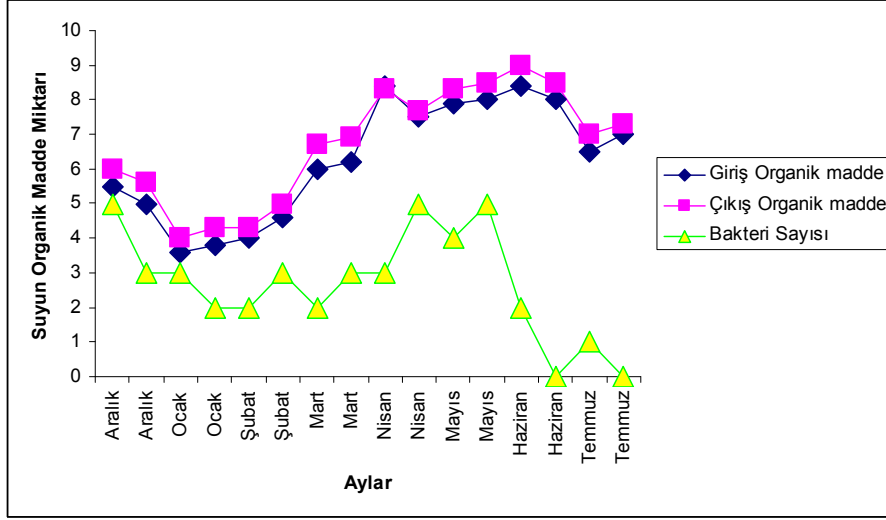
Şekil 4.32. III nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.33. III nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen miktarlarının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.34. III nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.35. III nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarının dağılımı.

IV nolu işletmede; su sıcaklığının 7–13°C, suyun oksijeninin 7,2–12,5 mg/l, suyun pH'sının 7–8,5 ve suyun organik madde miktarlarının 5,1–12,7 mg/l arasında değiştiği görüldü.

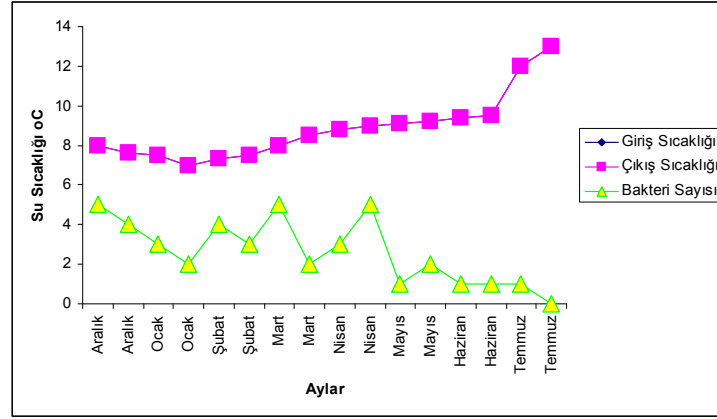
İşletmedeki suların *F. psychrophilum* yönüyle yapılan bakteriyolojik incelemesinde; Aralık ayında 9 adet, Ocak'da 5 adet, Şubat'da 7 adet, Mart'da 7 adet, Nisan'da 8 adet, Mayıs'da 3 adet, Haziran'da 2 adet ve Temmuz'da ise 1 adet olmak üzere 45 adet *F. psychrophilum* izole edildi (Tablo 4.12).

İstatistik değerlendirmeye göre su sıcaklığı ve suyun organik madde miktarı ile bakteri sayısı arasında kuvvetli bir ilişki bulundu ($r=-0,641$, $r=0,597$ $p<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısı azaldı. Suyun organik madde miktarı arttıkça bakteri sayısı arttı. Ayrıca suyun O_2 ve suyun pH ile bakteri sayısı arasında zayıf ilişki vardır ($r=0,258$, $r=0,323$ $p<0,05$). Sudaki O_2 ve pH miktarı arttıkça bakteri sayısı arttı. IV nolu işletmede su parametrelerinin bakteri sayısıylanan ilişkisi belirten grafikler çizildi (Şekil 4.36;4.37;4.38;4.39).

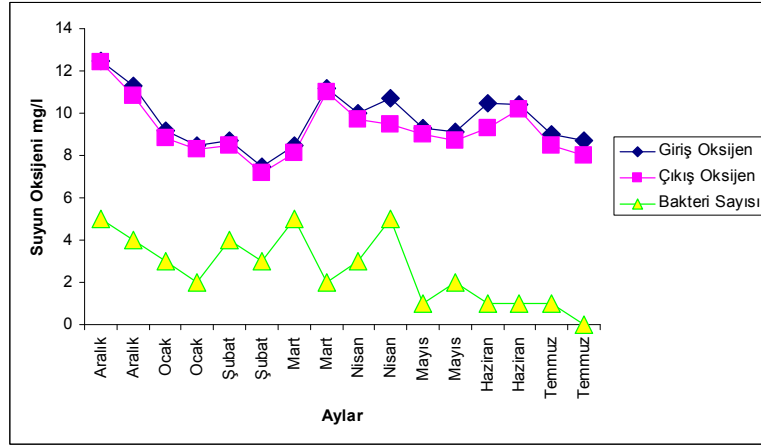
Tablo 4.12. VI nolu işletmenin su parametreleri

Su Parametreleri ve Bakteri Sayısı	Su Örneğinin Alındığı Ayalar															
	Aralık	Aralık	Ocak	Ocak	Şubat	Şubat	Mart	Mart	Nisan	Nisan	Mayıs	Mayıs	Haziran	Haziran	Temmuz	Temmuz
Giriş Sıcaklığı	8	7,6	7,5	7	7,3	7,5	8	8,5	8,8	9	9,1	9,2	9,4	9,5	12	13
Çıkış Sıcaklığı	8	7,6	7,5	7	7,3	7,5	8	8,5	8,8	9	9,1	9,2	9,4	9,5	12	13
Giriş Oksijen	12,5	11,3	9,2	8,5	8,7	7,5	8,5	11,2	10	10,7	9,3	9,1	10,5	10,4	9	8,7
Çıkış Oksijen	12,4	10,8	8,8	8,3	8,5	7,2	8,1	11	9,7	9,5	9,0	8,7	9,3	10,2	8,5	8,0
Giriş pH	8,5	8,6	7,9	8,8	8,5	8,3	8,2	7,5	7,2	7,4	7,3	7,4	8,0	8,2	7,7	7,6
Çıkış pH	8,2	8,4	7,7	8,5	8,2	8,0	7,8	7,2	7,0	7,1	7,0	7,2	7,8	8,0	7,5	7,3
Giriş Organik madde	8,0	8,8	10	11,2	12,1	12,4	11,5	11,2	10,6	9,3	6,7	6,3	5,5	5,1	6	6,3
Çıkış Organik madde	8,5	9,2	10,5	11,6	12,7	12,6	12	11,8	11	10	7,1	6,9	5,9	5,4	6,5	7
Bakteri Sayısı	5	4	3	2	4	3	5	2	3	5	1	2	1	1	1	0

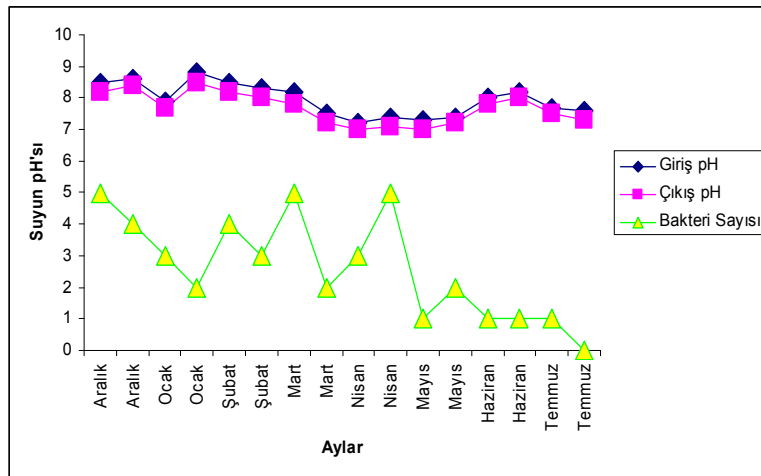
* IV nolu işletmede, su sıcaklığı ve suyun organik madde miktarı ile bakteri sayısı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur ($r=-0,641$, $r=0,597$ $p<0,05$). Sıcaklık arttıkça bakteri sayısı azalmıştır. suyun organik madde miktarı arttıkça bakteri sayısı artmıştır. Ayrıca suyun O_2 ve suyun pH ile bakteri sayısı arasında zayıf ilişki vardır ($r=0,258$, $r=0,323$ $p<0,05$). Sudaki O_2 ve pH miktarı arttıkça bakteri sayısı artmıştır.



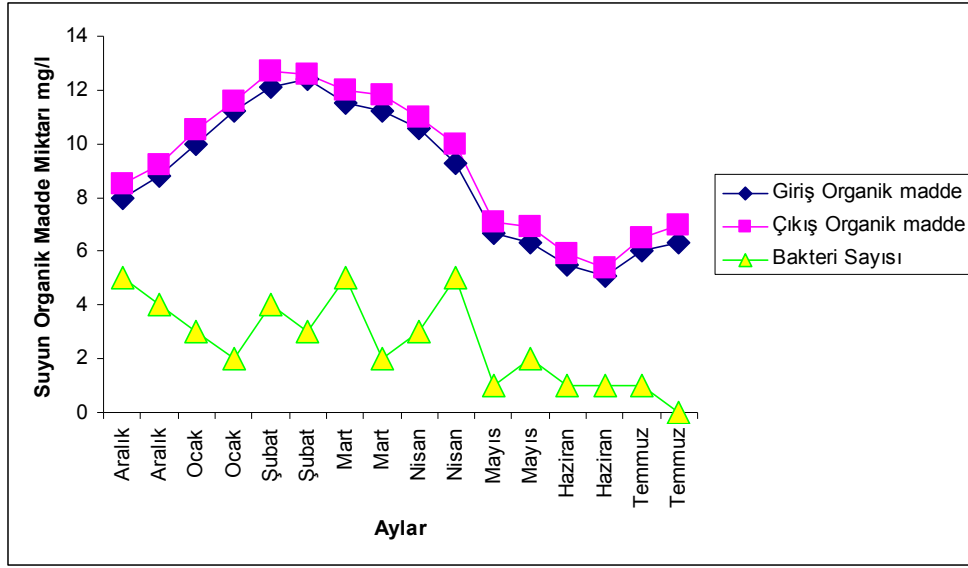
Şekil 4.36. IV nolu alabalık işletmesinde su sıcaklığının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.37. IV nolu alabalık işletmesinde suyun oksijen oranlarının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.38. IV nolu alabalık işletmesinde suyun pH'sının aylara göre dağılımı.



Şekil 4.39. IV nolu alabalık işletmesinde suyun organik madde miktarının dağılımı.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu araştırmada; öncelikli olarak Elazığ ili Keban ilçesinde bulunan dört farklı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesindeki sağlıklı ve hastalıktan şüpheli yavru alabalıklardan *F. psychrophilum*'un bilinen klasik kültür yöntemiyle izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniği ile moleküler teşhisi yapılan *F. psychrophilum*'un moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilen Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE-Değişken Alanlı Jel Elektroforezi) tekniği ile tiplendirilmesi yapıldı ve izolatların yurt dışından getirtilen *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suş ile akrabalık ilişkisi belirlendi. Sonuçta *F. psychrophilum*'un fenotipik ve genotipik özellikleri ortaya çıkarıldı.

Schmidt vd., (2000); çalışmalarında balık örneklerini stomacher'da homojenize ederek bakteriyolojik ekim için hazırladıkları bildirmişlerdir. Yine diğer bir araştırmada (Yıldırım, 2007) ise balık materyali porselen havanda ezilerek bakteriyolojik ekimde kullanılmıştır. Daha steril olması ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı bu araştırmada da stomacher homojenizatörü tercih edildi. Buna göre araştırmanın yapıldığı dört işletmeden 8 ay boyunca alınan toplam 1835 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru, 5 gramdan küçük yavru ve yem örnekleri stomacher'da başarılı bir şekilde homojen edilerek bakteriyolojik ekimde kullanıldı.

F. psychrophilum'un izolasyonunda spesifik besiyerleri olarak; Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (CB) (Wiklund vd., 1994; Evensen ve Lorenzen 1996; Daskalov vd., 1999; Dalgaard, 2001; Shotts ve Starliper, 2003); Modifiye edilmiş Anacker ve Ordal Agar (MAOA), Modifiye edilmiş Anacker ve Ordal Broth (MAOAB) (Lehmann vd., 1991; Austin ve Austin, 1987; Bernardet ve Grimont, 1989; Lorenzen ve Olesen, 1997; Austin, 1992); Tryptone Yeast Extract Salt Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Extract Salt Broth (TYES-B) (Ekman, 2003; Stenholm vd., 2008; Holt vd., 1993; Holt, 1987); Zenginleştirilmiş Anacker ve Ordal + Sığır Fetüs Serum+ Agar (EAO+FBS+A), Zenginleştirilmiş Anacker ve Ordal + Sığır Fetüs Serum+ Broth (EAO+FBS+ B) (Starliper vd., 2007); Tryptone Yeast Extract Salt Agar+ Tobramycin (TYESA+ T) (Kumagai vd., 2004) ve Tryptone Yeast Extract Sığır Fetüs Serum (TYFBS) Agar (Toshio vd., 2006) kullanılmıştır. Bu araştırmacıların bakteri ekimlerini yaptıkları bütün bu besiyerleri Keban'daki alabalık işletmelerinden *F. psychrophilum* etkenini izole etmek için

kullanıldı. Bütün bu besiyerlerinde üremeler meydana geldi. Ancak bu besiyerleri içinde EAO+FBS+A ve TYFBS agarda diğer spesifik besiyerlerine göre daha yoğun üremeler görüldü. Buna karşılık; sığır fetüs serumu katılmaksızın hazırlanan EAO (Zenginleştirilmiş Anacker ve Ordal) ve TY (Tryptone Yeast Extract) agarda koloni üremelerinin az olduğu tespit edildi. Dolayısıyla EAO+FBS+A ve TYFBS agarlarında görülen yoğun bakteri üremesinin Sığır Fetüs Serumuyla ilişkili olabileceği şeklinde yorumlandı.

Sander ve Fryer (1988), Bernardet ve Kerouault (1989), Crump vd., (2001) Wiklund vd., (1994), Lorenzen vd., (1997), Bowser (1999), Dalsgaard ve Madsen (2000), Korun ve Timur (2001), Nematollahi vd., (2003), Diler vd., (2003), İspir vd., (2004) ve Cipriano ve Holt (2005); çalışmalarında *F. psychrophilum*'u izole etmek için ekim yaptıkları Cytophaga Agar (CA), Modifiye edilmiş Anacker ve Ordal Agar (MAOA) ve Tryptone Yeast Extract Salt Agar (TYES-A) besiyerlerini 15-20°C'de 3-7 gün süreyle inkube etmişlerdir. Bu besiyerlerinde ortası kabarık, konveks ve ince yayılan kenarlara sahip, yuvarlak, sarı renkli koloniler ürettiği gibi, düzgün kenarlı, yuvarlak, koloniler de oluştuğunu ve bu kolonilerden yapılan boyalı preparatlarda 1,20-1,30 µm uzunluğunda Gram negatif çomak biçimli ve kayarak hareket eden bakterilerin varlığını belirlemişlerdir. Keban ilçesindeki alabalık işletmelerinden izole edilen 160 adet *F. psychrophilum*'un koloni yapısı ve etken özellikleriyle ilgili araştırmacıların belirttiği bulgulara rastlandı.

Yapılan araştırmalarda (Wiklund vd., 1994; Lorenzen vd., 1997; Madetoja vd., 2001; Cipriano ve Holt 2005; Ekman 2003) izole edilen *F. psychrophilum*'un oluşturduğu kolonilerin sarı renkte görüldüğü, oksidaz testinin negatif; fleksirubin tipi pigment üretme testinin oranj (portakal) renkte; jelatin ve kazein hidrolizasyon testinin pozitif; kongo kırmızısı testinin, H₂S ve karbonhidratlardan asit üretiminin negatif olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru, 5 gramdan küçük yavru, 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavrularının dalak, karaciğer, böbrek, bağırsak ve su örneklerinden izole edilen *F. psychrophilum*'un identifikasyonunda bu ayırt edici biyokimyasal testler başarılı bir şekilde uygulanıp benzer sonuçlar elde edildi.

Yapılan bazı çalışmalarda (Diler vd., 2003; Korun ve Timur 2001; Didinen vd., 2005) oksidaz testinin negatif ve bazılarında (Bernardet ve Kerouault 1989; Ostland vd., 1997; Elsayed vd., 2006) da bu testin pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada

izole edilen bütün suşların oksidaz negatif olduğu belirlendi. Bu durum *F. psychrophilum* suşları arasında fenotipik farklılıkların görülebileceği görüşünü desteklemektedir.

F. psychrophilum'un identifikasyonunda Cipriano ve Holt (2005) ile Didinen vd., (2005) O/F testinin negatif olduğunu, İspir vd., (2004) ise oksidasyon testinin negatif ve fermantasyon testinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da bazı suşlarda fermantasyon testi pozitif, bazılarında da negatif olduğu saptandı. *F. psychrophilum* referans bakteri suşunun ise O/F testinin negatif sonuç verdiği tespit edildi.

Yapılan bir çalışmada (Lorenzen vd., 1997) *F. psychrophilum*'un 25°C'de üremediği, başka bir çalışmada (Bernardet ve Kerouault 1989) yine bu etkenin 25°C'de seyrek olarak ürediği, 25°C'nin üzerinde ise üremediği ifade edilmiştir. Bu konuda Lorenzen vd., (1997) de, 25 *F. psychrophilum*'un 18'inin 25°C'de seyrek olarak ürediğini, fakat 30°C'de üremediğini, Schmidtke ve Carson (1995) ise 20 izolattan 18'inin 25°C'de seyrek olarak ürediğini fakat 30°C'de üremediğini bildirmişlerdir. Son olarak da Dalsgaard ve Madsen (2000) bu etkenin 5, 15, 20 ve 25°C'lerde ürediğini tespit etmişlerdir. Araştırmaya konu olan Keban'daki alabalık işletmelerinden izole edilen 160 adet suşun 5, 15 ve 20°C'lerde ürediği ve dolayısıyla Dalsgaard ve Madsen (2000)'in bulgularıyla kısmen benzerlik gösterdiği görüldü. Yine araştırmalardaki bu suşların 25°C ve üzeri sıcaklıklarda ise ürememesi de Lorenzen vd., (1997)'in sonuçlarıyla paralellik gösterdi.

Lorenzen vd., (1997), *F. psychrophilum*'un % 1'lik NaCl'de üremesine rağmen, % 2'lik NaCl'de üremediğini, Diler vd., (2003) de bu etkenin % 0,5'lik NaCl'de ürediğini, % 1'lik ve % 2'lik NaCl'de üremediğini, yine Nematollahi vd., (2003) ise *F. psychrophilum*'un % 0,8-1'lik ve % 2'lik NaCl'de ürediğini rapor etmişlerdir. Keban yavru alabalık üretim işletmelerinden izole edilen *F. psychrophilum* suşları ile *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşunun % 0, % 0,5 ve % 1'lik NaCl'de ürediği, % 2'lik NaCl'de ise üremediği tespit edildi. Buna göre % 2'lik ve üzeri tuzlulukta bu bakterinin üremediği sonucuna varıldı.

I nolu işletmeden 974 adet; II nolu işletmeden 1040 adet; III nolu işletmeden 1000 adet; IV nolu işletmeden 1010 adet örnek incelendi. Bu dört işletmeden alınan toplam 4024 örneğin *F. psychrophilum*'un fenotipik ve genotipik özelliklerinin incelenmesi açısından yeterli olduğu düşünülmektedir.

F. psychrophilum'un alabalık işletmelerindeki bulunma oranlarında farklılıklar tespit edildi. Şöyleki I nolu işletmeden 45 adet (% 4,62); II nolu işletmeden 30 adet (% 2,88); III nolu işletmeden 43 adet (% 4,3) IV nolu işletmeden ise 42 adet (% 4,15) *F.*

psychrophilum izole edildi. Ancak bu oranlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($P>0,05$, $F_{3,68}=1,05$).

Çevre koşullarındaki olumsuz değişimlerle balıkların hastalanmalarına yol açan bu etken, su ve balıkların ovaryum sıvısı ve sindirim sisteminin doğal florasında da bulunmaktadır (Sarıeyyüpoğlu, 1984; Austin ve Austin, 1987; Holt vd., 1993; Gonzalez vd., 1999; Cengizler, 2000; Gonzalez vd., 2001; Nematollahi vd., 2003; Hatha vd., 2005; Arda vd., 2005; Skrodenyte-Arbaciauskiene vd., 2006; Kubilay vd., 2009a; Kubilay vd., 2009b). Etkenlerin hem su ve hem de balık örneklerinde izole edilmiş olması bu konuda çalışan araştırmacıların (Sarıeyyüpoğlu, 1984; Austin ve Austin, 1987; Holt vd., 1993; Gonzalez vd., 1999; Cengizler, 2000; Gonzalez vd., 2001; Nematollahi vd., 2003; Hatha vd., 2005; Arda vd., 2005; Skrodenyte-Arbaciauskiene vd., 2006; Kubilay vd., 2009a; Kubilay vd., 2009b) sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Her dört işletmeden alınan yem örneklerinden ise *F. psychrophilum* izole edilemedi. Bu da *F. psychrophilum*'un yemlerle balıklara geçmediğini ileri sürmektedir.

Keban'daki işletmelerde gökkuşağı alabalığı anaçlarının ovaryum sıvısından *F. psychrophilum*'un izole edilmesi önceki çalışmalarla (Holt, 1987; Rangdale, vd., 1996; Madsen ve Dalsgaard, 2008; Kubilay vd., 2009a) paralellik göstermektedir. Holt (1987), Ekman vd., (1993) ve Madetoja vd., (2002), anaç balıkların *F. psychrophilum* patojeninin taşıyıcısı olduğunu belirtmişlerdir.

Rangdale vd., (1996), spermden bu bakteriyi izole edememiştir. Bu çalışma sonucunda da araştırmacının belirttiği gibi anaç erkek balıkların spermelerinden *F. psychrophilum*'un izolasyonu yapılamadı. İnceleme yapılan anaç balıklarda herhangi bir hastalık belirtisi olmaksızın *F. psychrophilum*'un izole edilmesi, Keban alabalık işletmelerindeki anaç balıkların bu etkenin taşıyıcısı olabileceğini ihtimalini doğrulamaktadır.

F. psychrophilum'un neden olduğu hastalık, balık türlerine göre farklı mortalite oranları ile seyretmektedir. Coho Salmon (*Oncorhynchus kisuch*) balıklarında bu etkenden dolayı % 50 oranında mortalite görüldümüştür (Holt, 1987). Hastalığın gökkuşağı alabalık yavrularında yem almaya başladıktan iki ay sonra meydana geldiği ve mortalitenin % 75 civarında olduğu bildirilmiştir (Lorenzen vd., 1991; Bruno, 1992.). Bu araştırmada da dört işletmede yavru balıklar yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra ölümlerin görülmesi, hastalığın yavru alabalıkların ilk aylarında ortaya çıkabileceğini doğruladı. Ancak işletmelerdeki mortalite oranlarının I nolu işletmede % 20, II nolu işletmede % 30 III nolu

işletmede % 35 ve IV nolu işletmede % 40 diğer araştırmacıların (Holt, 1987; Lorenzen vd., 1991; Bruno, 1992) bildirdiği oranlardan daha düşük olduğu görüldü. Bu durum, işletmelerin su kaliteleri arasındaki farklılıklarla hastalığın mortalitesi arasında bir ilişki olduğu ve su kalitesi iyi olan işletmelerde mortalitenin düşük seyrettiği şeklinde yorumlandı.

Yapılan bazı çalışmalarda (Austin, 1992; Bernardet ve Kerouault 1989; Bruno, 1992; Bustos vd., 1995; Lorenzen vd., 1991; Toranzo ve Barja, 1993; Wiklund vd., 1994; Didinen vd., 2005) hasta ve ölmüş balıklarda; karın boşluğunda sıvı birikimine bağlı olarak şişkinlik, ekzoftalmus, derinin renginde koyulaşma ve birkaç balığın sırt ve kaval yüzgecinde beyaz renkte lezyonların şekillendiği ve hastalığın ilerlemiş durumlarında balıklarda kaval yüzgecin tamamen tahrip olduğu ve radiusların ortaya çıktığı, karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit etmişlerdi. Araştırma yapılan alabalık işletmesinde de benzer bulgulara rastlandı.

Keban ilçesinde bulunan işletmelerde önceki yıllarda yavru gökkuşağı alabalıkları üzerinde yapılan bir çalışmada (İspir vd., 2004) *F. psychrophilum* izole edilmiştir. Farklı zaman dilimlerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla dezenfekte edilmiş yumurta, dölllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli 5 gramdan küçük yavru, 5 gramdan büyük sağlıklı, hastalıktan şüpheli veya yeni ölmüş alabalık yavruların dalak, karaciğer, böbrek, bağırsakları ve su örneklerinde *F. psychrophilum* izole edilmesi bu bölgede bulunan işletmelerde bu etkenle kontaminasyonunun devam ettiğini gösterdi.

PZR tekniğinin saf yada karışık kültürlerde bulunan az sayıdaki mikroorganizmaların bir gün gibi kısa sürede identifiye edildiği, bu nedenle de kültür ve serolojik testlere göre daha avantajlı olduğu ifade edilmiştir (Lin ve Tsen, 1996). PZR amplifikasyonunda spesifik primerin kullanılması tanıyı kolay hale getirmektedir. Bu araştırmada da *Flavobacterium* cins spesifik GYRA-FP1F ve GYRA-FP1R; *F. psychrophilum* tür spesifik PSY1 190–206 ve PSY2 1278–1262 iki farklı primer çiftinin kullanılması ile bakterilerin yanlış pozitif reaksiyon vermesi önlemiştir. Bu tekniğin bütün basamaklarında negatif kontrolle (*E.coli*) ve pozitif (*F. psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu) kontrollerin birlikte yürütülmesi ve sonuçta kontaminasyonun meydana gelmemesi, PZR tekniğinin başarılı bir şekilde uygulandığını gösterdi.

Chen vd., (2008); yaptıkları çalışmada, iki farklı bölgede, onbeş ayrı işletmede ve iki balık türünden alınan örneklerin 139'unda *F. psychrophilum* izolasyonu ve

identifikasyonu bildirilmiştir. Daha sonra bu izolatları *SacI* enzimi ile PFGE analizine tabi tutmuşlar ve oluşan bant profillerine göre gökkuşağı alabalığı izolatları arasında % 88 ve Coho salmonu izolatları arasında ise % 70 akrabalık ilişkisi bulmuşlardır. Del Cerro vd., (2010); yaptığı araştırmada beş farklı bölgede 12 ayrı işletmedeki alabalıkların karaciğer ve dalaklarında 25 adet *F. psychrophilum* izole etmiştir. Bu izolatlar 17 (*ApaI*, *BamHI*, *BglI*, *HindIII*, *KpnI*, *MluI*, *NcoI*, *NheI*, *NotI*, *PvuI*, *Sall*, *SmaI*, *SpeI*, *SphI*, *StuI*, *XbaI* ve *XhoI*) enzim ile PFGE analizine maruz bırakmış ve bu enzimlerden en iyi bant profili oluşturan *StuI* enzimini tercih etmişlerdir. PFGE analizi sonucunda oluşan bant profillerine göre izolatları arasında % 80 oranında akrabalık ilişkisi bulunmuştur. Arai vd., (2007); farklı bölgelerde üç balık türünde 81 adet *F. psychrophilum*'un izolasyon ve identifikasyonu yapmıştır. Bu izolatlar 8 (*BlnI*, *XhoI*, *HinfI*, *SmaI*, *SacII*, *KpnI* ve *HindIII*) enzim ile PFGE analizine tabi tutmuş ve bu enzimlerden en iyi bant profili veren *BlnI* ve *XhoI* enzimlerini tercih edilmiştir. PFGE analizi sonucunda oluşan bant profillerine göre izolatları arasında % 80 oranında akrabalık ilişkisi bulunmuştur. Bu çalışmada ise farklı işletmelerde izole edilen *F. psychrophilum* suşları ile referans suş arasında % 80 oranında akrabalık ilişkisi olduğu ortaya çıkarıldı. İşletmelerde izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının benzer profiller oluşturması; bu işletmelerin aynı bölgede olması ve su kaynaklarının orjininin aynı olması ile açıklanabilir. Ayrıca enzim tercihlerinin de bu sonuçların elde edilmesinde rolü olabilir.

Korun ve Timur (2001), Diler vd., (2003), İspir vd., (2004), Timur vd., (2004), Didinen vd., (2005) araştırmacılar izole ettikleri etkenlerin Amoksisillin/klavulanik asit, Ampisilin, Eritromisin ve Gentamisine ise duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise *F. psychrophilum* suşlarının Amoksisilin/Klavulanik asit, Ampisilin, Eritromisin ve Gentamisine karşı direnç gösterdiği görüldü. Bu durum ülkemizde coğrafik bölgelere göre izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının antibakteriyellere karşı duyarlılıklarının farklılık gösterebileceğini ya da izole edilen suşların antibakteriyellere direnç kazanmış olabileceğini göstermektedir.

Gökkuşağı alabalığı için ideal yetiştirme sıcaklığı 9–17°C civarındır. Larva ve yavru büyütmede arzu edilen ideal su sıcaklığı 7-13°C'dir. Alabalıklar, diğer balık türlerine oranla daha yüksek düzeyde oksijene gereksinim duymaktadırlar. Alabalık yetiştiriciliğinde kullanılacak suyun 9-10 mg/l çözünmüş oksijen içermesi arzu edilmektedir. Suyun oksijen içeriği birinci derecede suyun sıcaklığına ve bulanıklığına bağlıdır, su sıcaklığı ne kadar yükselirse oksijen bağlama yeteneği düşmektedir. Suların

asidik yapısını etkileyerek çözünmüş oksijen bağlama miktarı üzerinde etkili olan pH'nın ise 6.5-8.5 arasında olması uygundur (Emre ve Kürüm, 1998; Çelikkale, 2002; Tekelioğlu, 2005; Yılmaz, 2010). Kültür balıkçılığında kullanılacak sularda bulunması gereken organik madde miktarı 25 mg/l üstünde olmamalıdır (Türkmen ve Türkmen, 1999; Şen ve Sönmez, 2005). Kıta içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterleri (Anonim, 2004) ve AB içme suyu yönergesi (Anonim, 1998)'ne yönünden incelendiğinde, 4 işletmede kullanılan suyun ortalama sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen ve organik madde miktarları yönünden gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği için uygun değerlere sahip olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada, yurdumuzda ve dünyanın birçok ülkesinde gökkuşağı alabalıklarında hastalık oluşturan ve özellikle de yavru alabalıklarda büyük ekonomik kayıplara yol açan, Psikrofilozun etkeni olan *F. psychrophilum*'un klasik kültür yöntemi ile izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. Ancak bu etkenin izolasyonu zor ve uzun zaman almaktadır. Ayrıca izole edilen *F. psychrophilum*'un buzdolabında ve derin dondurucuda kısa bir süre için saklanabilmektedir. Bu nedenle, Bakteriyel hastalıkların teşhisinde hızlı sonuç veren moleküler bir teknik olan PZR kullanılarak, ülkemizde ilk defa moleküler olarak *F. psychrophilum*'un identifikasyonu gerçekleştirildi. Böylece kültürden üretilmiş *F. psychrophilum*'un PZR tekniği ile tanısı kısa bir sürede yapılması sonucu, zamanında uygulanacak tedavi ile balıkçılık işletmelerinde büyük ekonomik kayıpların önüne geçilecektir.

Bu çalışmada ayrıca, Pulsed Field Gel Electrophoresis tekniği ile *F. psychrophilum*'un alt tiplendirilmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Bu çalışmanın başarıya ulaşmış olması, Su Ürünleri sektöründe gelecekte bütün bölgelerimizde görülen, balık hastalık etkenlerinin epidemiyolojisine yönelik daha orijinal ve kapsamlı çalışmalara ışık tutacaktır.

Flavobacterium psychrophilum'un antibakteriyel duyarlılık test sonucuna göre Oksitetrasiklin, Florfenikol, Enrofloksasin ve Siprofloksasin gibi antibakteriyellerin Psikrofiloz enfeksiyonunda etkili olduğu ve enfeksiyonun sağaltımında öncelikli olarak bu antibakteriyellerin tercih edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

6. ÖNERİLER

Bu çalışmada *F. psychrophilum*'un kuluçkahane suyundan, yumurtadan ve larvalardan izole edilmesi, bu patojenin horizontal ve vertikal yolla bulaşabileceğini göstermektedir. Bu nedenle *F. psychrophilum*'un kontrolü için,

Psikrofiloz, genellikle su sıcaklığı düştüğü durumlarda ortaya çıktığı için su sıcaklığına dikkat edilmesi,

İşletmeye dışardan kontrolsüz ve karantinasız ve sağlık sertifikası bulunmayan ve Psikrofiloz enfeksiyonu çıkmış yerlerden hiçbir balık ve yumurta alınmaması,

Psikrofiloz enfeksiyonu çıktığında karantina için ayrı bir havuz bulundurulması,

Yumurtalara 100 ppm dozunda, % 10'luk povidin/iodin çözeltisi içerisinde 10 dakika süreyle banyo yaptırılması,

Döllenmiş yumurtalara 100 ppm dozunda, % 10'luk povidin/iodin çözeltisi içerisinde 1 saat süreyle banyo yaptırılması,

Yumurtaların 100 mg/lt hidrojen peroksit ile 10 dak. veya 200 mg/lt glutaraldehit ile 20 dak. dezenfekte edilmesi,

Kuluçkahane ekipmanının % 1-2 formalin ile 10 dak. veya % 0,5-1 klorin ile 2 dak. dezenfekte edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Anderson, D.P., 1974. Fish Immunology, T.F.H. Publications Inc. Ltd., ISBN: 0876660367 239 p.
- Anonim 2004. “Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği”, Resmi Gazete: 31.12.2004, Sayı: 25687.
- Anonim, 1980. Yem Hammadeleri ve Karma Yemlerde Bulunan Bakteri ve Mantarların Seyreltme Metodu ile Kültürel Sayımları. Tebliğ, 6 Ağustos; 17070.
- Anonim, 1997. Sular-İçme ve Kullanma Suları. Türk Standardı, TS 266.
- Anonim, 1998. “On the quality of water intended for human consumption, Council Directive 98/83/EC ”, Official Journal of the European Communities.
- Anonim, 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 5th Informational Supplement, M100-S5, Volume 14, No:16, National Committee for Clinical Laboratory Standarts, Villanova, PA.
- Anonim, 2001. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 5th Edition, Approved Standard, M2-A5, Volume 13, No:24, National Committee for Clinical Laboratory Standarts, Villanova, PA.
- Anonim, 2003. Su Ürünleri, Kanatlı Hayvan ve Etleri, Bal ve Çiğ Sütte Kalıntı İzleme Genelgesi, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın 09.06.2003 tarih ve 2003/33 sayılı genelgesi, 23397 sayılı Resmi Gazete.
- Anonim, 2010. Elazığ Tarım İl Müdürlüğü Balık işletmelerinin 2010 Kayıt Raporu.
- Arai, H., Morita, Y., Izumi, S., Katagiri, T., Kimura, H., 2007. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates derived from Japanese fish. J Fish Dis.:30(6):345–55.
- Arbeit, R.D., 1995. Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganisms, p. 190–208. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover(ed.), Manual of Clinic Microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Arbeit, R.D., Slutsky, A., Barber, T.W., Maslow, J.N., Niemczyk, S., Falkinham, J.O., 3rd, O’Connor, G.T., Von Reyn, C.F., 1993. Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. J Infect Dis. Jun;167(6):1384–1390.

- Arda, M., 1973. Balıklarda Bakteriyel, Mantar, Viral ve Ekolojik Nedenlerden İleri Gelen Hastalıklar Ve Tedavileri. A.Ü. Vet. Fak. Yayın: 300, A.Ü. Basımevi, Ankara, 234s.
- Arda, M., 1995. Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler), Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar Ankara, No:3.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji; "Genişletilmiş İkinci Baskı.. Medisan Yayın Serisi no 46. Ankara".
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M., 2005. Balık Hastalıkları Medisan Yayın serisi: 61, II. Baskı Ankara 230s.
- Arı, Ş., 1999. DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) İle Çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, ed.: Temizkan, G, Arda, M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEEM); Yayın No: 1, İstanbul, 57-68.
- Arman, D., 1998. Etkene Göre Antibiyotik Seçimi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu (ADTS) Çalışma Grubu, Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı kitabında, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 33, İstanbul,: 9s.
- Austin, B and Austin, D.A., 1987. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Ltd. Chichester, 363s.
- Austin, B., 1992. The recovery of *Cytophaga psychrophila* from Two Cases of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Fry Syndrome in the U.K. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 12: 207–208.
- Baker, C.N., Stocker, S.A., Culver, D.M., 1991. Comparison of E-test to agar dilution, broth microdilution and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. J Clin Microbiol;29:533–538.
- Baliarda, A., Faure, D. and Urdaci, M.C., 2002. Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. J. Appl. Microbiol. 92: 510–516.
- Balta, F., 1997. Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu Eğirdir/İsparta, 641–648.

- Baranson, E., 1995. Rainbow trout fry syndrome. *Fish Vet. J.* 1: 1–7.
- Bauer, AU., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Track M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method, *Journal Clinical Pathology*, 45: 493–494.
- Bej, A.K., Mahbubani M.H., Atlas, R.M., 1991. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PZR) and Other Method and Their Amplications. *Critical Reviews in Biochemistry and molecular Biology*, 26, 301–334.
- Bernardet, J. and Grimont, P.A.D., 1989. Deoxribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. Nov., Nom., Rew., *Flexibacter psychrophilus* sp. Nov., Nom., rew., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumaru 1986. *International Journal of Sistematic Bacteriology*, 39:346-354.
- Bernardet, J.F., 1997. Immunization with bacterial antigens *Flavobacterium* and *Flexibacter* infection. *Developments in Biological Standardization* 90: 179 – 188.
- Bernardet, J.F., Baudin-Laurencin, F. and Tixerant, G., 1988. First identification of “*Cytophaga psychrophila*” in France. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 8: 104 – 105.
- Bernardet, J.F. and Keroualt, B., 1989. Phenotypic and Genomic Studies of “*Cytophaga psychrophila*”, Isolated from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbial.* Vol. 55, No: 7, 1796–1800.
- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K. and Vandamme, P., 1996. Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flavobacterium hydatidis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978) *International Journal Of Systematic Bacteriology*, Jan. 128–148.
- Bertolini, J.M., Wakabayashi, H., Wattral, V.G., Whipple, M.J. and Rohovec, J.S., 1994. Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *J. Aquat. Anim. Hlth.* 6: 224–223.

- Bilgehan, H., 1995. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 2. Baskı, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, Ankara. s: 641–705.
- Björklund, H., Bindestam, J., Bylund, G., 1990. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms, *Aquaculture*, 86: 359–367.
- Bowser, P.R., 1999. “Diseases of Fish”, PhD, Aquatic Animal Health Program, Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Medicine Cornell University, Ithaca, New York, 26 p.
- Branson E.J., 1998. Rainbow trout fry syndrome: an uptade, *Fish Veterinary Journal*, 2: 63-66.
- Branson, E.J., 1995. Rainbow trout fry syndrome. *Fish Vet. J.* 1: 1–7.
- Brown, L.L., Cox, W.T. and Levine, R.P., 1997. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* 29: 213–218.
- Bruno, D.W., 1992. “*Cytophaga psychrophila*, (*Flexibacter psychrophilus*)(Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) in the UK ”, *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12(6):215-216.
- Bruun, M. S., Schmidt, A. S., Madsen, I. and Dalsgaard, I., 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*. 187: 201–212.
- Buckley, R., Clough, E., Warken, W., Wild, C., 1998. Coliform Bacteria in Streambed Sediments in a Subtropical Rainforest Conservation Reserve. *Wat.Res.*, 32(6), 1852-1856.
- Bustos, P., Calbuyahue, A., Maontaña, J., Opazo, B., Entrala, P. and Solervicens, R., 1995. First isolation of *Flavobacterium psychrophilum* as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) in Chile. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15: 162–164.
- CDC, 2010. One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* Serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Erişim: (http://www.cdc.gov/PULSENET/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf). Erişim tarihi: 28.06.2010.

- Cengizler, İ., 2000. Balık Hastalıkları Ders Kitabı. Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 7, 136s.
- Chen, Y.C., Davis, M.A., Lapatra, S.E., Cain, K.D., Snekvik, K.R., Call, D.R., 2008. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* recovered from commercially raised rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and spawning coho salmon, *O. kisutch* (Walbaum) J Fish Dis. :31(10):765-73.
- Cipriano, R.C. and Holt R.A., 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, Cause of Bacterial Cold- Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No:86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV. 44s.
- Coote, U.G., 1990. Amplification of Nucleic Acids by the Polymerase Chain Reaction. Article, 57-59.
- Cowan, S. T., 1974. "Manual for the Identification of Medical Bacteria", University Printing House, Cambridge, 238 p.
- Craig, W.A., 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. Clin Infect Dis;26:1
- Crump, E.M., Perry, M.B., Clouthier, S.C., Kay, W.W., 2001. Antigenic Characterization of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*, Applied and environmental microbiology, 67, 750-759.
- Çağırğan, H., Tanrıkul, T.T. and Balta, F., 1997. Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eighth International conference diseases of fish and shellfish 14-19 sep. 1997 Edinburg scotland European Association of fish pathologists.
- Çelikkale, M.S., 1994. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Yayın No: 3, Trabzon.419 s.
- Çetinkaya, B., 1998. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Temel Prensipler. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 12, 149–156.
- Çolak, A., 1982. Balık Hastalıkları Elkitabı. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, No:1, Esnaf matbaası, Sivas, 138s.
- Dalsgaard, I. and Madsen, L., 2000. Bacterial pathogens in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. J. Fish Dis. 23: 199–209.

- Dalsgaard, I. 2001. Seletion of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria, *Aquaculture*, 196: 267-275.
- Dalsgaard, I., 1993, Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga-like bacteria pathogenic for fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* 3: 127–144.
- Daskalov, H., Austin, D.A., Austin B., 1999. An improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Letters in Applied Microbiology* 28: 297–299.
- Del Cerro, A., Márquez I., Prieto J.M., 2010. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cultured rainbow trout, *Onchorynchus mykiss* (Walbaum), in Spain. *J Fish Dis.* :33(4):285–91.
- Delen, D., 2007. Deneysel olarak enfekte edilen gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda *Flavobacterium psychrophilum*’un floresan antikor teknikleri ile saptanması üzerine bir araştırma. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi. 56s.
- Derbentli Ş., 2002. Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler yöntemlerin yeri. Ağaçfıdan A, Badur S, Türkoğlu S (Editörler). İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler’inde. İstanbul: Türk mikrobiyoloji cemiyeti yayın; 6–13.
- Didinen, B.I., Diler, Ö., Ekici, S., Altun, S., 2005. *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının teşhisinde API ZYM kullanımı ve ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1 (2): 64-70.
- Diler, Ö., Altun, S., Çalikuşu, F., Diler, A., 2000. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nin yaşadığı ortam ile ilişkili kalitatif ve kantitatif bakteriyel florası üzerine bir araştırma. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 24: 251–259
- Diler, Ö., Altun, S., Işıklı, B.I., 2003. Kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*’un fenotipik karakterleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7.1, 1–8.
- Domig, J.K., Mayer, HK., Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.2. Pheno- and

- genotypic criteria. International Journal of Food Microbiology.; 88 :165–188.
- Durmaz, R., Otlu, B., Çalışkan, A., Gürsoy, N., 2007. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılabilecek Kısa süreli “Pulsed-Field Gel” Elektroforez (PFGE) protokolü. ANKEM Dergisi; 21(2):113–117
- Eiler, A., Bertilsson, S., 2007. Flavobacteria Blooms in Four Eutrophic Lakes: Linking Population Dynamics of Freshwater Bacterioplankton to Resource Availability. Appl Environ Microbiol. 73: 3511–3518.
- Ekman, E., 2003. Natural and experimental Infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish. Swedish University of agricultural sciences, Doctoral thesis, 47s.
- Ekman, E., Börjeson, H., Johansson, N., 1993. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. Dis Aquat Org, 37, 159-163.
- Elsayed, E.E., Eissa, A.E., Faisal, M., 2006. Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from sea lamprey, *Petromyzon marinus* L., with skin lesion in Lake Ontario, Journal of Fish Diseases, 29: 629-632.
- Emre, Y. ve Kürüm, V., 1998. Havuz ve Ağ kafeslerde Alabalık Yetiştiricilik Teknikleri. Ankara. 232 s.
- Evensen, Ø. and Lorenzen, E., 1996. An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Diseases of Aquatic Organisms 25, 53–61.
- Faruk, R.A., 2000. Characterisation of *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of rainbow trout fry syndrome. PhD Thesis, University of Stirling, Stirling.
- Finney, M., 1993. Pulsed field gel electrophoresis. Current protocols molecular biology. Vol.1. Current- protocols. Greene- Wiley, New York. 2.5.9–2.5.17.
- Furones, M.D., 2001. Sampling for antimicrobial sensitivity testing: a practical consideration, Aquaculture, 196: 303-309.
- Goering, R. V. and Winters, M.A., 1992. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 30:577–580.

- Goering, R.V., 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment pattern by PFGE. *Inf. Control hosp. epidemiol.* 14:595–600.
- Gonzalez, C.J., Lopez-Diaz, T.M., Garcia-Lopez, M.L., Prieto, M., Otero, M., 1999. Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Food Protection*, 62(11): 1270-1277.
- Gonzalez, C.J., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.L., Gonzalez, N., Otero, A., 2001. *Mesophilic aeromonads* in wild and aquacultured freshwater fish, *Journal of Food Protection*, 64(5): 687-691.
- Gordillo, M.E., Singh, K.V., Murray, B.E., 1993. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol.* Jun;31(6):1570–1574.
- Gouby, A., Carles-Nurit, M.J., Bouziges, N., Gisele, B., Mesnard, R., Bouvet, J.M., 1992. Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol.* 30:1588–91.
- Gülay, Z., 1999. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara. Güneş Kitabevi.91–108.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J., Christol, J.J., 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish, *International Journal of Food Microbiology*, 98(2):131-134.
- Holliman, A., 1993. The veterinary approach to trout in aquaculture for veterinarians. *Fish Husbandry and Medicine*, ed. Lydia Brown Pergamon Press, 447p.
- Holt, R.A., 1987. Cytophag, Psychrophil, the Causative Agent of Bacterial Cold-Water Disease in Salmonid Fish Oregon State University A Thesis 182 p.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins Lippincott 787p.
- Holt, R.A., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L., 1993. “ Bacterial cold-water disease ”, In: “Bacterial Diseases of Fish ”, Inglis, V., Roberts, R. and Bromage, N. R. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford., 312p.

- Inglis, V., Roberts, J.R. and Bromage, R.N., 1993. Bacterial cold water disease, bacterial disease of fish, 1-22.
- Izumi, S. and Wakabayashi, H., 2000. Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. Fish Pathology 35: 93–94.
- Izumi, S. and Wakabayashi, H., 1997. Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. Fish Pathol. 32: 169–173.
- Izumi, S. and Wakabayashi, H., 1999. Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. Fish Pathology 32, 89–90.
- İnce, H., 2010. Balık hastalıklarında teşhis yöntemleri, Erişim: [http://www.ziraatci.com/editor/yazigoster.asp?katid=30&editid=427&yazii d=1260&>manual=off&kategori=Su%20%C3%83%C5%93r%C3%83%C2 %BCnleri], Erişim tarihi: 30.09.2010.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., Dörücü, M., 2004. Doğu Anadolu bölgesinde bazı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması, Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimler dergisi, 16 (4), 718-724.
- Jorgensen, J.H., 1997. Laboratory issues in the detection and reporting of antibacterial resistance. Infect Dis Clin North Am; 11:785–802.
- Kandil, M., 1976. Balık hastalıkları. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları:5. Ankara, 995s.
- Kaygusuz, A., 2000. Antibiyotik seçimini etkileyen faktörler ANKEM Derg;14: 497-581.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C., 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Edition, Lippincott, Philadelphia. 689 p.
- Korun, J. ve Timur, G., 2001. Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma İstanbul Üniversitesi su ürünleri dergisi 12:15-30.
- Kubilay A., Altun, S., Savaş S., 2009b. A study on aerobic bacterial flora during incubation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) eggs in hatchery. Journal of Fisheries Sciences. 3(1) 5–9.

- Kubilay, A., Altun, S., Didinen, B.I., Ekici, S., Diler, Ö., 2009a. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* İzalasyonu Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 15 (5): 709–715.
- Kumagai, A., Nakayasu, C., Oseko, N., 2004. Effect of Tobramycin Supplementation to Medium on Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from Ayu *Plecoglossus altivelis* Japan Science and Technology Agency 39;2; 75-78
- Kusuda, R., 1982. Development of intensive freshwater fish culture project, the Hungarian People's Republic fish disease research, Erişim: [http://www.fao.org/docrep/field/003/P6713E/P6713E04.htm], Erişim Tarihi: 30.09.2010.
- Lalitha, M.K., 2004. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing Department of Microbiology Christian Medical College Vellore, Tamil Nadu 47 p.
- Lehmann, J., Mock, D., Sturenberg, F.J. and Bernardet, J.F., 1991. First Isolation of *Cytophaga psychrophila* from a Systemic Disease in Eel and Cyprinids. Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 10, 217–220.
- Leonard, R.B., Mayer, J., Sasser, M., Woods, M.L., Mooney, B.R., Brinton, B.G., Newcomb- Gaymon, P.L. and Carrol, K.C., 1995. Comparison of MIDI Sherlock system and PFGE in characterizing strain of MRSA from a recent hospital outbreak. J. Clin. Microbiol. 33:2723–2727.
- Lido, Y. and Mizokami, A., 1996. Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. Fish Pathol., 31, 157 – 164.
- Lin, C.K., and Tsen H.Y., 1996. Use of two 16S DNA Targeted Oligonucleotides as PZR Primers for the Specific Detection of Salmonella in Foods. Journal of Applied Bacteriology, 80: 659–666.
- Lorenzen, E. and Olesen, N.J., 1997. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. Diseases of Aquatic Organisms 31, 209–220.
- Lorenzen, E., 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS), National Veterinary Laboratory, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., Bernardet, J.F., 1997. Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or

- rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies, *Diseases of Aquatic Organisms*, 31: 197-208.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., From, J., Hansen, F. M., Horlyck, V., Korsholm, H., Møllergaard, S. and Olesen, N.J., 1991. Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11: 77–79.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E. and Ferguson, H.W., 1996. Necrotic Myositis in Cage Cultured Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Caused by *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of fish diseases* 19; 113–119.
- Madetoja, J. and Wiklund, T., 2002. Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *System. Appl. Microbiol.* 25: 259–266.
- Madetoja, J., 2002. *Flavobacterium psychrophilum*: characterisation, experimental transmission and occurrence in fish and fish farming environments, Academic Dissertation, Finland, 1-37 pp.
- Madetoja, J., Dalsgaard, I., Wiklund, T., 2002. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Dis. Aquat. Org.* 52, 109-118.
- Madetoja, J., Hänninen, M.-N., Hirvelä-Koski, V., Dalsgaard, I. and Wiklund, T., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from Finnish fish farms. *J. Fish Dis.* 24:469–479.
- Madetoja, J., Nyman, P. and Wiklund, T., 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.* 43: 27–38.
- Madetoja, J., Nystedt, S. and Wiklund, T., 2003. Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 217–223.
- Madsen, L. and Dalsgaard, I., 2008. Water recirculation and good management potential methods to avoid disease outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 31, 799-810,
- Madsen, L. and Dalsgaard, I., 1998. Characterization of *Flavobacterium psychrophilum*; a comparison of proteolytic activity and virulence of strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: A.C. Barnes, G.A. Davidson, M.P. Hiney & D. McIntosh (Eds.) *Methodology in Fish Diseases Research*. Fisheries Research Services, Aberdeen, 45–52.

- Madsen, L. and Dalsgaard, I., 1999a. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Org. 36: 169–176.
- Madsen, L. and Dalsgaard, I., 1999b. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 171: 41–48.
- Madsen, L. and Dalsgaard, I., 2000. Comparative studies of Danish *Flavobacterium psychrophilum* isolates: ribotypes, plasmid profiles, serotypes and virulence. Journal of Fish Diseases 23, 211–218.
- Marx, J.L., 1988. Multiplying Genes by Leaps and Bounds, Science, Vol. 240, 1408–1410.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E. and Arbeit, R.D., 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis. 17:153–164.
- Maslow, J.N., Slutsky, A.M. and Arbeit, R.D., 1993. Application of PFGE to molecular epidemiology. P: 563–572. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. ASM Washington D.C.
- Matushek, M. G., Bonten, M.J.M. and Hayden, M.K., 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 34:2598–2600.
- Midtlyng, J.P., 2002. Aquaculture disease and health management, Journal of Animal Science, 69: 4201–4208.
- Miranda, A. G., Singh, K.V. and Murray, B.E., 1991. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. J. Clin. Microbiol. 29:2752–2757.
- Moellering, R.C., 1995. Principles of antinfective therapy. In: Mandell GL, Bennett JG, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th ed, New York, Churchill Livingstone, pp:199–212.
- Mullis, K.B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Sci. Am. 262 (4) : 56 – 65.
- Munson, A.D. and Hauck, A.K., 1993. Augmented fish health Monitoring in Idaho. Eagle Fish Health Laboratory Idaho Department of Fish and Game, Portland, 70s.
- Murray, B.E., Singh, K.V., Heath, J.D., Sharma, B.R., and Weinstock, G.M., 1990. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. J Clin Microbiol. 1990 September; 28(9): 2059–2063.

- Nedoluha, P.C., Westhoff, D., 1993. Microbiological Flora of Aquacultured Hybrid Striped Bass. *J. Food Prot.*; 56(12):1054-1060
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F. and Haesebrouck, F., 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 26: 563–574.
- Noga, E., 1999. Fish disease diagnosis and treatment. Iowa state University press/ Ames. 367s.
- Olive, D.M., Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661–1669.
- Olsen, J. E., Skov, M.N., Threlfall, E.J. and Brown, D.J., 1994. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J. Med. Microbiol.* 40:15.
- Ostland, V.E., McGrogan, D.G., Ferguson, H.W., 1997. Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*, *Journal of Fish Diseases*, 20: 443-451.
- Pacha, 1968. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) Isolated During Outbreaks of Bacterial Cold-Water Disease, *Applied Microbiology*, p. 97-101
- Plumb, J.A. and Browser, P.R., 1983. “Microbial Fish Disease Laboratory Manual”, Brown Printing Company Montgomery, First printing, Alabama.:95 p.
- Plumb, J.A., 1999. Health maintenance and principal microbial disease of cultured Fishes, Iowa State University/Amcs, 328p.
- Quirke, P., 1992. Molecular Biology and Infections of the Gut. *Gut*, 33: 1441–1443.
- Rangdale, R.E., 1997. Combined procedures for controlling RTFS. *CEFAS: Trout News*. Dec. 25: 22–24.
- Rangdale, R.E., Richards R.E., Alderman, D.J., 1996. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 16, 63-67.
- Rangdale, R.E., Richards, R.H., Alderman, D.J., 1997. Minimum inhibitory concentration of selected antimicrobial compounds against *Flavobacterium psychrophilum* the causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS), *Aquaculture*, 158: 193-201.

- Rimaila-Parnanen, E., Hirvelä-Koski, V., Niemi, A., Seppanen, J. and Hernesneimi E., 1997. Coldwater disease in rainbow trout: a case report and monitoring of oxytetracycline residues after treatment. Suomen Eläinlaakarilehti. 103: 140–144.
- Rogers, R. and Chapman, P.F., 1990. "Variation in iodine concentration during water hardening of salmonid eggs", Proceedings Of The 41st Annual Northwest Fish Culture Conference, Fish culture, Idaho Department Of Fish And Game Boise, Idaho, p.:120-129.
- Ryce, E.K.N. and Zale, A.V., 2004. Bacterial coldwater disease in westslope cutthroat trout: Hatchery epidemiology and control. Montana Water Center at Montana State University—Bozeman Partners for Fish and Wildlife Program, U.S. Fish and Wildlife Service, 13s.
- Sağlam, M., Özdemir, Y., Sarıeyyüpoğlu, M., 2008. Elazığ su ürünleri sektörü (Bugünü, Geleceği ve Bazı fizibiliteler). Final Eğitim kurumları 269s.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., 1988. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science; 239, 487–491.
- Sander, J.E., Fryer J.L., 1988. Bacteria of Fish in "Methods in Aquatic Bacteriology" (Ed by AUSTIN), John wiley & Sons ltd., Cichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Santos, Y., Huntly, P.J., Turnbull, A., Hasting, T.S. 1992. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the U.K, Bull. of The European Ass. of Fish Pathol., 12, 209-210.
- Sarıeyyüpoğlu, M., 1984. Gökuşağı Alabalıklarında (*S. gairdneri*) Mide-Bağırsak Bakteriyel Florasının Aerobik Yönden İncelenmesi. Doğa Bilim Dergisi, Seri: D 1 Cilt: 8, Sayı: 3, S. 281-287.
- Schlichting, C., Branger, C., Fournier, J.M., White, W., Boutonnier, A., Woltz, C., Goullet, P. and Doring, G., 1993. Typing of Staphylococcus aureus by PFGE, zymotyping, capsular typing and phaga typing: resolution of clonal relationships. J. Clin. Microbiol. 30: 1491–1498.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. and Larsen, J.L., 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria

- associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4908–4915.
- Schmidtke, L.M., Carson, J., 1995. Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia, *Diseases of Aquatic Organisms*, 21:157-161.
- Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37:67-75.
- Shotts, E.B., Starliper, C.E., 1999. Flavobacterial Disease: Columnaris Disease, Cold-water Disease and Bacterial Gill Disease, In *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3, Eds. Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 559-577.
- Shotts, E.B., Starliper, C.E., 2003. Flavobacterial Diseases: Columnaris Disease, Col-Water Disease and Bacterial Gill Disease, Woo PTK and Bruno DW (Ed), *Fish Diseases and Disorders*, 3: 559-573.
- Skoog, D.A. and West. D.M., 1971. *Principles of instrumental analysis*. Holt, Rinehart, and Winston. 598 p.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Sruoga, A., Butkauskas, D., 2006. Assessment of microbial diversity in the river trout, *Salmo trutta fario* L., intestinal tract identified by partial 16SrRNA gene sequence Analysis. *Fisheries Science*, 72(3): 597–602.
- Soltani, M., Shanker, S., Munday, B.L., 1995. Chemotherapy of Cytophaga /Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials, *Journal of Fish Diseases*, 18: 555-565.
- Starliper, C., Marcquenski S., Noyes A., 2007. Development of an improved medium for primary isolation of *Flavobacterium psychrophilum*, cause of bacterial coldwater disease.
- Stenholm, A.R., Dalsgaard, I., Middelboe, M., 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00428-08.
- Suzuki, K., Arai, H., Kuge, T., Katagiri, T., Izumi S., 2008. Reliability of PCR Methods for the Detection *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathology*, 43 (3), 124-127
- Swaminathan, B. and Matar, G.M., 1993. *Molecular typing methods. Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM Washington, 26-50p.

- Şen, B. ve Sönmez F., 2005. Bir Balık Üretim Tesisi (Elazığ)’ndeki Balık Havuzlarında Su Kalitesi ve Mevsimsel Değişimleri. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Der.. 17 (4), 599–603.
- Şengül, F. ve Türkman, A., 1991. Su ve Atık Su Analizleri. Dokuz Eylül Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü, Bornova İzmir Paşahan Matbaası 157s.
- Tamaki, H., Hanada, S., Kamagata, Y., Nakamura, K., Nomura, N., Nakano, K. and Matsumaru, M., 2003. *Flavobacterium limicola* sp. Nov., a psychrophilic, organic-polymer-degrading bacterium isolated from freshwater sediments, Internation Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 519-526.
- Taylor, G.R., 1993. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Automation. In PZR: A Practical Approach, Eds:McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R.Oxford University Press,Oxford, 1-14.
- Tekelioğlu, N., 2005. “İçsu Balıkları Yetiştiriciliği”, Nobel kitabevi, Adana, 278 s.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.A., Persing, D.H., and Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233–2239.
- Timur, G., Timur, M., 2003. Balık hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:5, Dilek Ofset matbaası, 538s.
- Toranzo, A.E., 2004. Report about fish bacterial diseases. University of Santiago de Compostela, Faculty of Biology, Institute of Aquaculture Department of Microbiology and Parasitology, Campus Sur 15872 Santiago de Compostela, Spain 41s.
- Toranzo, A.E. and Barja, L.J., 1993. “Fry Mortality Syndrome (FMS) In Spain. Isolation of The Causative Bacterium *Flexibacter psychrophilus*”, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13(1):30-32.
- Toshio, N., Yuichi, I., Hajime, A., Takahiro N., Shotaro, I., 2006. A Newly Designed Culture Medium for *Flavobacterium psychrophilum* Japan Science and Technology Agency 28;33-37
- Türkmen, A., Türkmen, M., 1999. Karasu Irmagının (Askale Mevkii) bazı su kalitesi parametrelerinin mevsimsel değişimi ve su ürünleri açısında değerlendirilmesi, X. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu 22-24 EylülAdana.

- URL-1. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=6284>. T.c. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni 10 Eylül 2010.
- URL-2. <http://www.mikrobiyoloji.org/> Bazı Önemli Biyokimyasal Testler. 11 Ekim 2009.
- URL-3. <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Flavobacterium>. Flavobacterium 10 Kasım 2008.
- URL-4. http://www.cnr.uidaho.edu/fish422and424/new_page_3.htm. Coldwater disease 10 Kasım 2008.
- URL-5. <http://www.cdc.gov/pulsenet/whatis.htm> What is PulseNet? 15 Ekim 2010.
- URL-6. <http://www.nalusda.gov/pgdic/Probe/v2n3/puls.html>. Pulsed Field Electrophoresis for Separation of Large DNA. 15 Ekim 2010.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Gren, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.; 13: 1–46
- Vastos, I.N., Thompson, K.D. and Adams, A., 2003. Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Org.* 56: 115–126.
- Vatansever, H., 2001. Alabalıklarda Salmon hastalıkları. Veteriner Hekim Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Başmüfettişi tarafından çeviriler Birinci baskı, Ankara, 226s.
- Wakabayashi, H., Toyama, T. and Lida, T., 1994. A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan, *Fish Pathology* 29, 101-104.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönnström, L., Dalsgaard, I., 1994. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14 (2): 44-46.
- Wiklund, T., Madsen, L., Bruun, M. S. and Dalsgaard, I., 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology* 88: 299–307.
- Yıldırım, S., 2007. Mersin Çağlarca Köyündeki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Kuluçkahanelerinde *Flavobacterium* spp.'nin

Araştırılması. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans
Tezi 79s.

Yılmaz, C., 2010. Alabalık yetiştiriciliği. Elazığ Tarım İl Müdürlüğü 106 s.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya ili Doğanşehir ilçesine bağlı Kurucaova kasabası'nda 06.11.1979 tarihinde doğdum. İlköğrenimimi burada, orta öğrenimimi ise Sürgü kasabasında tamamladım. Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ne 1998 yılında kayıt yaptırđım ve 2002 yılında mezun oldum. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su ürünleri yetiştiriciliğı Anabilim Dalı'nın Balık hastalıkları dalı'nda 2005 yılında Yüksek Lisans'ı tamamladım. Halen Balık Hastalıkları Dalı'nda doktora'ya devam etmekteyim.

Doktora öğrencisi

Mikail ÖZCAN