T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FETHİYE YÖRESİNDE BULUNAN BAZI GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU BALIKLARIN LAKTOKOKKOZİS YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Mehtap KURTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FETHİYE YÖRESİNDE BULUNAN BAZI GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU BALIKLARIN LAKTOKOKKOZİS YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Mehtap KURTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2010

FETHİYE YÖRESİNDE BULUNAN BAZI GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU BALIKLARIN LAKTOKOKKOZİS YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Mehtap KURTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (2010.02.0121.010) tarafından desteklenmiştir.

2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FETHİYE YÖRESİNDE BULUNAN BAZI GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU BALIKLARIN LAKTOKOKKOZİS YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Mehtap KURTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 18./6./2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (95) not takdir edilerek Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr.Jale KORUN (Danışman).....
Doç.Dr.Ahmet KÜÇÜKÇETİN.....
Yrd.Doç.Dr.Mehmet GÖKOĞLU.....

ÖZET

FETHİYE YÖRESİNDE BULUNAN BAZI GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) İŞLETMELERİNDEKİ YAVRU BALIKLARIN LAKTOKOKKOZİS YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Mehtap KURTOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Jale KORUN
Mayıs 2010, 56 Sayfa

Bu çalışmada Fethiye Yöresi'nde bulunan bazı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) işletmelerindeki yavru alabalıklardan izole edilen *Lactococcus garvieae* incelenmiştir. Şubat 2010-Mayıs 2010 tarihleri arasında gerçekleştirilen çalışmada biyokimyasal testler sonucunda *Lactococcus garvieae* tespit edilmiştir. *L. garvieae'*nin antibiyotik hassasiyetleri ve plazmit büyüklükleri tespit edilmiştir. *L. garvieae* suşlarının disk diffüzyon testinde amfisilin, eritromisin, kloromfenikol, sülfametoksazol, oksitetrasiklin, tetrasiklin ve trimetoprim antibiyotiklerine duyarlı oldukları, basitrasin, flumekuin, furozolidon, kanamisin, nalidiksik asit, oksalinik asit ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli oldukları tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Fethiye Yöresi, gökkuşağı alabalığı,
laktokokkozis, antibiyotik hassasiyeti, plazmit.

JÜRİ: Yrd.Doç.Dr.Jale KORUN (Danışman)
Doç.Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Yrd.Doç.Dr. Mehmet GÖKOĞLU

ABSTRACT

RESEARCHING OF LACTOCOCCOSIS ISOLATED FROM THE YOUNG FISH OF SOME RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) FARMS IN FETHIYE REGION

Mehtap KURTOĞLU

M.Sc. Thesis in Aquatic Engineering

Adviser: Asst.Prof.Dr. Jale KORUN

May, 2010, 56 pages

In this research, in Fethiye Region, *Lactococcus garvieae* isolated from the young fish of some rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) farms was examined. After the biochemical tests, *Lactococcus garvieae* was determined during February 2010-May 2010. Antimicrobial susceptibilities and size of plasmids of *Lactococcus garvieae* strains were determined. In disc diffusion method *L. garvieae* strains were determined as sensitive to ampicillin, erytromycine, chloramphenicol, sulfamethoxazole, oxytetracycline, tetracycline ve trimethoprim and resistant to basitrasin, flumequine, furozolidone, kanamycin, nalidiksik asit, oksalinik asit and streptomycin using disc diffusion method.

KEY WORDS: Fethiye Region, rainbow trout, lactococcus, antimicrobial susceptibilities, plasmids.

COMMITTEE: Asst.Prof.Dr. Jale KORUN (Supervisor)
Assoc.Prof.Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Asst.Prof.Dr. Mehmet GÖKOĞLU

ÖNSÖZ

Ülkemiz çevresindeki denizler, iç sular ve iklim özellikleriyle su ürünleri bakımından önemli bir potansiyele sahiptir. Fakat çevre sorunları ve yoğun avlama, balık üretiminde bazı kısıtlamaları zorunlu kılmıştır. Gün geçtikçe artan beslenme problemi ile bu oluşum içindeki kültür balıkçılığı önem kazanmaya başlamıştır.

Balık yetiştiriciliği, beslemedeki sorunların çözümü için ümit vadeden ve üzerinde önemle durulması gereken bir sektördür. Bu sektördeki başarı yetiştiricilikte karşılaşılan hastalıklar, su kalitesi, yem ve besleme gibi problemlerin zamanında çözülmesine bağlıdır.

Kültür balıkçılığında balıkları hastalıklardan korumak, hastalıklarını teşhis ve tedavi etmek ancak bu konuda yapılacak bilimsel araştırmalar ile mümkündür.

Bu çalışmada iç su balık yetiştiriciliğinde en büyük paya sahip olan gökkuşağı alabalıklarında ortaya çıkarak ciddi sorunlara yol açan ve büyük kayıplara sebep olan laktokokkozis incelenmiş ve antibiyotik hassasiyetleri belirlenmiştir.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Jale KORUN'a, plazmit çalışmaları sırasında yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nden Doç.Dr. Mehmet KARACA'ya, Dr. Ayşegül İNCİ ile Yüksek Lisans Öğrencisi Adnan AYDIN'a ve her zaman bana destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (2010.02.0121.010) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
ÖNSÖZ.....iii
İÇİNDEKİLER.....iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....viii
1.GİRİŞ.....1
2.KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....7
2.1.Gökkuşağı Alabalığı ve Kültürü……..7
2.2.Gökkuşağı Alabalığı Yavrularında Görülen Bakteriyel Enfeksiyonlar……...10
2.3.Laktokokkozis……10
2.4. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları……...13
2.4.1. Bakterisidal ve bakteriyostatik aktivite……..14
2.4.2. Antibakteriyel ilaçlar…….....14
2.4.2.1. Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar……14
2.4.2.2. Protein sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar…….....16
2.4.2.3. Nükleik asit sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar……17
2.4.2.4. Hücre membran fonksiyonunu değiştiren antibakteriyel ajanlar…..18
2.4.2.5. Etki mekanizmaları bilinmeyen antibakteriyel ilaçlar……..18
2.5. Balık Hastalıklarının Tedavisi ve Antibiyotik Kullanımı…….....18
2.5.1. Kültür balıkçılığında bakteriyel hastalıkların kontrolünde ve tedavisinde kullanılan antibiyotikler……..20
2.5.1.1. Oksitetrasiklin……20
2.5.1.2. Oksalinik asit…….20
2.5.1.3. Kloromfenikol……20
2.5.1.4. Eritromisin…….21
2.5.1.5. Kanamisin……..21
2.5.1.6. Flumekuin……...21
2.5.1.7.Furazolidon……..21

2.6. Antimikrobiyal Ajanların *İn Vitro* Aktiviteleri……...21
2.6.1.İnhibitör aktivite ile ilgili testler…….22
2.7. Plazmitler…….23
3. MATERYAL VE METOT……..27
3.1. Materyal……..27
3.1.1. Balık örneklerinin temin edildiği işletmeler……..27
3.1.2. Balık örneklemesi……..27
3.1.3. Çalışmada kullanılan besi yerleri, kimyasal maddeler ve antibiyotikler……...27
3.2. Metot……28
3.2.1.Hasta balık örneklerinin incelenmesi…….28
3.2.2. Bakteri izolasyonu…….28
3.2.3.İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti……29
3.2.3.1. Morfolojik özelliklerinin tespiti……....29
3.2.3.2. Fizyolojik özelliklerinin tespiti…….29
3.2.3.3. Biyokimyasal özelliklerinin tespiti……...29
3.2.3.4. Bakteriyel identifikasyonda kullanılan biyokimyasal metotlar…30
3.2.4. Antibiyotik duyarlılık testi için standart disk difüzyon yöntemi……31
3.2.5. Plazmit analizi……32
4. BULGULAR……...34
4.1. Klinik ve Otopsi Bulguları……34
4.2.Bakteriyolojik Bulgular……..38
4.2.1. Hareketli Aeromonas türlerinin tanımlanması…….38
4.2.2. *Pseudomonas fluorescens'*ın tanımlanması……..38
4.2.3. *Enterobacter cloacae'*nın tanımlanması……...39
4.2.4. *Edwardsiella ictaluri'*nin tanımlanması……...39
4.3. Standart Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları…42
4.4. Plazmit Analizi İle İlgili Bulgular……..44
5. TARTIŞMA…….45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER……49
7. KAYNAKLAR……50
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

gr: Gram

mg/lt: Miligram/litre

pH: Hidrojen konsantrasyonu iyonu

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

µg/ml: Mikrogram/mililitre

µl: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1. 2008 verilerine göre dünya su ürünleri üretim miktarı……..2
Şekil.1.2. TÜİK (2007) verilerine göre türlere göre üretim miktarları……..3
Şekil 1.3. Konakçı-patojen-çevre ilişkisi …….....4
Şekil 2.1. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W). …….8
Şekil 4.1.Etkilenmiş gökkuşağı alabalığı yavrusunda dorsal yüzgeçte distal uçta hafif erime…….....34
Şekil 4.2. Etkilenmiş balıkta gözlerde opaklaşma ve ekzoftalmi……35
Şekil 4.3. Hasta balıkta karaciğerde hemoraji ve büyümüş dalak……...36
Şekil 4.4. Etkilenmiş balıkta gözlerde ekzoftalmi ve hemoraji……...37
Şekil 4.5. Solgun solungaçlar, karaciğerde hemoraji, dalakta büyüme ve renkte koyulaşma……...37
Şekil 4.6. *L.garvieae* suşunun amfisilin, eritromisin ve kloromfenikol antibiyotiklerine karşı oluşan zon çapları……...42
Şekil 4.7. Suşların plazmit analiz görüntüleri……..44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.2. TÜİK verilerine göre 1994-2007 yılında toplam su ürünleri üretimi……3

Çizelge 2.1. *L. garvieae*'nin fenotipik özellikleri……13

Çizelge 4.1. *L.garvieae* suşları dışında izole edilen ve tanımlanan suşların biyokimyasal özellikleri……..40

Çizelge 4.2. *L. garvieae*'nin fenotipik özellikleri……41

Çizelge 4.3. *L.garvieae* suşlarının standart disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılık sonuçları……...43

1.GİRİŞ

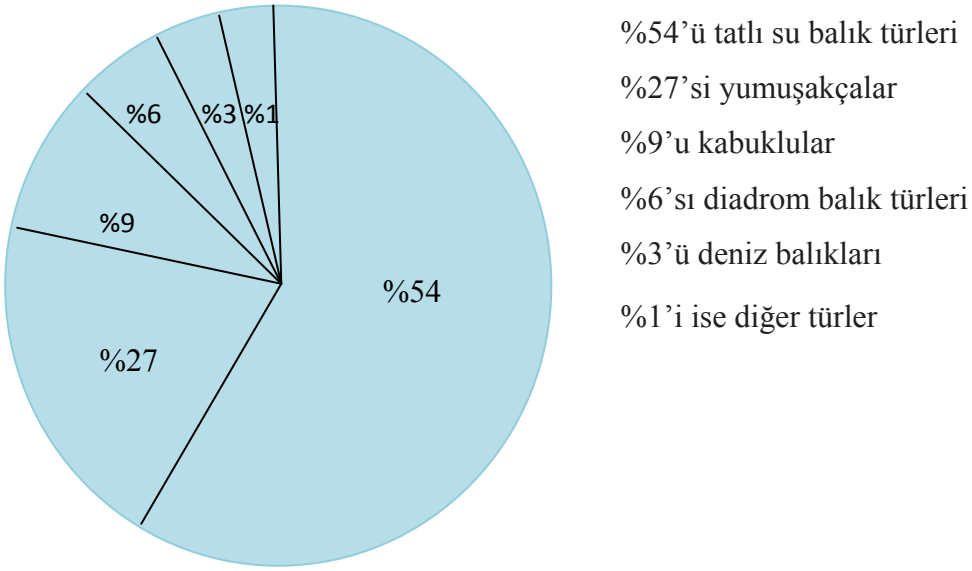
Tüm dünyada doğal balık stoklarında aşırı avlanma, kirlilik ve bazı bölgelerdeki iklim değişiklikleri sebebiyle azalmalar meydana gelmektedir. Bu nedenle su ürünleri yetiştiriciliği gittikçe önem kazanmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği çok çeşitli aktiviteler içeren bir terimdir. Örneğin dünyada tatlı su sistemlerinde ticari veya rekreasyonel balıkçılığı geliştirmek amacıyla yılda 60 milyar balık yavrusu yumurtadan yetiştirilerek doğaya salınmaktadır. Asya'da herbivor balıklar pirinç yetiştiriciliği ile kombine edilen düşük teknolojili ekstansif sistemlerde yetiştirilmektedir. Tanklarda, havuzlarda veya kafeslerde gökkuşağı alabalığı intensif olarak üretilmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliği yumuşakçalar (abalon, midye, istiridye), kabuklu ve balık yetiştiriciliğini kapsamaktadır (Aydın ve ark. 2005).

Çeşitliliğin çok fazla olmasına karşın dünya su ürünleri yetiştiriciliği değer ve üretim miktarı açısından birkaç türle sınırlanmıştır. Bunlar özellikle kelp, sazan, istiridye ve karidestir. Su ürünleri yetiştiriciliği; üretilen miktar, yetiştirilebilen tür sayısı ve yetiştiriciliği yapılan coğrafik bölge ve ortam bakımından önemli artış göstermektedir. Bunda çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bu faktörler; doğal stoklardan maksimum yararlanma düzeyine ulaşılmış olması ve birçok türün doğal veya avcılık yolu ile üretiminin artan talebi karşılayamaması, su ürünlerinin besin değeri ve artan nüfusun beslenmesinde oynayacağı rolün toplumlarca benimsenmiş olması, açık deniz balıkçılığının giderek pahalı bir ekonomik faaliyet haline gelmesi, münhasır ekonomik bölgelerin sınırlarının çoktan belirlenmiş olması, deniz kirliliği ve aşırı avcılık gibi nedenlerle doğal stoklara zarar verilmesi ve bu stokların takviye edilmelerine gerek duyulması, talebin artması ve doğal üretiminin azalması sonucu pazar fiyatlarındaki artışın yetiştiriciliği cazip hale getirmesi, su ürünlerinin beslenmede önemini kavrayan toplumlarda yıl boyunca su ürünlerine talep olması, biyoloji, çeşitli mühendislik ve genetik bilimindeki gelişmelerle yetiştiricilikte her geçen gün yeni gelişmelerin sağlanmasıdır (Aydın ve ark. 2005).

Dünya su ürünleri yetiştiriciliği son 50 yılda hızlı bir şekilde gelişme göstermiştir. 1950'li yılların başlarında üretim miktarı 1 milyon tondan daha az iken 1980'de 7.4 milyon ton, 1990'da 16.8 milyon ton, 2000'de 35.5 milyon ton ve 2005'de 47.8 milyon ton olup 2006 yılında ise 51.7 milyon tona ulaştığı bildirilmiştir (Taş 2007). Bu artışlar su ürünleri yetiştiriciliğinin diğer hayvan üretim sektörlerine göre sürekli bir gelişme gösterdiği anlamına gelmektedir. 2006 yılı verilerine göre dünya su

ürünleri yetiştiriciliğinin %54'ü tatlı su balık türlerinden, %27'si yumuşakçalardan, %9'u kabuklulardan, %6'sı diadrom balık türlerinden, %3'ü deniz balıklarından, %1'i ise diğer türlerden oluşmaktadır (SOFIA 2008).

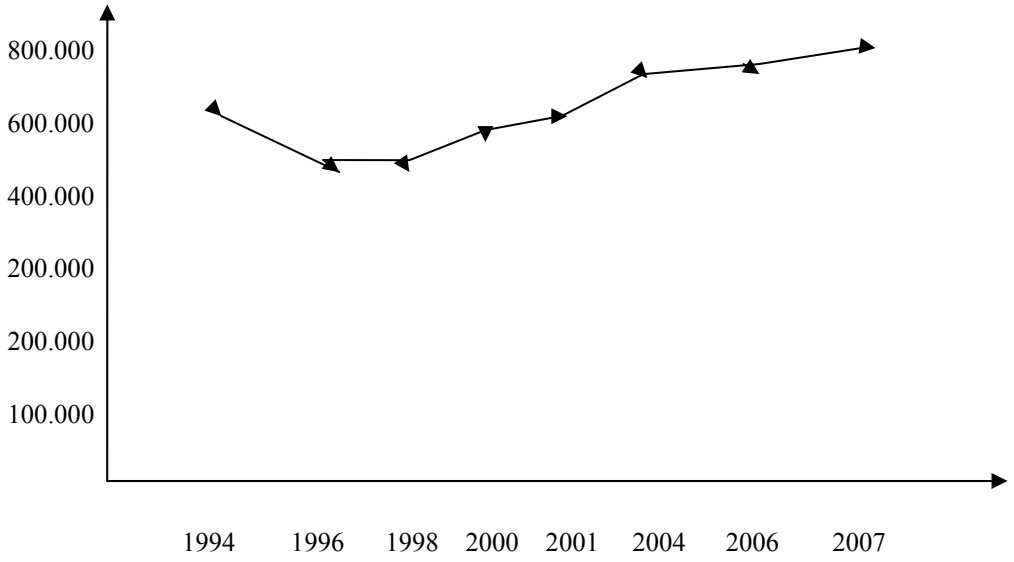
SOFIA (2008)'e göre toplam dünya su ürünleri üretiminin %67'si Çin tarafından üretilmektedir.



Şekil.1.1. 2008 verilerine göre dünya su ürünleri üretim miktarı (SOFIA 2008)

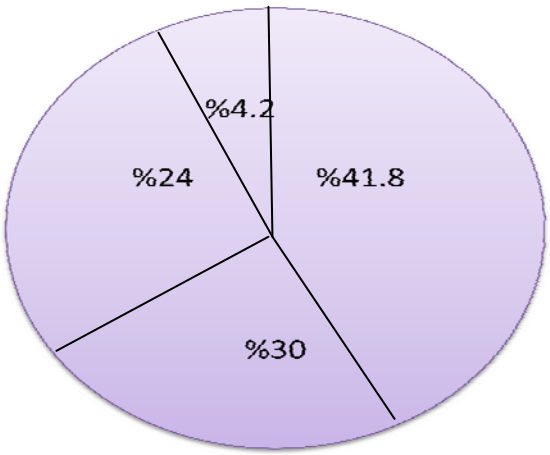
Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği faaliyetleri 1960'larda alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yumurtalarının Avrupa'dan ithali ve ardından Marmara Bölgesi'nde ilk özel çiftliğin kurulması ile başlamıştır. Ülkemizde balık yetiştiriciliğinin geçmişi henüz yeni olmasına karşın, nispeten hızlı bir gelişme göstermiştir (Karakaş ve Türkoğlu 2005). Yıllara göre üretim miktarına bakıldığında Türkiye'nin 1994 yılı toplam su ürünleri üretimi 601.104 ton civarında olup bu üretimin yaklaşık 15.998 tonu yetiştiricilik yolu ile sağlanırken, 2001 yılı toplam su ürünleri üretimi 595 bin ton üretimin 67 bin tonu yetiştiricilik yolu ile sağlanmıştır (Çeliker 2003). Kültür balıkları üretimi 2004 yılında ise 94.010 ton, toplam su ürünleri üretimi 644.492 ton iken Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nun açıkladığı rakamlara göre ülkemizde 2006 yılında yaklaşık 533 bin tonu avcılık ile, 129 bin tonu yetiştiricilikle olmak üzere yaklaşık 662 bin ton su ürünleri üretimi yapılmıştır (TÜİK 2007). Yine TÜİK verilerine göre 2007 yılında toplam su ürünleri üretimi 772.323 ton olup bunun 139.873 tonu yetiştiricilik ile sağlanmıştır (Çizelge 1.2) (TÜİK 2007).

Çizelge 1.2. 1994-2007 yılı toplam su ürünleri üretimi (Ton) (TÜİK 2007)



Kültür balıklarının türlerine göre dağılımına bakıldığında en yüksek yetiştiriciliği yapılan tür, iç sularda alabalık olup, toplam su ürünleri yetiştiriciliğinin %41.8'ini oluşturmaktadır. Bunu %30 ile levrek (*Dicentrarchus labrax*), %24 ile çipura (*Sparus auratus*) takip etmektedir. Alabalık (deniz), midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) (iç su) üretimleri de diğer türleri takip etmektedir (Şekil 1.2) (TÜİK 2007).

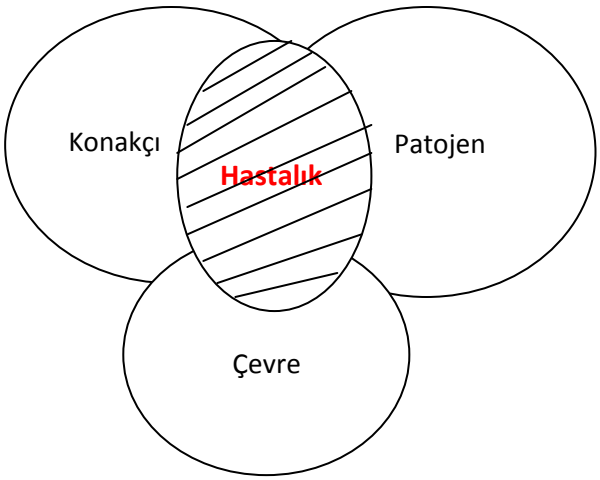
%41.8 tatlı su alabalığı (58.433 ton)
%30 levrek (41.900 ton)
%24 çipura (33.500 ton)
%4.2 diğer (alabalık (deniz), midye (*Mytilus galloprovincialis*) ve aynalı sazan (*Cyprinus carpio*)



Şekil 1.2. Türlere göre üretim miktarları (TÜİK 2007)

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıklar, üretim ve ticareti sınırlayan en önemli etken olarak bilinmektedir. Bilindiği üzere su ürünleri yetiştiriciliğinde yaklaşık son 20 yılda hızlı bir büyüme gerçekleşmiştir. Bu hızlı büyüme sürecinde çevresel etkileşimlerle birlikte bakteriyel, viral, fungal ve paraziter hastalıklarda da artış meydana gelmiştir (Turgut ve ark. 2007). Bu hastalık etkenleri biyolojik çeşitliliği ve dolayısıyla sürdürülebilir büyümeyi önemli ölçüde etkileyen ekosistemin ayrılmaz unsurlarıdır. Yüksek stoklama yoğunluğu ile birlikte strese yol açan çevresel faktörler salgın hastalıkların ortaya çıkmasına, kültür ve doğal ortam arasında su değişimi yoluyla bu hastalıkların doğal türlere bulaşmasına yol açabilmektedir (Turgut ve ark. 2007).

Doğal ortam koşullarında balık hastalıkları sorunları daha azdır. Bunun sebebi hasta hayvanların ortamda bulunan avcıları tarafından avlanarak uzaklaştırılmalarıdır. Ayrıca balıklar doğal koşullarda kültür koşullarına göre daha az kalabalık halde bulunurlar. Bu koşullarda parazitler ve bakteriler en düşük seviyede öneme sahiptirler. Oysaki kültür koşullarında, balıklar kalabalık ve stres halinde bulunduklarından bu etkenler sürekli bir sorun oluşturmaktadır. Hastalık patojen ve konakçı balık arasındaki bir ilişki olup genellikle diğer şartlar ortamda mevcut olduğunda popülasyonda hastalık gelişebilmektedir. Zayıf su kalitesi ya da diğer stres faktörleri gibi çevresel sorunlar hastalık çıkışında önemli rol oynamaktadır (Şekil 1.3) (Francis-Floyd 2003).



Şekil 1.3. Konakçı-patojen-çevre ilişkisi (Francis-Floyd 2003)

Yüksek stoklama yoğunluğu, yoğun yemleme ve yetersiz su değişimi ile karakterize edilen intensif balık üretim tesislerindeki yetiştiricilik uygulamaları hastalıkların ortaya çıkışını teşvik etmektedir (Altunay ve Yıldız 2008).

Balık hastalıkları konusunda yapılan araştırmalar 1980'li yıllarda 25-30 kadar bakteri türü, 5-10 kadar virüs ve birkaç parazit ile mantar türünün balıklar için patojen olduğunu gösterirken; bugün 80-100 kadar bakteri, 45-50 kadar virüs ve birçok parazit ve mantarın balıklar için patojen olduğunu göstermektedir. Patojenlerden kaynaklanan hastalıkların yanında besinsel kaynaklı hastalıklar da su ürünleri üretimini ve kalitesini etkilemektedir. Balık hastalıkları orjinlerine göre bakteriyel, paraziter, fungal, viral, besinsel ve çevresel olmak üzere 6 gruba ayrılabilir (Korkut ve ark. 2002).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak görülen hastalıklar deniz ve tatlı su balığı türlerini etkileyen hastalıklar olmak üzere 2 gruba ayrılabilir. Levrek balıklarının başlıca bakteriyel hastalıkları *Listonella anguillarum* serotip O1'in neden olduğu vibriosis ve pasteurellozistir. Bununla birlikte *Vibrio ordalii* 'nin neden olduğu bazı hastalık vakaları da bildirilmiştir. *Photobacterium damsela* var. *piscicida* ise levrek ve çipura balıklarından izole edilmiştir. *Pseudomonas anguilliseptica* enfeksiyonu çipura balıklarında nadir olarak gözlenmesine karşın *Tenacibaculum maritimum* enfeksiyonu pek çok kuluçkahanede ciddi sorun olmaktadır. 1998-1999 yılları arasında Nodavirüs enfeksiyonundan şüpheli vakaları gözlenmesine karşın hastalık bulguları görülmemiştir. *Amyloodinium ocellatum, Cryptobia* sp., *Trichodina* sp., *Cryptocaryon irritans*, *Diplectanum aequans*, *Meinertia oestroides*, *Lernanthropus kroyeri* ve *Caligus minimus* levrek balıklarında gözlenmiştir. *Furnestinia echenenis*, *Microcotyle chrysophrii* ve *Meinertia oestroides* türleri ise çipurada sorunlara neden olmaktadır. Lenfosistis, jüvenil çipura balıklarında yaygın olarak görülen bir hastalık olup bununla birlikte hastalıktan etkilenen bireylerde ölüm oranları düşüktür. *L. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *T. maritimum*'un da çipura balıklarından izole edildiği bildirilmiştir. 2000 yılına kadar gökkuşağı alabalıklarının başlıca hastalığı *Yersinia ruckeri*'nin neden olduğu ERM (Enterik Kızıl Ağız) olmasına karşın *Lactococcus garvieae* enfeksiyonu 2000 yılından bu yana alabalık işletmelerini ciddi olarak tehdit etmektedir. Hastalık ülkemizde ilk kez 1993 yılında gözlenmiş, Çağırgan ve Tanrıkul (1995) tarafından *Enterococcus*-benzeri bakteriler olarak adlandırılmıştır.

Türkiye'de bakteriyel böbrek hastalığına dair raporlar da mevcuttur. Furunkulozis birçok ülkedeki gökkuşağı alabalığının ciddi bir hastalığıdır. Gökkuşağı alabalığı fry mortalite sendromu da gökkuşağı alabalıklarında ciddi kayıplara neden olmaktadır. Diğer ülkelerde olduğu gibi *Ichthyophthirius multifilis* ve *Ichthyobodo* sp. alabalık fryında başlıca parazitik sorundur. Bununla birlikte iyi sanitasyon ve formaldehit tedavisinin oldukça başarılı sonuç verdiği bildirilmiştir. IPN (İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis) virüsü RT-PCR ile tespit edilmiştir. Bununla birlikte IHN (İnfeksiyöz Hematopoietik Nekrozis) virüsü ve SVC (Sazanların İlkbahar Viremisi) virüsü izole edilememiştir. Gökkuşağı alabalıklarındaki balık hastalıklarının tedavisi başlıca beyaz benek ve Ichthyobodiasis gibi parazitik hastalıkların olduğu kadar bakteriyel hastalıkların (örneğin yersiniosis, laktokokkozis, gökkuşağı alabalığı fry mortalite sendromu, hareketli aeromonadlar, pseudomonadlar) tedavisine dayanmaktadır. Levrek ve çipurada vibriosis, pasteurellozis, mikobakteriosis ve parazitik hastalıklarda (örneğin *Cryptobia* sp., *Trichodina* sp., *C. irritans*, *A. ocellatum*, *D. aequans*, *M. oestroides*, *L. kroyeri*, *C. minimus, F. echenenis*, ve *M. chrysophrii*) tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteriyel hastalıkların çoğu antibiyotik ile tedavi edilebilmektedir. Bu nedenle çipura, levrek ve alabalık için bazı lisanslı ilaçlar mevcuttur. Bununla birlikte direnç gelişimi ciddi bir sorundur. *L. anguillarum*'un izole edilen son suşlarının çoğunun oksitetrasiklin, kuvvetlendirilmiş sülfanamidler ve flumekuin'e dirençli olduğu, *L. garvieae* suşlarının ise önceden kullanılan antibiyotiklere (oksitetrasiklin, kuvvetlendirilmiş sülfanamidler, flumekuin, amfisilin, amoksisillin, enrofloksasin ve eritromisin) dirençli oldukları bildirilmiştir. Bazı parazitik hastalıklar tatlı su/ tuzlu su ya da formaldehit banyoları ile tedavi edilebilir. Bununla birlikte diğer parazit türleri için insektisitler'in kullanımına da gereksinim duyulmaktadır (Çağırgan 2004, Çağırgan ve Tanrıkul 1995).

Bu tez çalışmasının amacı; kültür gökkuşağı alabalığı yavrularında görülen laktokokkozis'in tespiti, hastalık etkeni bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılığının ortaya koyulması ve plazmitlerinin mevcut olup olmadığının araştırılmasıdır.

2.KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Gökkuşağı Alabalığı ve Kültürü

Alabalıklar (Salmonidae) doğada sıcaklığı 20ºC'yi geçmeyen sularda yayılmış olduklarından bu familya türlerinin yetiştiriciliği ''Soğuk sularda balık yetiştiriciliği'' şeklinde de tanımlanmaktadır. Alabalık türlerini diğer balık türlerinden ayıran en belirgin ayrıcalığı sırt yüzgeci ile kuyruk yüzgeci arasında, yapısı diğer yüzgeçlere benzemeyen küçük bir yağ yüzgecinin bulunmasıdır. Alabalık yetiştiriciliği özellikle 19 y.y. ortalarında yapay dölleme yolu ile döl elde etme olanağının elde edilmesinden sonra dünyanın ekolojik koşulları bu türlere uygun tüm bölgelerinde hızla yayılmış ve pazar değeri en yüksek balıklar düzeyine ulaşılmıştır. Yetiştiriciliği yapılan alabalık türleri coğrafik kökenlerine göre genellikle Avrupa kökenli alabalıklar ve Amerika kökenli alabalıklar olmak üzere 2 gruba ayrılırlar (Sarıhan ve Tekelioğlu 2005).

Avrupa kökenli alabalık türleri, Avrupa kıtası ile bu kıtaya bitişik coğrafik bölgelerin akarsu ve göllerine yayılmaktadır. Avrupa kökenli alabalık türlerinin en ünlüsü kahverengi alabalıktır (*Salmo trutta fario*). Ülkemizde ise Bolu il sınırları içindeki Abant Gölü ve Yedi Göller'de bulunan *Salmo trutta abanticus*, güney ve güneybatı Anadolu'da yayıldığı bilinen *Salmo trutta macrostigma,* Kars (Çıldır Gölü), Doğu Karadeniz bölgesi ile Uludağ yöresinde yayılmış olan *Salmo trutta labrax* ve Aras Nehri ile çevresinde bulunan *Salmo trutta caspius*'tur. Bu alt türlerin tümü de tatlı su türü olup kimi yerde dere kimi yerde de göl alabalığı diye anılmaktadır. Bununla birlikte alt türlerden *Salmo trutta labrax* denizde beslenip ve gelişir. Yumurtlamak için tekrar tatlı sulara geri döner. Amerika kökenli alabalık türlerinin başında Kuzey Amerika'nın Pasifik bölgesinin ünlü alabalık türü olan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W.) gelmektedir. Avrupa'ya 1880 yılında getirilmiştir. Türkiye'de kurulmuş olan alabalık işletmelerinde yetiştiriciliği yapılan türdür. Denize inen ve inmeyen 2 ırkı bilinmektedir. Gökkuşağı adı daha çok denize inmeyen ırkı için kullanılmaktadır. Amerika kökenli diğer alabalık türleri arasında kayalık dağlar alabalığı (*Salmo clarkii*), çeşme alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve Amerikan göl alabalığı (*Salvelinus namaycush*) türleri ile Pasifik Som Balığı (*Oncorhynchus* spp.) türleri de bulunmaktadır (Sarıhan ve Tekelioğlu 2005).

Bu türlerden gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) Salmonidae familyasına dahil olup yaygın olarak kültürü yapılan soğuk su balıkları arasında yer alır. Tür soğuk, berrak, bol oksijenli akarsularda, göl ve kaynak sularında yaşar (Bromage ve ark. 1992).

Gökkuşağı alabalığının taksonomik sınıflandırılması ile ilgili olarak 30'dan fazla tür ismi tanımlanmıştır. Uzun yıllar *Salmo gairdneri* R. ismiyle bilinmiştir. Ancak 1988'de Amerika Balıkçılık Derneği Balık İsimlendirme Komitesi, bütün Pasifik alabalık ve salmonlar için *Oncorhynchus*'un cins ismi olarak kullanılmasını ve böylelikle, Atlantik alabalık ve salmonlardan ayırt edilmesini kararlaştırmıştır. Böylece gökkuşağının tür ismi olarak bilinen *Salmo gairdneri* yerine *Oncorhynchus mykiss* tür ismi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu isim değişikliği uluslar arası düzeyde de kabul görmüştür (Emre 2004).

Gökkuşağı alabalığında vücut, uzamış ve az basık olup, sırtta bir yağ yüzgeci mevcuttur. Sırt yüzgeci 10-12, anal yüzgeci ise 8-12 yumuşak ışına sahiptir. Pulları, sikloit ve küçüktür. Yanal çizgi tam, az öne doğru 100 ile 150 adet pulla kaplanmıştır. Kafanın üst kısmı ve arkası çelik mavisi, mavi-yeşil, sarı-yeşil ve hemen hemen kahverengidir. Vücut kenarları gümüşi, beyaz veya soluk sarı-yeşilden griye eğilimli olan bir renktir. Karın kısmı gümüşi beyaz veya sarıdır. Yine vücut kenarlarında bulanık pembe, mavimsi veya geniş açık bir pembe bant ile çok sayıda küçük lekeler mevcuttur (Şekil 2.1). Anaçlarda yumurtlama zamanı renk çok koyu ve yanal çizgi ise çok kırmızı renk alır (Emre 2004).



Şekil.2.1. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W) (Emre 2004)

Salmonid balıklarının başarılı bir şekilde yetiştiriciliğinin yapılması, onların hayatta kalmaları ve gelişmeleri için gerekli olan biyolojik ihtiyaçlarının iyi anlaşılması ve bilinmesine bağlıdır. Gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği için optimum su sıcaklığının 21ºC'nin altında olması gerekir. Öldürücü sınır 25ºC-27ºC olup bu sıcaklık periyodunda hayvan kısa süre için hayatta kalabilir ancak gelişme gösteremez. Bu balıklar için gerekli olan minimum doymuş oksijen seviyesi yaklaşık olarak 5,5 mg/lt'dir. Bununla beraber suyun solüsyon içerisinde oksijen taşıma gücü; sıcaklık, basınç ve doymuş tuzlara bağlıdır. Daha yüksek sıcaklıklar, su içerisindeki oksijenin daha az olduğu gösterir. Gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliğinde sağım kuzey yarım kürede türlere bağlı olarak genellikle Ekim-Şubat ayları arasında yapılır. Yumurtalar açıldıktan sonra yavru balıklar yumurta sarısı kesesindeki içerikle birkaç hafta beslenir ve bunlara ‘‘yumurta sarısı fry'ı'' ya da ‘‘alevinler'' denir (Pillay 1990, Roberts ve Shepherd 2001).

Yetiştiricilik inkübasyon, erken yetiştirme ve devam eden gelişme olmak üzere 3 şekilde olmaktadır. İnkübasyon için geleneksel ahşap yavruluk tablaları, dikey inkübatörler kullanılmaktadır. Erken yetiştirme tankları ise dörtgen ya da daire şeklinde dizayn edilmektedir. Gökkuşağı alabalıklarında yapay üretim zamanı türlere göre değişmekte olup bulunduğu bölgenin sıcaklık koşullarına göre, Ocak-Mayıs ayları arasında üreme gösterirler. Üreme başlamadan en az 1 ay önce erkek ve dişi bireyler ayrı yerlere yerleştirilirler. Bunlar her gün denetlenerek üreme işine hazır olup olmadıkları saptanır. Olgunlaşmış erkek ve dişiler, karınları hafifçe sıkıldığında spermlerin ve yumurtaların kolayca dışarı çıkmasıyla anlaşılır. Yapay üretimle döl alınması; kuru ve yaş yöntem olmak üzere 2 yöntemle yapılır. Her iki yöntemde de kap içindeki yumurta ve sperm karışımı en az 5 dakika süre ile bir tavuk teleği yardımı ile iyice karıştırılır. Böylece bozuk ve kırık yumurtalar dışındaki sağlam yumurtaların tümünün döllenmesi sağlanır. Döllenmiş yumurtaların kuluçka dönemini geçirdiği kuluçkalıklar için değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın ve olağan biçimde olanı tekne kuluçkalıklardır. Tahta, beton, alüminyum ya da fiberglas malzemeler kullanılarak yapılan bu kuluçkalıklar genellikle 40cmx30cmx400cm boyutlarında olurlar. Teknelere verilecek suyun sıcaklığı çok önemlidir. Sağlıklı su sıcaklığı 9-12ºC arasındadır. Sudaki çözünmüş oksijen miktarının 8 ppm'den aşağı düşmemesine dikkat edilir. Yumurtadan çıkan yavrular keseli devrelerini geçirinceye kadar teknelerde bırakılırlar. Bu beton, fiberglas ya da seramik tekne veya yalaklar genellikle 50-100cm boyunda, 50cm derinliğinde ve 250-500cm uzunluğunda olurlar.

Teknelere verilen su temiz, berrak ve sıcaklığı 10-14ºC arasında olmalıdır. Yavrular bu devrede, göğüs bölgelerinde bulunan besin kesesinden beslenirler. Keseli yavru dönemi gökkuşağı alabalığı türü için 180 gün/derecedir. Keseli devre sonunda yavrular dışarıdan yem almaya başlar. Bu dönemde yavrulara yüksek düzeyde protein ve vitamin içeren yemler verilir. Yavrular 5-6 cm boya ulaşınca daha büyük havuzlara alınır. Olağan bir bakım ile 1. yılın sonunda gökkuşağı alabalıkları 25-30 cm'e, ağırlık olarak da 250 gr'a ulaşabilmektedir (Pillay 1990, Roberts ve Shepherd 2001).

2.2. Gökkuşağı Alabalığı Yavrularında Görülen Bakteriyel Enfeksiyonlar

Aeromonas salmonicida'nın neden olduğu furunkulozis hastalığı karakteristik olarak su sıcaklığının en yüksek olduğu zamanlarda sorun olsa da yılın değişik zamanlarında görülebilmektedir. Balıklarda yem alımı azalması haricinde herhangi bir bulgu görülmeden ölüm görülmektedir. Bu durum özellikle küçük balıklar arasında yaygındır. Enterik kızıl ağız hastalığı (ERM) gelişmekte olan gökkuşağı alabalıklarında yazın erken dönemlerinde beslenmeye ve yemlenmeye başladıkları zaman bir sorun oluşturur. Balıklarda durgunluk, vücut deri renginde koyulaşma ve yem alımında azalma görülür. Nekropside iç organlarda kanamalar görülmektedir. *Aeromonas* ve *Pseudomonas* türü bakteriler gerek doğal ortamlardan gerekse yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında sorunlara neden olmaktadır. Su sıcaklıklarının yüksek olduğu yaz dönemlerinde hastalıklar meydanda gelir. Balıklarda anüs civarı, sırt ve yan kısımlarında hemorajiler görülür. İç organlarında ise kanamalar ve böbreğin tamamen sıvı ile dolu olduğu görülür (Roberts ve Shepherd 2001).

Gökkuşağı alabalıklarını etkileyen bulaşıcı hastalıklar arasında Streptokok türlerinin neden olduğu hastalıklar da gelmektedir (Altun ve ark. 2004). *Streptococcus iniae* ve *Lactococcus garvieae* türleri balık streptokokkozis'in başlıca etkenleri olarak tanımlanmıştır (Shin ve ark. 2006).

2.3. Laktokokkozis

Lactococcus garvieae gökkuşağı alabalıklarında laktokokkozisin etiyolojik etkeni olup en önemli Gram-pozitif patojenik kok türleri arasında yer almaktadır. Etken, önceleri *Streptococcus* cinsi Streptococcaceae familyasına dahil iken, daha sonraları DNA-ribozomal RNA melezleme ve rRNA sekanslama çalışmalarına göre *Streptococcus, Enterococcus ve Lactococcus* olmak üzere üç cins şeklinde yeniden

sınıflandırılmıştır (Shin ve ark. 2006). *Lactococcus* cinsine dahil olan *L. garvieae* türünün bugüne kadar pisi (*Paralichthys olivaceus*), gökkuşağı alabalıkları (*O. mykiss*), tavşan balığı (*Siganus canaliculatus*) ve sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) dahil olmak üzere gerek deniz gerekse tatlı su balık türlerinden izole edildiği bildirilmiştir (Heo ve ark. 2001, Diler ve ark. 2002, Yuasa ve ark. 1999, Kusuda ve ark. 1976). Hastalık dünyanın birçok yerinde mevcut olup İspanya, Birleşik Krallık, Portekiz, İtalya, Fransa ve Türkiye'nin de dahil olduğu çeşitli Avrupa ülkelerindeki kültür gökkuşağı alabalıklarını etkilediği bildirilmiştir (Altun ve ark. 2004).

Laktokokkozis ilk kez 1990'lı yılların başlarında İspanya'da görülmüş, daha sonra ise Portekiz, Fransa, Türkiye, Yunanistan ve Bulgaristan dahil Avrupa'nın çeşitli bölgelerine hızlı bir şekilde yayılım göstermiştir (Savvidis ve ark. 2007). *L. garvieae* balıklar dışında inek, insan ve tatlı su karideslerinden (*Macrobrachium rosenbergii*) de izole edilmiştir. Bütün bunlar *L. garvieae*'nin önemini göstermektedir (Ravelo ve ark. 2002). Laktokokkozis etkilediği ülkelerde, özellikle alabalık kültüründe yılın sıcak dönemlerinde ciddi sorunlara yol açarak, toplam alabalık üretiminde %50-80'lere varan kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Savvidis ve ark. 2007, Soltani ve ark. 2008, Vendrell ve ark. 2006). Ülkemizde kok enfeksiyonları ilk kez 1997 yılında Çağırgan ve Tanrıkul tarafından bildirilmiş olup, sonraki yıllarda ise hastalık epizootikler oluşturarak, Diler ve ark. (2002) tarafından Muğla, Denizli, Antalya, Burdur ve Konya civarındaki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde de *L. garvieae* 'nin tespit edildiği ve ölüm oranlarının %80'lere kadar vardığı bildirilmiştir (Çağırgan ve Tanrıkul 1997, Diler ve ark. 2002, Altun ve ark. 2004).

Laktokokkozis hiperakut ve hemorajik septisemi olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte hastalığın gelişimi balıkların tutuldukları çevresel şartlara örneğin su sıcaklığına ve suyun mikrobiyolojik kalitesine bağlıdır. Salmonidlerde gözlenen klinik bulgular sarı kuyruk ya da gri kefal gibi diğer balık türlerinde görülen laktokokkozis bulgularına benzerdir. Hastalığın yoğun patolojisi hızlı ve genel iştahsızlık, melenozis, durgunluk, denge kaybı ve düzensiz yüzme ile başlar. Etkilenmiş balıklarda tipik dış bulgular ekzoftalmi (tek ya da çift taraflı), periorbital ve intraokuler bölgede, yüzgeçlerin taban kısmında, perianal bölgede ve operkulum yüzeyinde hemorajilerdir. Ayrıca etkilenmiş balıklarda karın kısmında şişkinlik ve anal prolapsus da görülür. Nekropside peritonal boşlukta asidik sıvı birikimi vardır. Bu sıvı purulent ya da kan içerebilir. Hastalıktan etkilenen başlıca organlar; dalak, karaciğer, beyin, barsak, böbrek ve kalptir. Etkilenmiş

balıklarda makroskopik lezyonlar, tipik hastalığın akut formunun göstergesi olup hava kesesi, barsak, karaciğer, karın zarı, dalak ve böbrekte hemorajiler görülür. Ayrıca dalakta büyüme, karaciğer ve dalakta fokal nekrotik bölgeler, perikarditis, barsakta hemorajik sıvı ve beyin yüzeyini kaplayan sarımsı renkli eksudat tipik olarak gözlenen bulgulardır (Vendrell ve ark. 2006).

L. garvieae'nin hareketsiz, fakültatif anaerobik, Gram-pozitif, katalaz ve sitokrom oksidaz negatif, 0,7 x 0,4 µm oval şekilli kısa zincirli yapıda koklar olduğu, 10–45^{0}C'de % 6,5 NaCI konsantrasyonunda ve pH'ın 4,5–9,6 olduğu optimal koşullarda ürediği ve koloni oluşturacak büyüklüğe ulaştıkları saptanmıştır. İzolatların; Eosin Metilen Mavisi (EMB), Mac Conkey besiyerlerinde üreyemediği, TSA (Triptik Soy Agar), Nutrient Agar (NA), Beyin Kalp İnfüzyon Agar (BHIA), safra-eskulin besiyerlerinde ürediği ve kanlı agar (koyun kanı ilave edilmiş)'da ise α-hemoliz oluşturduğu gözlemlenmiştir (Kitao 1993). Çizelge 2.1'de *L. garvieae*'nin fenotipik özellikleri verilmiştir.

Hastalığın nakli yatay yol ile olmaktadır. Balıklar arasında doğrudan nakil önemli olmaktadır. Dikey nakil ise bildirilmemiştir (Vendrell ve ark. 2006).

Gökkuşağı alabalıklarında laktokokkozis çıkışlarının kontrolünde en yaygın olarak kullanılan antibiyotikler eritromisin, oksitetrasiklin, amoksisilin ve düşük düzeyde doksisilindir. *L. garvieae*'nin referans suşlarının eritromisin'e hassas oldukları ve minimal inhibisyon konsantrasyonunun 0,12 µg/ml olduğu bildirilmiştir. Suşların iyodofor antibiyotiklerine hassasiyetleri de tanımlanmıştır. Naresin'in sadece *in vitro* olarak etkili olduğu bildirilmiştir. Farklı coğrafik bölgelerden gelen *L. garvieae* suşlarının hepsinin enrofloksasin ve nitrofurantoin'e hassas olduklarının ancak oksalinik asit ve sülfametoksazol/trimethoprim'e dirençli oldukları bildirilmiştir. Bununla birlikte sonuçlar eritromisin, kloromfenikol, oksitetrasiklin ve amfisilin için farklılık göstermiştir (Vendrell ve ark. 2006).

Çizelge 2.1. *L. garvieae*'nin fenotipik özellikleri (Vendrell ve ark. 2006)

Testler	Reaksiyon	Testler	Reaksiyon
Şekil	Oval kok	4ºC'de gelişme	+
Gram	+	20ºC'de gelişme	+
Hareket	-	37ºC'de gelişme	+
Hemoliz	α	45ºC'de gelişme	+
Oksidaz	-	Arjinin	+
Katalaz	-	Ornitin	-
TSI	A/A–	Lizin	-
O/F	F	Rafinoz	-
Nitrat	-	Arabinoz	-
Sitrat	-	Sorbitol	+
Üre	-	Mannitol	+
İndol	-	Galaktoz	+
Eskülin	-	İnositol	-
VP	+	Laktoz	+
H_2S üretimi	-	Riboz	d
Alkalin fosfat	-	Sükroz	d
pH 9.6	+	Ksiloz	-
6.5% NaCl	+	Nişasta	-

F: fermentatif, d: değişebilir, A/A:TSI vasatında asitlenme, +: pozitif, -: negatif

2.4.Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları

Antimikrobiyal; mikroorganizmalardan elde edilen, küçük dozlarda diğer mikroorganizmaları öldüren ve canlı organizmaya zararlı etkisi görülmeyen doğal veya sentezlenmiş maddedir. Bir antimikrobiyal ilaçta olması gereken en önemli özellik 'seçici toksik' etkidir. Seçici toksik etki; konağa zarar vermeden mikroorganizma çoğalmasının inhibe edilmesidir. Bakteri hücrelerinde önemli farklara sahip dört ana bölge vardır. Bunlar; hücre duvarı, hücre membranı, ribozomlar ve nükleik asittir. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları da temel olarak bu bölgelere yöneliktir ve dört türlü etki mekanizması olduğu kabul edilmektedir. Bu etki mekanizmaları; hücre duvarı sentezinin inhibisyonu, hücre membran fonksiyonunun inhibisyonu, protein sentezinin inhibisyonu ve nükleik asit sentezinin inhibisyonu'dur (Çolak 1999).

2.4.1. Bakterisidal ve bakteriyostatik aktivite

Bakterisidal bir ilaç bakterileri öldürür, bakteriyostatik bir ilaç ise bakterilerin çoğalmasını durdurur. Bakteriyostatik bir ilaç kullanıldığında; ilaç kullanımı kesildiğinde bakteriler tekrar üreyebilirler ve bu etki ile birlikte bakterileri öldürmek için fagositoz gibi konak savunma mekanizmalarıda gereklidir (Çolak 1999).

2.4.2. Antibakteriyel ilaçlar

Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar; beta-laktam antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar, beta-laktamaz inhibitörleri), glikopeptid antibiyotikler (vankomisin, teikoplanin), sikloserin ve basitrasindir. Protein sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar; 30S ribozomal alt üniteyi etkileyenler (aminoglikozidler, tetrasiklinler) ve 50S ribozomal alt üniteyi etkileyenler (kloramfenikol, makrolidler, linkozamidler)'dir. Nükleik asit sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar; prekürsör sentezini inhibe edenler, DNA sentezini inhibe edenler (kinolonlar) ve RNA sentezini inhibe edenler (rifampin)'dir. Hücre membran fonksiyonunu değiştiren antibakteriyel ilaçlar polimiksinler'dır. Etki mekanizması bilinmeyen antibakteriyel ilaçlar izoniazid ve metronidazol'dır (Çolak 1999).

2.4.2.1.Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar

Penisilinler: Penisilinler bir grup doğal ve yarı sentetik antibiyotiklerdir. Kimyasal olarak bir tiazolidin halkasına bir beta-laktam halkasının eklenmesi ile oluşan 6-aminopenisilanik asit nükleusu içerirler. Doğal penisilinler *Penicillium* türlerinden elde edilirler. Penisilinler, bakteri hücre duvarında transpeptidasyonu engelleyerek, peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Hücre duvarında penisilin bağlayan protein (PBP) reseptörlerine bağlanırlar. Penisilin etkisi ile bakteri hücrelerinde murein (peptidoglikan) hidrolaz denilen otolitik enzimlerde aktive olarak peptidoglikanı parçalar. Penisilinler, bakterisidal etkilidir, ancak etki göstermeleri için bakterilerin çoğalma dönemlerinde olmaları gerekir. Çoğalma döneminde yeni peptidoglikan sentezi ve transpeptidasyon olayı söz konusudur. Penisilinler, Gram-pozitif mikroorganizmaların çoğuna, bazı Gram-negatif ve anaerobik mikroorganizmalar etkilidir. Penisilin G (benzilpenisilin) bilinen en önemli doğal penisilindir. Tüm penisilinlerde ortak olan 6-aminopenisilanik asit nükleusuna, benzil yan zincirinin eklenmesi ile oluşur (Çolak 1999).

Sefalosporinler: Sefalosporinler, *Cephalosporium acremonium*'un fermentasyon ürünlerinden elde edilirler. Ancak, sefoksitin, *Streptomyces*'ten elde edilir. Sefolosporinler bir beta-laktam halkası ile dihidrotiazin halkasının birleşmesinden oluşmuş 7-aminosefalosporanik asit nükleusunu içerir. Bu yapıya değişik yan ürünlerinin bağlanması sefalosporinlerin antibakteriyel aktivite ve farmokinetik özelliklerini değiştirmektedir. Sefalosporinler de penisilinler gibi bakteri hücre duvarının peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Sefalosporinler bakterisidal etkilidirler (Çolak 1999).

Karbapenemler: Yapıları penisilin ve sefalosporinlerden farklıdır. Halkada sülfür veya oksijen atomları yerine hidroksietil yan zinciri bulunur. Karbapenemler Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerdeki PBP1 ve PBP2'ye bağlanarak, bakteri hücresinin lizisine neden olur. Genellikle beta-laktamazlara dirençlidirler (Çolak 1999).

Monobaktamlar: Monobaktamlar bir beta-laktam halkasından oluşurlar, monosiklik yapıdadırlar. Gram-negatif aerobik bakterilerde PBP3'e bağlanarak, bakterinin hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Enterobacteriaceae familyası ve *Pseudomonas* gibi pek çok Gram-negatif basile etkilidirler. Ancak Gram-pozitif ve anaerobik bakterilere karşı etkisizdirler. Beta-laktamazların çoğuna dirençlidirler (Çolak 1999).

Beta-laktamaz inhibitörleri: Klavulanik asit; zayıf antibakteriyel etkili bir maddedir ve *Streptomyces clavuligerus* kültürlerinden elde edilmiştir. Stafilokokların ve diğer Gram-negatif bakterilerin ürettikleri beta-laktamazları inhibe eder. Beta-laktamaz ile birleşip, geri dönüşümsüz acil enzim kompleksini oluşturarak, beta laktamaz enziminin aktivitesini yok eder. Sulbaktam; sulbaktam zayıf antibakteriyel aktiviteye sahip yarısentetik bir 6-dezaminopenisilin sülfon'dur. Beta-laktamaz enzimlerini inhibe eder. Penisilin ve sefalosporinlerle sinerjsitik etkilidir. Klavulanik asit ile benzer olarak, bazı beta-laktamazları inhibe edemez. Tazobaktam; yapısal olarak, sulbaktama benzeyen bir penisilanik asit sülfon derivesidir. PBP1 ve PBP2'ye bağlanarak, beta-laktamazları inhibe eder. Tek başına antibakteriyel etkisi zayıftır (Çolak 1999).

Glikopeptidler: Vankomisin, *streptomyces orientales*'den elde edilen trisiklik bir glikopeptiddir. Glikopeptid antibiyotikler bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezi sırasında pentapeptid yan zincirlerinde bulunan D-alanil-D-alanin dipeptidi ile

birleşerek, peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Glikopeptid antibiyotikler aerob ve anaerob Gram-pozitif bakterilere etkilidir (Çolak 1999).

Sikloserin ve Basitrasin: Sikloserin, D-alanin aminoasidinin analogudur ve D-alanil-D-alanin dipeptidinnin sentezini inhibe eder. Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilere karşı etkilidir. Basitrasin, siklik polipeptid bir antibiyotiktir. Peptidoglikan sentezi sırasında peptid zincirinin hücre membranından taşınmasını önler ve hücre duvarı sentezi inhibe olur (Çolak 1999).

2.4.2.2. Protein sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar

Aminoglikozidler: Kimyasal yapı olarak, amino şekerlerin bir aminosiklitol halkasına glikozidik bağlarla bağlanması ile oluşurlar. Aminoglikozidler iki yoldan bakterisidal etki gösterirler. İlki, bakterinin 30S ribozomal alt ünitesine geri dönüşümsüz bağlanarak, protein sentezini inhibe ederler. Aminoglikozidlerin bağlandığı ribozomlarda protein sentezi sırasında mRNA'nın translasyonu gerçekleşmez ve bu durum bakterinin ölümüne yol açar. Diğer yol ise, genetik kodun yanlış okunmasına yol açarlar. Aminoglikozidlerin etkili olabilmeleri için hücre içine yeterli miktarda girebilmeleri gereklidir. Beta-laktamlar ve vankomisin gibi antibiyotikler hücre duvarı sentezini inhibe ederek, aminoglikozidlerin hücre içine girişlerini arttırırlar. Bu ilişki; beta-laktam antibiyotikler ile aminoglikozidler arasındaki sinerjistik ilişkinin temelidir (Çolak 1999).

Tetrasiklinler: Tetrasiklinler geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Kimyasal yapılarında hidronaftasen nükleusu bulunmaktadır. Tetrasiklinler bakteriyostatik etkilidirler. Bakteri hücresinin içine girdikten sonra 30S ribozomal alt üniteye geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Bu durum; tRNA'nın ribozoma bağlanmasını önler ve sonuçta protein sentezi inhibe olur (Çolak 1999).

Kloramfenikol: Kloramfenikol *Streptomyces venezuela*'dan elde edilir. Bakterisidal etkilidir. 50S ribozomal altüniteye bağlanarak, peptidiltransferaz etkisini, dolayısı ile yeni peptid bağlarının sentezini önler, sonuçta protein sentezi inhibe olur. Seçici etkisi ribozomal düzeydedir. Pekçok aerobik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, anaerobik bakterilere karşı etkilidir (Çolak 1999).

Makrolidler: Bu grubun prototipi eritromisin'dir. Kimyasal yapısında 13 karbonlu makrosiklik lakton halkasına glikozidik bağlarla iki şeker eklenmiştir. Eritromisin *Streptomyces erythreus*'tan elde edilir. Makrolidler, bakteriyel RNA'ya bağımlı protein sentezini inhibe eden genellikle bakteriyostatik etkili ilaçlardır. Yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal etkili olabilirler. 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak, translokasyon reaksiyonunu bloke ederler ve peptid zincirinin uzamasını önlerler. Gram-pozitif ve bazı Gram-negatif bakterilere, Mycoplasma, Chlamydia ve Rickettsia türlerine etkilidirler (Çolak 1999).

Linkozamidler: Bu grupta linkomisin ve klindamisin bulunur. Linkomisin *Streptomyces lincolnensis*'ten izole edilmiştir. Klindamisin ise linkomisin'in kimyasal yapısında yapılan bir değişiklikle elde edilmiştir. Linkozamidler bakteri hücrelerinde 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak, protein sentezini inhibe ederler ve sonuçta peptid zincirinin uzaması önlenmiş olur. Linkozamidler; aerobik Gram-pozitif koklara ve anaerobik bakterilere etkilidirler (Çolak 1999).

2.4.2.3. Nükleik asit sentezini inhibe eden antibakteriyel ilaçlar

Sulfonamidler ve Trimetoprim: Sulfonamidler, sulfanilamid deriveleridir ve kimyasal yapıları bakteriyel folik asit sentezinde gerekli olan paraaminobenzoik asit (PABA) ile benzerdir. PABA, bir pteridin bileşiği ile birleşerek, dihidropteroik asit oluştururlar. Dihidropteroik asit tetrahidrofolik asit prekürsörüdür. Trimetoprim sıklıkla bir sulfonamid olan sulfametoksazol ile kombine kullanılır, her iki ilaç farklı bölgelere etki ederek, bakterilerdeki folik asit metabolimasını bozarlar. Bu kombinasyonun avantajları; sinerjistik etki elde etme ve ilaçlardan birine dirençli olan bakteriyel mutantların diğer ilaç ile inhibe edilmesidir. İlaçların birlikte oluşturdukları etki, tek başlarına oluşturdukları etkiden daha fazladır. Sulfonamidler, PABA ile kompetitif olarak dihidrofolat sentezini inhibe ederler. TMP ise dihidrolat redüktazını inhibe ederek, dihidrofolattan tetrahidrofolat sentezlenmesini engeller. Sonuçta, bakteriyel DNA sentezi bloke olur. Sulfonamidler, pek çok Gram-pozitif, Gram-negatif bakteri türlerine, Actinomyces, Chlamydiae, Toxoplasma ve Plasmodium'lara etkilidir. TMP-SMX kombinasyonu; stafilokoklar ve streptokoklar da dahil olmak üzere pek çok Gram-pozitif koka ve *P. aeruginosa* hariç pek çok Gram-negatif basile etkilidir (Çolak 1999).

Kinolonlar: İki halkalı kinolon (naftiridin) nükleusunu içeren antibiyotiklerdir. Nalidiksik asit grubun ilk örneğidir. Bakterisidal etkilidirler. Kinolonlar, bakterilerde DNA'nın süper sarmal oluşturması için gerekli olan DNA giraz enzimini inhibe ederler. Gram-negatif basiller ve Gram-negatif koklar üzerinde etkilidirler (Çolak 1999).

Rifampin: Rifampin, *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifampisin B'nin yarı sentetik derivesidir. Bakterisidal etkilidir (Çolak 1999).

2.4.2.4. Hücre membran fonksiyonunu değiştiren antibakteriyel ajanlar

Polimiksinler: *Bacillus polymyxa*'dan elde edilen polipeptid antibiyotiklerdir. Deterjanlara benzer şekilde, bakteri hücre duvarı membranındaki fosfolipidlerle ilişkiye girerek, geçirgenliği arttırırlar ve hücresel bütünlüğü bozarlar. Sonuçta, hücre ölümü olur. Etki spektrumları sınırlıdır ve toksik ilaçlardır (Çolak 1999).

2.4.2.5. Etki mekanizmaları bilinmeyen antibakteriyel ilaçlar

Bu gruba İzoniazid ve metronizadol grubu ilaçlar girmektedir (Çolak 1999).

2.5. Balık Hastalıklarının Tedavisi ve Antibiyotik Kullanımı

Balıkların stresli koşullara maruz kaldıkları yoğun balık işletmelerinde bakteriyel hastalıklar çoğu kez oluşmakta ve ciddi ekonomik kayıplar ile sonuçlanmaktadır. Bu gibi durumlarda, antibakteriyel ilaçlar genellikle balıkların bakteriyel hastalıklarını tedavi etmek amacı ile kullanılmaktadır. Bununla birlikte, patojenik bakteriler uzun süreler için antibakteriyel ilaçlara maruz kalırlarsa bakterilerde çoğu kez ilaca karşı direnç gelişecek ve bu durum enfeksiyonların tedavi edilmelerini güçleştirecektir. Üstelik, antibakteriyel ilaçların balık tarafından tüketilmeyen kısmı genellikle balık işletmelerinin bulunduğu suya ve sedimente verilmekte bu durum işletmenin bulunduğu bölgede su kalitesi sorunlarına ve mikrobiyal faaliyetlerin azalmasına neden olacaktır. Bu nedenle, antibiyotiklerin kullanımı pek çok ülkede ciddi bir şekilde kontrol edilmekte olup, antibiyotiklerin kullanımının en aza indirilmesine çalışılmaktadır (Sugita ve ark. 2002). Hastalık; balıkların ve diğer sucul canlıların normal fizyolojik fonksiyonlarını bozan herhangi bir durum olmakla birlikte, kültür koşullarında hastalıkların ortaya çıkması, balık ölümlerinden dolayı yatırım kaybına, tedavi masraflarına ve balıkların iyileşme dönemi esnasında azalan gelişmeleri sebebi ile üretim maliyetinde artışa neden olmaktadır. Doğal koşullarda, balık hastalıkları ile

ilgili sorunlarla daha az karşılaşılır çünkü zayıf hayvanlar avcıları tarafından çabucak populasyondan uzaklaştırılırlar. Ek olarak, balıklar doğal sistemlerde kafeste tutulmalarına göre daha az kalabalık olarak bulunurlar. Doğal şartlar altında, parazitler ve bakteriler düşük öneme sahiptirler ancak hayvanlar kalabalık halde bulunduklarında ve stresli olmaları halinde bu mikroorganizmalar önemli sorunlara neden olabilirler. Balık sağlığı yönetimi; balık hastalıklarını önlemek için oluşturulan yönetim uygulamalarını tanımlar. Balıklar birkez hastalandıkları vakit, kurtarmak güç olabilmektedir. İyi su kalitesi idaresi, besin ve sanitasyon balık hastalıklarını önler. Bu temel olmaksızın, fırsatçı patojenlerden kaynaklanan hastalık çıkışlarını önlemek imkansızdır. Hastalık; çevre, patojen ve konakçı-balık arasındaki karşılıklı etkileşimden sonuçlanmaktadır. Balıklar bakteriler, mantar ve parazitler dahil potansiyel patojenler ile sürekli etkileşim halindedirler. Yetersiz su kalitesi, yetersiz besin ya da genellikle stresli şartlar ile alakalı baskılanmış bağışıklık sistemi bu potansiyel patojenlerin hastalığa yol açmasına izin verir. Balıkların davranışlarını ve beslenme faaliyetlerinin günlük olarak gözlenmesi, sorunların erken dönemde tespitine izin verir. Böylece hastalıkların teşhisi populasyonun çoğunluğu hastalanmadan yapılabilir. Balıklar iyi haldeyken hastalığın erken devresinde başarılı tedaviye başlanılmış olunur (Parker 2002).

Antibiyotik adı altında bazı küf, mantar ve bakteri gibi mikroorganizmaların meydana getirdikleri ve diğer canlılara her şeyden önce bakterilere ve diğer mikroorganizmalara zehirli etkisi bulunan maddeler anlaşılmaktadır. Bu durumda antibiyotikler; orjini bakteri, küf ve mantar olan maddelerdir (Timur ve Timur 2003).

Kültür balıkçılığının gelişmesiyle birlikte bakteriyel kökenli balık hastalıkları da, ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalığın şiddeti, balığın yaşına ve türüne göre değişmekle birlikte balıklardaki birçok enfeksiyonun tedavisi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Ancak çevre şartlarının olumsuzluğu balıkların hastalıktan korunmasını ve kontrol önlemlerinin alınmasını zorlaştırmakta, hatta imkansız hale getirebilmektedir (İspir ve ark. 2004). Balıklarda görülen bakteriyel hastalıklarla mücadelede başvurulan yöntemlerin başında antibiyotik uygulaması gelmektedir (Serezli ve ark. 2005). Balıklarda görülen bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanların immun sistemi baskıladığı, gastro-intestinal sistemde bozukluğa, viruslarla süper enfeksiyonlara, nefro toksititeye, protein sentezini inhibe ettiği için büyümede yavaşlamaya, sucul mikroorganizmalarda direnç, çevresel

problemler ve sağaltım sonrası ilaç kalıntısına neden olduğu bildirilmektedir (Grondel ve ark. 1987, Björklund ve ark. 1991, Van Der Haidjen ve ark. 1991, Inglis ve ark. 1996).

2.5.1. Kültür balıkçılığında bakteriyel hastalıkların kontrolünde ve tedavisinde kullanılan antibiyotikler

2.5.1.1. Oksitetrasiklin (Terramisin)

Kükürt sarısı renkli bir maddedir. Bakteriyel hastalıkların tedavisinde daha çok banyo ve yem içinde kullanılan ilacın karın içi (i.p) kullanılması da mümkündür. Furunkulozis, vibriozis ve yersiniozis gibi hastalıkların tedavisinde 7.5 g ilaç/100 kg balık/gün dozunda 5-10 gün süre ile kullanılması tavsiye edilmektedir. Banyo için 10-12 mg ilaç 1 L suda eritilerek, 40-45 dakika süre ile hasta balıklar banyo ettirilirler (Timur ve Timur 2003).

2.5.1.2. Oksalinik asit

Pseudomonad, vibriozis ve yersiniozis enfeksiyonlarının tedavisinde saf dozu 1 g ilaç/100 kg balık/gün dozunda 10 gün süre ile kullanılmaktadır. Furunkulozis için tavsiye edilen doz 1 g/100 kg balık/gün dozunda 10 gün süre iledir (Timur ve Timur 2003).

2.5.1.3. Kloromfenikol (Kloromisetin)

Streptomyces venezuella adı verilen bir mantardan elde edilmiştir. 1949 yılında sentetik olarak üretilmiştir. Üretilen sentetik kloromisetin'e kloromfenikol adı verilmektedir. Geniş bir antibakteriyel etkiye sahiptir. Bakteriyel hemorajik septisemi, sazanların dropsi hastalığında, furunkulozis ve vibriozis tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Furunkulozis'in tedavisinde 5-7 g ilaç/100 kg balık/gün dozunda; vibriozis'in tedavisinde 5 g ilaç/100 kg balık/gün dozunda yem içinde tavsiye edilmektedir. Balıklarda direnç oluşturma etkisinin yemeklik balıklara taşınması nedeni ile bazı ülkelerde yemeklik balıkların tedavisinde kullanılması yasaklanmıştır (Timur ve Timur 2003).

2.5.1.4. Eritromisin

Bakteriyel böbrek hastalığında yeme karıştırılan bir antibiyotiktir. Hasta balıkların tedavisinde 100 mg/kg balık/gün dozunda 7-10 gün süre ile kullanılır (Timur ve Timur 2003).

2.5.1.5. Kanamisin

Balıkların tüberküloz hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde yem içerisine karıştırılarak kullanılan bu ilaç 50-75 mg/kg balık/gün dozunda 10 gün süre ile başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Timur ve Timur 2003).

2.5.1.6. Flumekuin

Yersiniozis, vibriozis ve furunkulozis gibi bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. 50-75 mg ilaç/kg balık/gün dozunda bir hafta süre ile tavsiye edilir (Timur ve Timur 2003).

2.5.1.7. Furazolidon

Sarı renkli bir tozdur. Antibakteriyel aktivitesinden başka furazolidon sindirim kanalı paraziti *Hexamita* adı verilen protozoan parazitin tedavisinde de kullanılabilir. 11 g/ 100 kg balık/gün dozunda 5-10 gün süre ile yem içerisinde kullanılması tavsiye edilmektedir. Genellikle furunkulozis, vibriozis, pasteurellozis gibi bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde sıkça kullanılan bu kemoterapatik madde hasta balıklara 75-100 mg/kg balık/gün dozunda 10-15 gün süre ile yem içerisinde verilebildiği gibi 100-250 mg ilaç 1 litre suya karıştırılarak, 1 saat süre ile banyo şeklinde de kullanılabilir (Timur ve Timur 2003).

2.6. Antimikrobiyal Ajanların *İn Vitro* Aktiviteleri

Antimikrobiyal ajanın etken mikroorganizma üzerine in vitro aktivitesi hastalığın tedavisinde göz önüne alınması gereken faktörlerden birisi olmaktadır. Bir antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için uygulanan in vitro işlemlere genel olarak duyarlılık testleri adı verilmektedir. Antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Direnç fenotipinin belirlendiği yöntemler ve genotipik yöntemler olarak iki genel başlıkta toplanabilir. Direnç fenotipinin belirlendiği yöntemlere inhibitör aktivite ile ilgili testler, katı veya sıvı besiyerinde sulandırım (dilüsyon) yöntemi, disk difüzyon yöntemi, E testi ve antimikrobiyal ajanları

inaktive eden enzimlerin saptanması'dır. Genotipik yöntemler ise doğrudan direnç genlerinin saptanabildiği yöntemlerdir (Gülay 1999).

2.6.1. İnhibitör aktivite ile ilgili testler

Sulandırım yöntemleri katı veya sıvı besiyerinde uygulanabilmekte ve in vitro duyarlılık testleri arasında 'altın standart' olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde standart sayıda bir bakteri topluluğu (inokulum) iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda antimikrobiyal ajan ile karşılaştırılır. İnkübasyon süresi (18 saat) sonunda gözle görülür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobiyal ilaç yoğunluğu saptanır. Buna 'Minimal İnhibitör Konsantrasyon' denir ve g/ml şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek için bulunan konsantrasyon duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK bu sınırdan düşük ise mikroorganizma söz konusu ajana duyarlı olarak değerlendirilir. Her antimikrobiyal ajan için ayrı bir sınır değeri söz konusudur. Sıvı besiyerinde sulandırım yöntemleri, tüpte uygulanıyorsa makro (tüp) dilüsyon, mikrotitrasyon plaklarında küçük hacim kullanılarak uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır. Disk difüzyon yönteminde, belirli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı ölçülerek, her antibiyotik için farklı olabilen duyarlılık sınırı değeri ile karşılaştırılır. İnhibisyon alanının büyüklüğüne göre duyarlı, orta veya dirençli şeklinde duyarlılık kategorisi belirlenir. Disk difüzyon yöntemi sulandırım temelli yöntemlere kıyasla daha kolay ve ucuzdur. Bu nedenlede rutin laboratuar uygulamalarında sık olarak kullanılmaktadır. E testi; yayılım temeline dayanan ancak diskler yerine plastik striplerin üzerinde bulunan antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği yeni bir antimikrobiyal duyarlılık yöntemidir. Stripin bir tarafında ilaç belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde ve kurutulmuş olarak bulunmaktadır. Diğer yüzünde de antimikrobiyal ajanın stripin ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmıştır. Standart bakteri inokulumu katı ve test için uygun besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra stripler yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Günümüzde bu yöntem ile ilgili en önemli sorun maliyettir (Gülay 1999).

2.7.Plazmitler

Plazmitler 4-400 kilobazlık sirküler yapıda, çift sarmallı DNA içeren ekstra kromozomal genetik elementlerdir. Bağımsız ve kendi kendilerine çoğalabilirler. Replikasyon için bir orjine ve konakçı bakteri içinde devalı kalabilmesini kolaylaştıracak genlere ihtiyaçları vardır. Bazı plazmitler özellikle büyük olanlar konjugatiftir (R plazmitler). Konjugatif plazmitler ayrıca kendilerinin transferini sağlayacak ilave genlere de ihtiyaçları vardır. Bazı küçük plazmitler birlikte var olduğu konjugatif plazmitin konjugasyon aparatını kullanarak kendi transferlerini sağlayabilirler. Bir bakteride spesifik bir plazmitin birden fazla kopyası olabileceği gibi farklı birden fazla plazmit de aynı bakteride olabilir. Ancak birbiri ile yakın ilişkisi olan plazmitler çoğunlukla aynı bakteride olmazlar. Plazmitler bakterilere antibiyotik direnci yanında bakterinin virülansını ve metabolik kapasitesini değiştirebilecek fonksiyonlar da kazandırabilirler (Thompson 1986). Plazmitler antibiyotik direncinin hızla yayılmasına yol açabilirler. Bu yayılımı birkaç yolla yapabilirler. Spesifik bir organizmanın tek bir nokta mutasyon veya dirençli bir plazmitin kazanılması ile dirençli hale gelebilir. Meydana gelen bu dirençli organizma spesifik yerlere özellikle iyi adapte olabilmesini sağlayan genlere sahiptir ve böylece genişçe yayılabilme yeteneğindedir. Tek bir klon birden fazla veya tekrarlı antibiyotik direnç salgınlarından sorumlu olabilir. Konjugatif plazmitler bir türden diğer bir türe transfer olabilirler ve daha önce hassas olan türlerde yeni antibiyotik direnci salgınlarının ortaya çıkmasına yol açabilirler. Plazmitlerdeki direnç genleri küçük mobil genetik elementler (transposonlar, integronlar, gen kasetleri gibi) içinde yerleşebilirler ve bazen direnç topluluğundaki diğer direnç genleri ile bağlantılı plazmitlere veya kromozomlara geçebilirler. Bu şekilde birbiri ile ilişkisiz birden fazla ilaca karşı eş zamanlı direnç gelişebilir (çoklu ilaç direnci) (Rossolini ve Mantengoli 2005). Plazmitlerin antibiyotik dirençle ilgileri yanında, plazmit DNA'nın balık hastalıkları ile ilgili olarak koruyucu amaçlı aşıların geliştirilmesinde de kullanılabileceği bildirilmiştir (Lorenzen 2004).

Laktokokkozis ile ilgili yapılmış daha önceki çalışmalar;

Öztürk ve ark. (2009), doğal enfekte gökkuşağı alabalığında görülen Laktokokkozis hastalığı ve etken *L. garvieae*'nin antibakteriyel duyarlılığını incelemişlerdir. Hasta gökkuşağı alabalıklarında durgunluk, iştahsızlık, renkte koyulaşma, tek ya da çift taraflı ekzoftalmi, korneada opaklaşma, gözlerde, pektoral ve anal yüzgeç tabanlarında hemoraji, karında şişkinlik, vücut yüzeyinde yaraların olduğu belirtilmiştir. Nekropside vücut boşluğunda kanlı-renkli bir sıvının varlığı, barsak ve midede sarı berrak renkte sıvı ile karakterize asites, dalak ve böbrekte büyüme, renklerinde koyulaşma, karaciğerde büyüme ve renginde açılma ve peteşiyel kanamaların olduğu tespit edilmiştir. Hasta balıkların dalak, böbrek ve karaciğerinden yapılan bakteriyolojik ekim çalışması sonucunda izole ettikleri bakteri suşlarının *L. garvieae* olarak tanımlamışlardır. Antibakteriyel duyarlılık testleri ile *L. garvieae* izolatlarının amoksisillin, amoksisillin/klavulanik asit, sefalotin, kloramfenikol, doksisiklin, enrofloksasin, pristinamisin, tetrasikline karşı duyarlı; apramisin, sefoperazon, kolistin, kotrimoksazol, eritromisin, flumekuin, fusidik asit, gentamisin, kanamisin, linkomisin, metronidazol, nitrofurantoin, oksasillin, oksolinik asit, penisilin, rifampisin, spektinomisin, streptomisin, sulfamethizol, tiylosin'e karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir.

Soltani ve ark. (2008), İran'da kültür gökkuşağı alabalıklarında *L. garvieae*'nin neden olduğu laktokokkozisten etkilendiğini bildirmiştir. Araştırmacılar hastalık çıkışının yüksek su sıcaklıkları (14ºC'nin üstü), yetersiz bakım gibi su kalitesi ile alakalı olduğunu bildirmişlerdir. Hasta balıklardan izole edilen bakteri suşlarının fenotipik ve moleküler çalışmaları suşların *L. garvieae* ve *Streptococcus iniae* olduğunu ancak *L. garvieae*'nin daha sıklıkla izole edildiğini bildirmiştir.

Özer ve ark. (2008), Mersin ilinde faaliyet gösteren yedi gökkuşağı alabalığı işletmelerinde Ocak-Aralık 2005 tarihleri arasında yaptıkları çalışma sonucunda ilkbahar ve yaz mevsimlerinde *L. garvieae* türünü izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hasta balıklarda renkte kararma, tek ya da çift taraflı ekzoftalmi, gözde matlık, solungaçta anemi ve karaciğerde hemoraji gibi bulguların gözlendiğini bildirmişlerdir. *L. garvieae* izolatlarının streptomisin (%42.86), enrofloksasin(%35,71), neomisin (%28.57), eritromisin (%14.29) ve sulfametoksazol-trimetoprim (%7.14) sırasına göre duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Savvidis ve ark. (2007), Yunanistan'daki gökkuşağı alabalıklarında su sıcaklığının 14ºC'nin üstüne çıktığında %40'lara varan ölüm oranlarının olduğunu bildirmiştir. Etkilenen balıkların 20 gr üstü olup yapılan fenotipik tanı testleri ve polimeraz zincir yöntemi (PZR) ile hastalık etkeninin *L. garvieae* olduğunu bildirmiştir. Etkenin soğuk kış aylarında endoftalmik sıvıda bulunduğu ancak iç organlarda bulunmadığı, bu bulgunun önemli olduğunun çünkü gözün kış aylarında mikroorganizmanın bulunduğu organ olduğu belirtilmiştir.

Kubilay ve ark. (2005), 9 farklı *L. garveiae* suşlarını Mueller-Hinton agarda disk diffüzyon tekniği ile antimikrobiyal duyarlılıklarının tespiti çalışmalarında *L.garvieae* suşlarının; amoksilin+klavulanik asit, amfisilin, enrofloksasin, tetrasiklin, doksisiklin, kloromfenikol, eritromisin, nitrofurontoin, sefalotin, amoksisilin, sefoperazon, spektinomisin, pristinamisin, kotrimoksazol antibiyotiklerine duyarlı olduklarını, kanamisin, sefuroksim, linkomisin, penisilin, ofloksasin, norfloksasin, siprofloksasin, seftriakson, klindamisin, vankomisin, oksasilin, streptomisin, trimethoprim+ sülfametoksazol, gentamisin, apramisin, tilosin, kolistin, sülfametizol, flumekuin, okzolinik asit antibiyotiklerine dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Çağırgan (2004), alabalıklardan izole edilen 20 *L. garvieae* suşunu fenotipik özellikleri, serolojik özellikleri ve kapsül oluşumu yönünden incelemiştir. İzolatlar API 20 Strep API 50 CH ve klasik bakteriyolojik yöntemlerle identifiye edilmiştir. Suşların tamamının kapsullü olduğu, kapsullü İspanya suşuna karşı hazırlanmış antiserum ile aglutine olduğu görülmüştür. Sonuçlar Türkiye'den yapılan izolatların homojen ve biyotip 3 olduğunu ve İspanya'dan yapılan izolatlatlarla da birbirine yüksek oranda benzediğini ortaya koymuştur. Klasik bakteriyolojik incelemede izolatların %40'ının laktozdan asit oluşturabildiği görülmüştür.

Pereira ve ark. (2004), 2002 yılının Haziran-Ekim ayları arasında Portekiz'in kuzeyinde bulunan dört gökkuşağı alabalığı işletmesinde yüksek mortalitelerin görüldüğü bazı hastalıkların çıkışlarını bildirmiştir. Etkilenen balıkların 5 gr ile 200 gr arasında değiştiğini en çok etkilenmenin 100 gr üstündeki ağırlıklarda olan balıklarda görüldüğünü bildirmiştir. Etkilenen balıkların *L. garvieae*'nin izole edildiği hasta balıklarda perioküler hemorajiler ile tek ya da çift taraflı ekzoftalmi ve bazı vakalarda göz kaybı bildirilmiştir. İç bakıda ise karın boşluğunda asidik sıvı birikimi, karaciğer ve kasta ise hemorajiler bildirilmiştir. Bakterilerin tanımlanmasında fenotipik ve PZR yöntemi kullanılıp bu hastalığın Portekiz'deki alabalık kültürünü sınırlayıcı başlıca

etken olduğunu bildirmiştir.

Altun ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada 8 *L. garvieae* izolatını PZR ve DNA sekanslama ile genotipik olarak, fenotipik tanı testleri ve API 32 Strep sistemi ile fenotipik olarak tanımlamışlardır. 8 izolatın 4'ü Türkiye'den, 2'sinin İspanya'dan, 1'inin İngiltere'den ve diğer birinin Amerikan tip kültür koleksiyonu 43921'den olduğunu belirtmişlerdir. Suşların fenotipik özelliklerinin tipik olduğunu 5 izolatın 16S rDNA sekans analizinin ise referans suşla %100 benzerlik gösterdiğini oysaki İspanya'dan 2, Türkiye'den 1 suşun ise GenBank Data (EMBL) kabul No:X54262 ile kıyaslandığında *L. garvieae* ile %99 uyumlu olduğunu göstermiştir.

Tükel ve Akçelik (2000), laktokok suşlarının laktoz plazmitlerinin tanımlanması amacı ile yaptıkları çalışma sonucunda laktoz plazmitlerinin moleküler büyüklüklerinin 26,3-38,5 kb arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Balık örneklerinin temin edildiği işletmeler

Çalışmada incelenen hasta gökkuşağı alabalığı yavruları Fethiye bölgesinde faaliyet gösteren 3 farklı ticari alabalık işletmesinden temin edilmiştir. Örneklemeler ilgili işletmelerin hastalık çıkışlarını bildirdiği Şubat ve Mayıs (2010) aylarında olmak üzere her ay yapılmıştır. Örneklemenin yapıldığı işletmelerde kullanılan sular; kaynak suyu olup işletme verilerine göre su sıcaklığının 8-12ºC, pH'ının 7.6-8.1 ve çözünmüş oksijen miktarının 7.2-10.2 mg/lt arasında değişiklik gösterdiği görülmüştür.

3.1.2. Balık örneklemesi

Hastalık belirtileri gösteren balıklar seçilerek incelenmiştir. Çalışma boyunca toplam 50 adet gökkuşağı alabalığı yavrusu ile çalışılmıştır. Balık örneklerinin ortalama ağırlığı 12.8 gr'dır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan besi yerleri, kimyasal maddeler ve antibiyotikler

Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) Agar (Merck), Tryptic Soy Agar (Merck), Brain Heart Infusion Agar (Merck), Mueller- Hinton Agar (Merck), Triple Sugar Iron Agar (Merck), Simmon's Citrate Agar (Merck), Nutrient Buyyonu (Merck), MR-VP Buyyonu (Merck), OF Bazal Vasatı (Merck), Agar (Merck), Nişasta (Sigma), Tripton (Sigma), Pepton (Merck), D-(+)- Glukoz, D-(+)- Galaktoz (Sigma), D-(-)- Fruktoz (Sigma), D-(+)- Mannoz (Sigma), Laktoz (Merck), Kanada balzamı (Merck), Bromtimol mavisi (Merck), Sodyum klorür (Merck), Potasyum hidroksit (KOH) (Riedel-de Haën), Potasyum fosfat (K_2HPO_4) (Sigma), Hidrojen peroksit solüsyonu (%0,3 H_2O_2) (Fluka), Gliserol (Merck), Etil alkol (Tekkim) (yerli üretim), Sıvı Parafin (Merck), Ampisilin 10µg (Oxoid), Eritromisin 15 µg (Oxoid), Basitrasin 0.04 µg (Oxoid), Flumekuin 30µg (Oxoid), Furozolidon 15 µg (Oxoid), Kanamisin 30 µg (Oxoid), Kloromfenikol 30 µg (Oxoid), Nalidiksik asit 30 µg (Oxoid), Oksalinik asit 2 µg (Oxoid), Streptomisin 10 µg (Oxoid), Sülfametoksazol 25 µg (Oxoid), Oksitetrasiklin 30 µg (Oxoid), Tetrasiklin 30 µg (Oxoid), Trimethoprim 5 µg (Oxoid), O/129 Vibriostat (10 µg $disk^{-1}$ /150 µg $disk^{-1}$) (Oxoid), Gram boyama seti (Merck), EDTA molecular biology grade (Applichem), Sigma 7-9®≥99% (titration),crystalline

(Sigma), Trizma®base Primary Standard and Buffer≥99.9% (titration), crystalline (Sigma), Lauryl sulfate (SDS) (Amresco), Phenol-chloroform-isoamyl alcohol molecular biology grade (Applichem), Sodium dodecyl sulfate molecular biology grade (Applichem), Tris-Acetate-EDTA buffer Solution (Sigma), Lizozim (Fluka), RNaz A (Sigma), Agarose (Sigma), Ethidium bromide (Fluka), Bromphenol Blue (Sigma), GeneRuler and o'GeneRuler 1kb plus DNA Ladders (75-20000bp) (Fermentas), GeneRuler High Range DNA Ladder (10171-48502bp) (Fermentas), 6x DNA Loading Dye (Fermentas), Yeast Extract (Merck), Meat Extract (Merck), Peptone (Merck), ß-glycerolphosphate disodium salt hydrate (Sigma), Magnesium sulfate heptahydrate (Fluka).

3.2. Metot

3.2.1. Hasta balık örneklerinin incelenmesi

Çalışmada materyal olarak kullanılan yavru balık örnekleri öncelikle hasta balıklardan hasta balıklar yoksa portör olup olmadıklarını belirlemek amacı ile tesadüfi örnekleme yöntemi ile havuzlardan alınmıştır. Alınan balık örnekleri içine yeterli miktarda oksijen verilen plastik taşıma poşetlerine konularak canlı halde Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Laboratuvarı'na getirilmiştir. Balıklar 1,5 ml- 2-phenoxyethanol/1 lt anestezik solüsyonda hareketleri duruncaya kadar bekletilmiştir. Operkulum hareketi duran balıklar öncelikle dış yönden incelenerek tespit edilen bulgular kaydedilmiştir (Ferguson 1988, Needham 1988).

3.2.2. Bakteri izolasyonu

Bakteriyolojik çalışma için % 70'lik etil alkol ile balık vücut yüzeyleri dezenfekte edildikten sonra ventral ve lateral insizyonlar uygulanarak steril bir şekilde iç organları ortaya çıkarılmıştır. Karaciğer, dalak ve böbrekten TSA besi yerlerine ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besi yerleri soğutmalı etüvde 24±2^{0}C'de 72 saat süre ile inkübe edilmiştir (Timur ve Timur 2003).

3.2.3. İzole edilen bakterilerin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti

TSA besi yerlerinde izole edilen bakterilerin koloni morfolojisi ve rengi ışık mikroskobu (Nikon YS100) ile tespit edilerek alt kültürleri yapılmıştır. Bakterilerin fenotipik özelliklerinin tespiti için kullanılan tüm besi yerleri 24±2^{0}C'de 48-72 saat ile inkübe edilmiştir. Çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Laboratuvarı'ndaki mikrobiyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Morfolojik özelliklerinin tespiti

Bakterilerin morfolojik özelliklerinin tespiti Gram boyama yöntemi ile hareketli olup olmadıkları ise hareket besi yerinde ve ayrıca asılı damla yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Seeley ve ark. 1990).

3.2.3.2. Fizyolojik özelliklerinin tespiti

Bakterilerin fizyolojik özelliklerinin tespiti için farklı tuzluluk oranları (%0, 2, 4, 6, 8 ve 10 NaCl içeren Nutrient buyyonu) ile farklı sıcaklıklarda (4, 20, 30, 35°C'de) gelişme gösterip göstermedikleri incelenmiştir (Alsina ve Blanch 1994).

3.2.3.3. Biyokimyasal özelliklerinin tespiti

Bakterilerin biyokimyasal özelliklerinin tespiti amacıyla çeşitli testler gerçekleştirilmiştir. Bu testler; Sitokrom oksidaz (Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride), katalaz (%3 H_2O_2), O/F glukoz testi, metil- kırmızısı (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri, TSI'da reaksiyon, glukozdan gaz oluşturma, O/ 129 Vibriostatik ajana karşı hassasiyet (2,4-diamino- 6,7-diisopropylpteridine phosphate) (10 µg disk^{-1} ve 150 µg disk^{-1}), TCBS 'de gelişme ve reaksiyon, Arjinin dihidrolaz üretimi (Moeller), lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri (Moeller), Simmon's citrate agarda sitratı kullanma, İndol üretimi, Nitrat redüksiyon testi, Amilaz üretimi, ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) testi ve şekerlerden asit üretimi (Galaktoz, Fruktoz, Mannoz, Laktoz, Mannitol, Sorbitol, Rafinoz, Arabinoz, Ksiloz, Sükroz ve *Myo*-inositol)'dir (Alsina ve Blanch 1994, Musa ve ark. 2008).

3.2.3.4. Bakteriyel identifikasyonda kullanılan biyokimyasal metotlar

Katalaz etkinliği: Yatık nutrient agarda veya uygun bir vasatta bakteriler üretilir. Yatık agar üzerine 1 ml % 3'lük hidrojen peroksit dökülür ve hemen veya 5 dakika içinde gaz kabarcıklarının oluşumu araştırılır. Kanlı agar veya diğer kan veya serum içeren vasatlar buna uygun değildir (Timur ve Timur 2003).

Oksidaz etkinliği (Kovacs 1956): Bir parça şerit şeklindeki filtre kağıdı (7 cm uzunluğunda) petri kutusuna yerleştirilir ve üzerine 2-3 damla oksidaz ayıracı damlatılır. Platin öze yardımı ile saf koloniden alınan kültür, oksidaz ayıracı emdirilmiş kağıt şerit üzerine sürülür. Kağıt üzerinde on saniye içinde koyu mor renk oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir (Timur ve Timur 2003).

Sitrat kullanımı: Yatık Simmon's sitrat yüzeyine çizgi şeklinde ekim yapılır. Ekimden sonra yedi gün boyunca büyüme ve renk değişimi incelenir. Çizgi üzerinde büyüme ve mavi renk pozitif reaksiyonu (sitrat kullanılmış), orijinal yeşil renk ise negatif reaksiyonu (sitrat kullanılmamış) gösterir (Timur ve Timur 2003).

Dekarboksilaz reaksiyonu (Moeller 1955): Dekarboksilaz besi yeri ile arjinin, lizin, ornitin amino asitlerinden birini ve hiç amino asit içermeyen kontrol olmak üzere dört besi yerine petri kültüründen düz platin iğne ile ekim yapıldıktan sonra sıvı parafin ile kapatılır. İnkübe edilerek ve dört gün boyunca incelenir. Vasat önce glukozdan asit üretimi nedeni ile sarı renk alır; dekarboksilasyonun oluşmasıyla da mor menekşe renge döner. Kontrol ise sarı renkte kalacaktır (Timur ve Timur 2003).

Oksidasyon/Fermentasyon testi (O/F): Hugh ve Leifson (1953) basal vasatında aerobik ve anaerobik şartlarda glukoz metabolizmasından asit üretiminin ölçülme işlemidir. Deniz organizmaları için Leifson (1963) modifiye vasatının kullanılması gerekir. O/F testi için iki tüp besi yeri kullanılarak, ekimden sonra besi yerlerinden birinin yüzeyi steril parafinle kapatılarak anaerop ortam yaratılır. Asit oluşumu rengin sarıya dönüşmesi ile ortaya çıkar. İnkübasyondan sonra 1, 2 ve 7. günlerde bu değişiklik kaydedilir. Her gün incelemek koşulu ile birkaç gün bekletilen tüplerin her ikisinde asit oluşumu suşun ''fermentatif'', yalnız açık olan tüpteki besi yerinde renk değişimi suşun ''oksidatif'', her ikisinde de asit oluşumu görülmemesi nonsakkorilitik olduğunu göstermektedir. Karbonhidrat fermentasyonunda gaz oluşumunu incelemek için Durham tüplerinden yararlanılır. Durham tüpü, büyük bir tüp

içine ters olarak yerleştirilmiş küçük bir tüptür. Besi yerinde fermentasyon sonucu oluşan gazın bu küçük tüpün tepe kısmında toplandığı görülür (Timur ve Timur 2003).

İndol üretimi: Besleyici sıvı ortam (buyyon) veya peptonlu suda üretilen 48 saatlik kültüre 1 ml eter veya ksilen ilave edilir. Sallanan tüpe 0.5 ml Ehrlich ayıracı dökülür. Ayıraç ile besi yeri yüzeyi arasında pembe veya kırmızı renkli bir halkanın oluşumu indol'ün varlığını gösterir (Timur ve Timur 2003).

MR (Metil Kırmızısı): Metil kırmızısı (MR) buyyonu inoküle edilir ve 22-24ºC'de 5 gün süre ile inkübe edilir. İki damla metil kırmızısı solüsyonu ilave edilip, çalkalanarak incelenir; Voges-Proskauer testi için saklanır. Kırmızı ve portakal renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu da negatif olduğunu gösterir (Timur ve Timur 2003).

Voges-Proskauer (Barrit 1936): Metil kırmızısı testinin tamamlanmasından sonra 0.6 ml naftol solüsyonu ve 0.2 ml % 40 KOH aqueous solüsyonu ilave edilir. Tüp çalkalandıktan sonra 15 dakika-1 saat içinde incelenir. Koyu kırmızı rengin oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir (Timur ve Timur 2003).

Hareketlilik testi: Bakteri hareketi final tür tespitinde diğer önemli bir tayin kriteridir. Bakteriler kamçıları (flagella) ile hareket ederler. Sayıları ve yerleşim yerleri türlere göre farklılık gösterir. Flagella boya yöntemi ile bu özellikleri ortaya çıkarılabilir. Bakteriyel hareketlilik direkt olarak bir damla kültür buyyon lam üzerine konarak mikroskopta incelenir. Bu amaçla asılı damla yönteminin hazırlandığı çukur lamlar da emniyetli bir şekilde kullanılabilir. Bu teknik yarı katı agarda iyi üremeyen hareketli bakteri türlerinin tespitinde kullanılabilir. Hareketlilik vasatı % 0.4 veya daha az agar içerir (Timur ve Timur 2003).

3.2.4. Antibiyotik duyarlılık tespiti için standart disk difüzyon yöntemi

İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri Müller-Hinton agarda disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Mc Farland 0,5 (Biomerieuxsa 70900) bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan Müller Hinton Agar (Merck) besi yerine 0,1 ml konularak besi yeri yüzeyine steril eküvyon çubuklar ile yayılması sağlanmıştır. Daha sonra petriler kuruması için oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletilmiştir. Agarın yüzeyine çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler steril pens ile yerleştirilerek 26±2ºC'de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Arda 1997). İnkübasyon süresi

sonunda diskler etrafında gelişen zonların çapları milimetrik cetvel ile ölçülerek suşların duyarlı ve dirençli olup olmadıkları NCCLS (2003)'in kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

3.2.5. Plazmit analizi

İzolatların plazmit analizleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Plazmitlerin varlığının tespitinde şu aşamalar gerçekleştirilmiştir: GM17 sıvı besi yerinde 24±2^{0}C'de 24 saatlik bakteri kültürlerinden 10ml'lik GM17 sıvı besi yerine 1'er ml'lik inokülasyonlar yapılarak tüpler 30^{0}C'de 3-3,5 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası santrifüj tüplerine aktarılan bakteri kültürü 6000 devirde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre çökeltisi steril kabin içerisinde kurutulduktan sonra 380µl sakkaroz tamponu eklenerek çözülmüştür. Daha sonra su banyosunda 37^{0}C 'de 5dakika bekletilmiştir. Üzerine 96,5µl lizozim eklenerek su banyosunda 37^{0}C 'de 5 dakika bekletilmiştir. Lizozim uygulanan hücre çökeltisine 48,5µl Tris-EDTA-1 (pH 8.0) ve 28µl %20'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) (pH 8.0) eklenmiştir. Lizizin tamamlanması için santrifüj tüpleri 37^{0}C'lik su banyosunda 10 dakika tutulmuştur. Hücre lizizinin gerçekleştiği tüp içerikleri mekanik karıştırıcıda ve yüksek devirde 30 saniye karıştırılarak kromozomal DNA'nın kırılması sağlanmıştır. Ortama taze olarak hazırlanmış 3N NaOH çözeltisinden 28µl eklenerek tüpler düz bir zemin üzerinde 10 dakika süre ile aralıklarla karıştırılmıştır. Denatürasyon aşaması sonrasında santrifüj tüplerine 50µl 2M Tris-HCl (pH 7.0) çözeltisi eklenerek 3 dakika süre ile aralıksız karıştırılmıştır. Bu ortama 4^{0}C 'de saklanan 5M NaCl çözeltisinden 72µl ve %3 NaCl ile doyurulmuş fenol çözeltisinden 700µl ilave edilerek, 4^{0}C 'de 12500 devirde 20 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Oluşan üst faz, mikropipet yardımıyla yeni tüplere aktarılmıştır. Bu ortama deproteinazyonun sağlanması için 700µl kloroform/ izoamilalkol (24:1) uygulaması yapılmıştır. 4^{0}C 'de 12500 devirde 15 dakika santrifüj işleminden sonra oluşan üst faz yeni tüplere alınarak üzerine eşdeğer hacimde etil alkol eklenmiştir. Etil alkol ilave edilen tüpler -20^{0}C 'de bir gece bekletilip ardından 4^{0}C 'de 12500 devirde 20dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı faz dökülerek çökeltiler kurutulmuştur. Kuruyan çökeltiler 20µl Tris-EDTA-2 (pH 7,5) içerisinde çözülmüş ve RNaz A stok çözeltisinden 2µl ilave edilerek 37^{0}C 'de su banyosunda 45dakika inkübe edilmiştir (Anderson ve McKay 1983).

Plazmit DNA örneklerinin elektroforezi %0,7 agaroz oranı ile hazırlanan jellerde gerçekleştirilmiştir. Yatay jel sistemleri için agaroz, tris-asetat elektroforez tamponu içerisinde çözülmüştür. Soğuduktan sonra içerisinde jel tarakları bulunan elektroforez tanklarına yerleştirilmiştir. Jel soğuduktan sonra yavaşça taraklar ortamdan alınmıştır. DNA örnekleri su banyosundan alınarak 2µl marker boya çözeltisiyle karıştırılarak mikropipet yardımıyla jel kuyucuklarına 20'şer µl olacak şekilde aktarılmıştır. Elektroforez işlemi 100 voltta marker boya jel sistemini terkedinceye kadar devam etmiştir. Daha sonra jeller içerisinde 0,2µg/ml etidyum bromit içeren çözeltide 20 dakika, daha sonra 20 dakika da saf su içerisinde bekletilmiştir. Jel görüntüleme sistemi (UV transliminatör ile görüntülenip UVPro programı ile bilgisayarda görülmüştür) ile plazmitlerin varlığı tespit edilmiştir (Meyers ve ark. 1976).

4.BULGULAR

4.1. Klinik ve Otopsi Bulguları

Çalışmanın yapıldığı Şubat 2010-Mayıs 2010 tarihleri arasında materyal olarak kullanılan gökkuşağı alabalık yavrularının temin edildiği işletmelerde işletme verilerine göre su sıcaklığının 8-12ºC, pH'nın 7.6-8.1 ve çözünmüş oksijen miktarının 7.2-10.2 mg/L arasında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışma boyunca ayda bir kez olmak üzere toplam dört örnekleme çalışması yapılmıştır. Hasta yavru balıklar her örneklemede Fethiye bölgesi civarındaki üç farklı ticari gökkuşağı alabalığı üretim işletmesinden temin edilmiştir.

Birinci örnekleme çalışması Şubat 2010 tarihinde gerçekleştirilmiş olup ortalama 3-4 gr ağırlığındaki yavrularla (12 adet) çalışılmıştır. Yapılan klinik muayenede enfekte balıklarda iştahsızlık, havuz su çıkışlarında toplanma, durgunluk, yem alımında azalma, gruptan ayrı yüzme, dorsal yüzgeçte distal kısımda erime (Şekil 4.1), gözlerde, operkulum yüzeyinde hafif hemorajiler, solungaçlarda solgunluk, karaciğerde hemoraji, karın boşluğunda asidik sıvı birikimi tespit edilmiştir. Hasta balıklarda ayrıca barsakların da gıda yönünden boş olduğu, karaciğerin büyüdüğü, dalağın solgun olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Etkilenmiş gökkuşağı alabalığı yavrusunda dorsal yüzgeçte distal uçta hafif erime (okla gösterilmiştir)

İkinci örnekleme çalışması Mart 2010 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Balıklarda durgunluk, iştah kaybı, havuz su çıkışlarında toplanma, gözlerde opaklaşma ve ekzoftalmi (Şekil 4.2), yüzgeçlerin distal kısımlarında erime ve solungaçlarda solgunluk gibi klinik bulgular gözlenmiştir. İç bakıda karaciğerde nekrotik odaklar ve hemoraji (Şekil 4.3), dalağın renginde koyulaşma ve splenomegaly, barsağın gıda yönünden boş olduğu ve karın boşluğunda asidik sıvı birikimi ile böbreklerde de erime tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Etkilenmiş balıkta gözlerde opaklaşma ve ekzoftalmi



Şekil 4.3. Hasta balıkta karaciğerde hemoraji ve büyümüş dalak

Üçüncü örnekleme çalışması Nisan 2010 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Etkilenen yavru balıklarda (9-18 gr ağırlığında) havuz su çıkışlarında toplanma, durgunluk, iştahsızlık, gözlerde ekzoftalmi ve hemoraji (Şekil 4.4), vücut deri renginde koyulaşma, yüzgeçlerde hafif erime, karın kısmında şişkinlik, solungaçlarda solgunluk ve solungaç filamentlerinde erime tespit edilmiştir. İnternal olarak karaciğerde hemoraji, dalakta büyüme ve renginde koyulaşma, böbreklerde erime gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. Etkilenmiş balıkta gözlerde ekzoftalmi ve hemoraji



Şekil 4.5. Solgun solungaçlar, karaciğerde hemoraji, dalakta büyüme ve renkte koyulaşma

Dördüncü örnekleme çalışması Mayıs 2010 tarihinde gerçekleştirilmiş olup hasta balıklarda durgunluk, iştah kaybı, gözlerde ekzoftalmi ve opaklaşma, balık vücut deri renginde koyulaşma, solungaçlarda solgunluk, dalak ve karaciğerde büyüme ile karaciğer yüzeyinde hemorajiler de gözlenmiştir.

4.2. Bakteriyolojik Bulgular

Şubat-Mayıs 2010 tarihleri arasında gerçekleştirilen örnekleme çalışmalarında balıkların karaciğer, dalak ve böbrek gibi iç organlarından yapılan ekim sonucu TSA besi yerinde 24±2ºC'de 48-72 saat inkübasyon süresi sonucunda üreme gösteren bakteri suşlarının tümüne hareket testi (asılı damla yöntemi ve hareket besi yeri kullanılarak), Gram boyama, sitokrom oksidaz ve katalaz testleri, oksidasyon fermentasyon (O/F) testleri uygulanmıştır. Yapılan testler sonucunda Gram-negatif olduğu tespit edilen suşlar (tüm örneklemeler) (Çizelge 4.1) tezin konusu olmadığından sadece Gram-pozitif, hareketsiz, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif (3. örneklemeden), *Lactococcus* şüpheli suşlar çalışılmıştır. Bu suşlara uygulanan tüm testler (Çizelge 4.2) ve yapılan tanımlamaları aşağıda verilmiştir.

4.2.1. Hareketli Aeromonas türlerinin tanımlanması

TSA (Triptik Soy Agar) besi yerine ekim yapılmıştır. 24 – 48 saat inkübe edildikten sonra üreyen bakteriler TSA (Triptik Soy Agar) besi yerinde saflaştırılmıştır. Gram (-) çubuk, hareketli, sitokrom oksidaz (+), O/F fermentatif, vibriostat (O/129) dirençli, indol (+), glikozdan asit üretimi (+), Gaz üretimi (+) pozitif olan bakterilerin Haraketli Aeromonas olduğuna karar verilmiştir (Holt ve ark. 1994, Burton ve ark. 1997).

4.2.2. *Pseudomonas fluorescens'*ın tanımlanması

TSA (Triptik Soy Agar) besi yerine ekim yapılıp 24-48 saat inkübe edilmiştir. Üreyen bakteriler TSA (Triptik Soy Agar) besi yerinde saflaştırılmıştır. Gram (-), hareketli, sitokrom oksidaz (+), katalaz (+), O/F oksidatif, vibriostat (O/129) dirençli, indol (-), H_2S üretimi (-) olan bakterilerin *Pseudomonas fluorescens* olduğuna karar verilmiştir (Akaylı ve Timur 2004, Austin ve Austin 1999, Inglis 1993).

4.2.3. *Enterobacter cloacae*'nın tanımlanması

TSA (Triptik Soy Agar) besi yerine ekim yapılmıştır. 24 – 48 saat inkübe edildikten sonra üreyen bakteriler TSA (Triptik Soy Agar) besi yerinde saflaştırılmıştır. Gram (-), hareketli, sitokrom oksidaz (-), katalaz (+), O/F fermentatif, vibriostat (O/129) dirençli, indol (-), H_2S üretimi (-) olan bakterilerin *Enterobacter cloacae* olduğuna karar verilmiştir (Thillai ve ark. 2008, Troast 1975, Geldreich ve Clarke 1966).

4.2.4. *Edwardsiella ictaluri*'nin tanımlanması

TSA (Triptik Soy Agar) besi yerinde saflaştırılma aşamasından sonra Gram (-), hareketli, sitokrom oksidaz (-), katalaz (+), O/F fermentatif, vibriostat (O/129) dirençli, indol (-), H_2S üretimi (-) olan bakterilerin *Edwardsiella ictaluri* olduğuna karar verilmiştir (Brenner ve Farmer 2005).

Çalışmada 3. örneklemeden izole edilen Gram-pozitif, hareketsiz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, kok şekilli bakteri suşları TSA besi yerinde 24±2ºC'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda besi yeri üzerinde küçük, yuvarlak, beyaz renkli koloniler oluşturduğu görülmüştür. Suş kanlı vasatta α-hemoliz oluşturmuştur. İçerisinde farklı konsantrasyonlarda (% 0, % 2, % 4, % 6, %8) NaCl bulunan nutrient buyyonunda gelişme gösteren suşların, tuz konsantrasyonunun %10 olduğu nutrient buyyonda ise gelişme göstermediği tespit edilmiştir. Bakteri suşları farklı sıcaklık derecelerinde gelişebilmiştir. Suşların metil kırmızısı ve VP testleri pozitif olup, indol üretimi ile nitratı nitrite indirgemesi negatif sonuç vermiştir. Suşlar nutrient agarda gelişme göstermiştir. TCBS vasatında gelişme göstermediği görülmüştür. Suşların D-glikoz, fruktoz, galaktoz, sükroz, mannoz'dan asit üretimlerinin pozitif olduğu ancak laktoz, sorbitol, rafinoz, myo-inositol, L-arabinoz ve ksiloz'dan asit üretimlerinin ise negatif olduğu tespit edilmiştir. Suşların ONPG testi sonuçları pozitif olup glikozdan asit oluşturmamışlardır. Bakteri suşlarının arjinin dihidrolaz testi pozitif iken lizin ve ornitin testleri negatiftir. Simmon's sitrat ile amilaz üretimlerinin de negatif olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. *L.garvieae* suşları dışında izole edilen ve tanımlanan suşların biyokimyasal özellikleri

TESTLER	*A. caviae* (8suş)	*A. hydrophila* (18 suş)	*A. sobria* (4suş)	*Pseudomonas fluorescens* (5 suş)	*Enterobacter cloacae* (4 suş)	*Edwardsiella ictaluri* (8 suş)
Hücre morfolojisi	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak	çomak
Gram boyama	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	-	+	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	O	F	NS
Sitrat	+	+	+	+	+	-
Nitrat indirgeme	+	+	+	+	+	-
Metil kırmızısı	-	-	+	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	-	-	+	-
İndol üretimi	-	-	+	-	-	-
H_2S gaz	-	-	-	-	-	-
Vibriostat (10 µg $disk^{-1}$)	D	D	D	D	D	D
150 µg $disk^{-1}$	D	D	D	D	D	D
Nutrient broth'da gelişme	+	+	+	+	+	+
Büyüme						
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+
%2 NaCl	+	+	+	+	+	+
%4 NaCl	+	+	+	+	+	+
%6 NaCl	+	+	+	+	+	+
%8 NaCl	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl	+	+	+	+	+	+
4ºC	+	+	+	+	+	+
20 ºC	+	+	+	+	+	+
30 ºC	+	+	+	+	+	+
35 ºC	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	-	+	+	-
LDK	-	-	-	-	-	-
ODK	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	-	+	+
TCBS'de üreme	-	-	-	-	-	-
Asit oluşumu						
Laktoz	+	+	-	-	+	-
Fruktoz	+	+	+	+	Zayıf+	+
Galaktoz	+	Zayıf+	+	+	Zayıf+	+
D-Mannitol	+	+	+	-	Zayıf+	-
Mannoz	+	Zayıf+	+	-	-	Zayıf+
Sorbitol	+	+	-	-	-	-
Rafinoz	+	+	-	-	+	+
Myo-inositol	Zayıf+	-	+	-	-	-
L-Arabinoz	+	-	+	-	-	+
Ksiloz	+	Zayıf+	+	-	+	-
Siderofor üretimi	+	+	+	+	+	+

F:Fermentatif, O:Oksidatif, NS:Non-sakkorilitik, D:Dirençli, ADH:Arjinin dehidrolaz, LDK: Lizin dekarboksilaz, ODK: Ornitin dekarboksilaz, + : pozitif, - : negatif

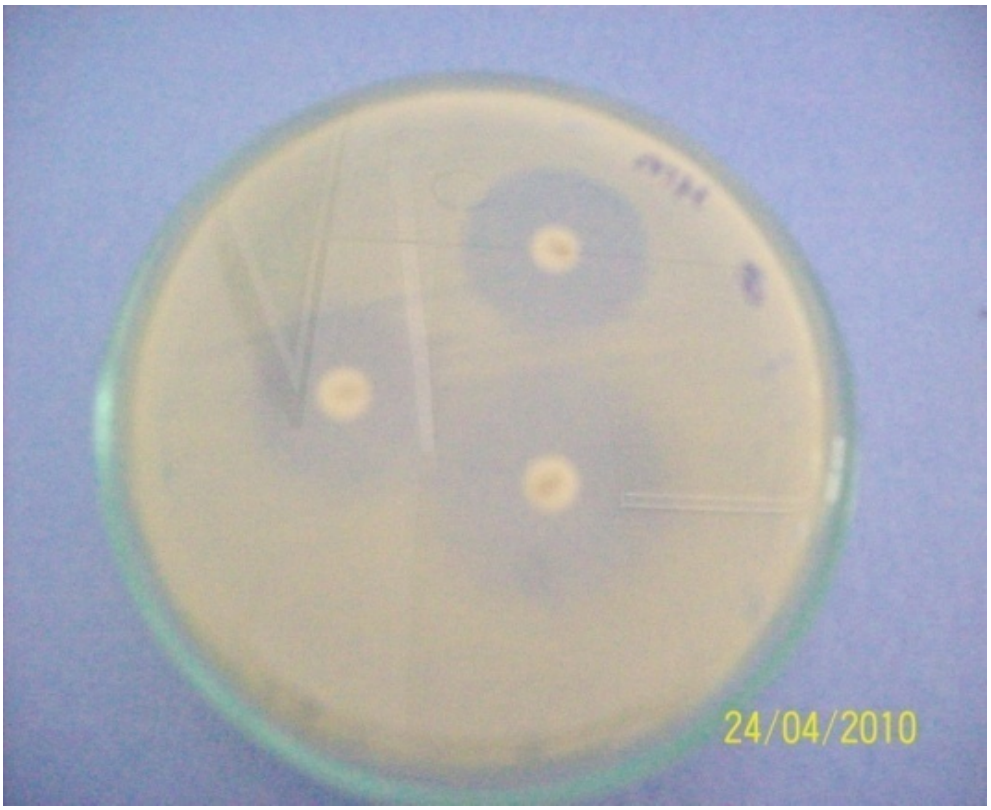
Çizelge 4.2. *L.garvieae* suşlarının fenotipik özellikleri

TESTLER	1	2	3
Hücre morfolojisi	oval kok	oval kok	oval kok
Gram boyama	+	+	+
Hareketlilik	-	-	-
Sitokrom oksidaz	-	-	-
Katalaz	-	-	-
O/F	F	F	F
Hemoliz	α	α	α
Sitrat(Simmon's)	-	-	-
Nitrat indirgeme	-	-	-
Metil kırmızısı	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+
İndol üretimi	-	-	-
H_2S	-	-	-
Glukozdan gaz oluşumu	-	-	-
Vibriostat			
10 µg $disk^{-1}$	H	H	H
150 µg $disk^{-1}$	H	H	H
Nutrient agarda gelişme	+	+	+
Büyüme			
0% NaCl	+	+	+
2 % NaCl	+	+	+
4 % NaCl	+	+	+
6 % NaCl	+	+	+
8 % NaCl	+	+	+
10% NaCl	-	-	-
4^0C	+	+	+
20^0C	+	+	+
30^0C	+	+	+
35^0C	+	+	+
ADH	+	+	+
LDK	-	-	-
ODK	-	-	-
Nişasta (amilaz)	-	-	-
ONPG	+	+	+
TCBS'de gelişme	-	-	-
Asit oluşumu			
Laktoz	-	-	-
D-Glukoz	+	+	+
Fruktoz	+	+	+
Galaktoz	+	+	+
D-Mannitol	+	+	+
Sükroz	+	+	+
Mannoz	+	+	+
Sorbitol	-	-	-
Rafinoz	-	-	-
İnositol	-	-	-
L-Arabinoz	-	-	-
Ksiloz	-	-	-

+ : pozitif, - : negatif, F:Fermentatif, α: alfa hemolitik, H: Hassas, ADH:Arjinin dehidrolaz, LDK: Lizin dekarboksilaz, ODK: Ornitin dekarboksilaz

4.3. Standart Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılık Testi Bulguları

Yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre *L. garvieae* suşlarının amfisilin (10 µg), eritromisin (15 µg), kloromfenikol (30 µg), sülfametoksazol (25 µg), oksitetrasiklin (30 µg), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim (5 µg) antibiyotiklerine hassas oldukları, basitrasin (0.04 µg), flumekuın (30 µg), furozolidon (15 µg), kanamisin (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), oksalinik asit (2 µg) ve streptomisin (10 µg) antibiyotiklerine ise dirençli oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *L. garvieae* suşunun amfisilin, eritromisin ve kloromfenikol antibiyotiklerine karşı oluşan zon çapları

Çizelge 4.3. Antbiyotik hassasiyeti zon çapı yorumlama standartları (NCCLS 2003)

Antibiyotik	Disk içeriği	Zon çapı		
		D	I	H
Amfisilin	(10µg)	-	-	≥24
Eritromisin	(15µg)	≤15	16-20	≥21
Tetrasiklin	(30µg)	≤18	19-22	≥23
Kloromfenikol	(30µg)	≤17	18-20	≥21

Çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklerin NCCLS'de zon çapı yorumlama standartları verilmediği için tabloda yer almamıştır.

Çizelge 4.4. *L. garvieae* suşlarının standart disk difüzyon testine göre antibiyotik duyarlılıklar sonuçları

Antibiyotikler	1	2	3
* AMP (10µg)	H (26)	H (26)	H (27)
BC (0.04µg)	D	D	D
E (15µg)	H (22)	H (24)	H (22)
UB (30µg)	D	D	D
FR(15µg)	D	D	D
K (30µg)	D	D	D
C (30µg)	H (23)	H (25)	H (27)
NA (30µg)	D	D	D
OA (2µg)	D	D	D
S (10µg)	D	D	D
RL (25 µg)	H (25)	H (23)	H (27)
OT(30µg)	H (26)	H (24)	H (24)
TE (30µg)	H (24)	H (24)	H (26)
W (5 µg)	H (27)	H (25)	H (23)

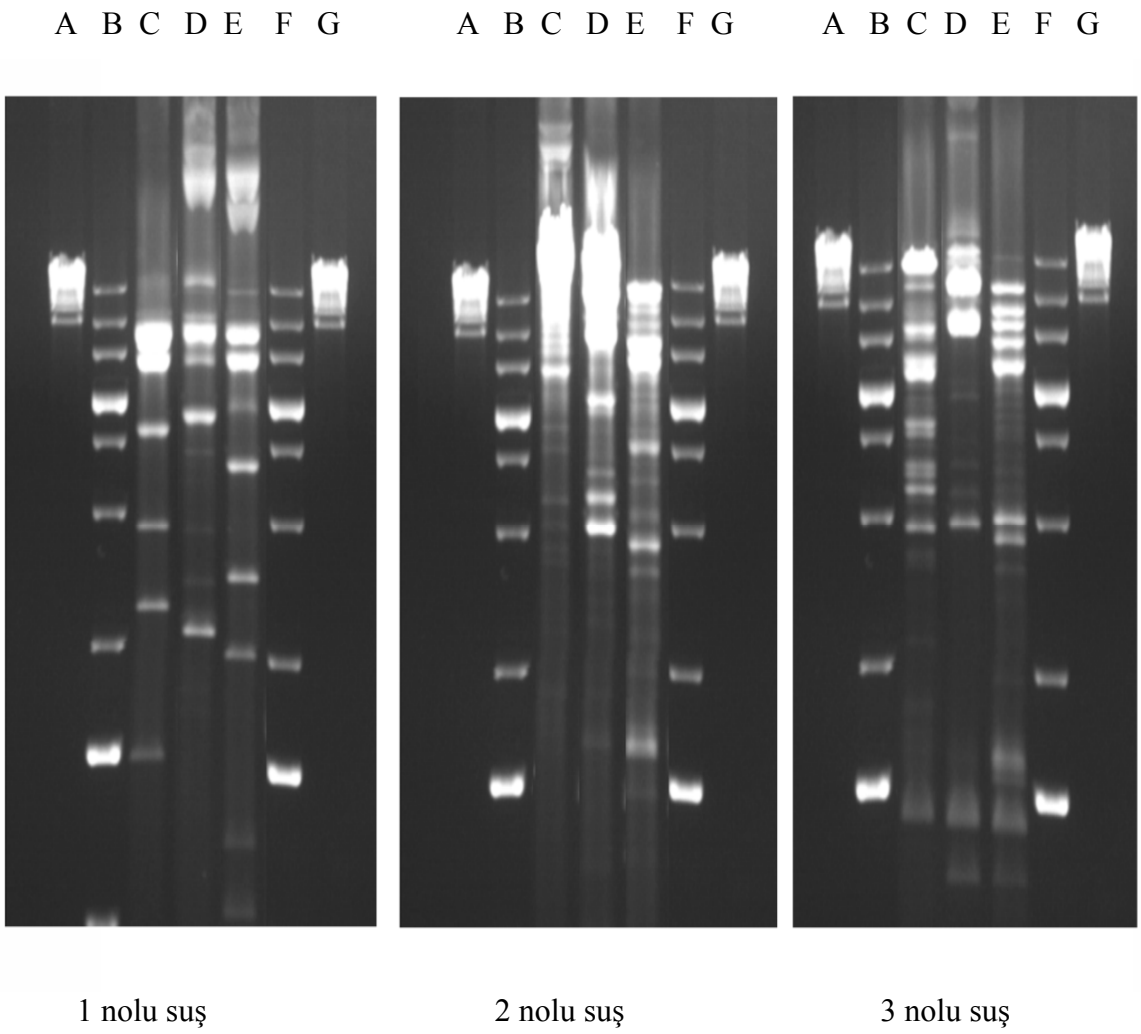
H:Hassas, D: Dirençli

*AMP(10µg):Amfisilin, BC (0.04µg): Basitrasin, E (15µg): Eritromisin, UB (30µg): Flumekuın; FR (15µg): Furozolidon, K (30µg): Kanamisin, C (30µg): Kloromfenikol, NA(30µg):Nalidiksik asit, OA (2µg):Oksalinik asit, S (10µg): Streptomisin, RL (25 µg): Sülfametoksazol, OT(30µg): Oksitetrasiklin, TE (30µg): Tetrasiklin, W (5 µg): Trimetoprim

4.4. Plazmit Analizi İle İlgili Bulgular

L. garvieae suşlarının plazmit analizleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Plazmit analizinin aşamaları gerçekleştirildikten sonra jel görüntüleme sisteminde görüntü elde edilmiştir.

Yapılan plazmit analiz çalışmalarında suşların farklı boyutlarda plazmitler içerdikleri bulunmuştur (Şekil 4.7). Plazmit içeren suşların basitrasin, flumekuin, furozolidon, kanamisin, nalidiksik asit, oksalinik asit, streptomisin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Suşların plazmit analiz görüntüleri
(A: 48kb marker, B: 20kb marker, C:EcoRI (enzim), D: BamHI (enzim), E: Eco RV (enzim), F: 20kb marker, G: 48kb marker)

5. TARTIŞMA

Laktokokkozisin etiyolojik etkeni *L. garvieae* (önceden *Enterococcus seriolicida*) tüm dünyada tatlı su ve deniz balıklarının fırsatçı bir patojeni olup hem sucul hem de karasal omurgalılar (insan dahil) ile sucul omurgasızlar dahil bir dizi konakçı dağılımına sahiptir. Etkenin etkilediği balık türleri arasında gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*), yılan balıkları (*Anguilla japonica*), tilapia (*Oreochromis* sp.) ve ayu balıkları (*Plecoglossus altivelis*) da bulunmaktadır. Bununla birlikte *L. garvieae* inek, sığır ve tatlı su karidesi (*M. rosenbergii*) gibi homoterm ve poikiloterm hayvanlardan da izole edilmiştir. Etkenin insanlardan izole edilmiş olması bu bakterinin önemini arttırdığı bildirilmiştir (Kav ve Erganiş 2008, Eldar ve ark. 1999, Mu´zquiz ve ark. 1999).

L. garvieae suşlarının izole edildiği hasta gökkuşağı alabalığı yavrularında iştahsızlık, durgunluk, havuz su çıkışlarında toplanma, tek ya da çift taraflı ekzoftalmi görülmüştür. Bazı vakalarda gözde ekzoftalmi ile birlikte opaklaşma ve hemorajilere de rastlanılmıştır. Balıkların solungaçlarında solgunluk gözlenirken iç bakıda hasta balıklarda karın boşluğunda sıvı birikimi, karaciğerde hemoraji, dalakta genişleme, böbrekte erime ve barsakların gıda yönünden boş olduğu tespit edilmiştir. Bu bulguların laktokokkozisten etkilendiği bildirilen balıklarda gözlenen klinik bulgulara benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Soltani ve ark. 2008, Savvidis ve ark. 2007, Austin ve Austin 1999, Vendrell ve ark. 2006, Pereira ve ark. 2004).

Bu çalışmada *L. garvieae*'nin tanımlanması fenotipik tanı yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

L. garvieae'nin fenotipik özellikleri ile ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalarda bakterinin Gram-pozitif, fakültatif anaerobik, hareketsiz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, α-hemolitik, tek ya da kısa zincirler halinde koklar olup Voges-Proskauer (VP) ve arjinin dihidrolaz sonuçlarının pozitif olduğu ancak lizin ve ornitin dekarboksilaz testlerinin ise negatif olduğu bildirilmiştir (Soltani ve ark. 2008, Savvidis ve ark. 2007, Pereira ve ark. 2004). Savvidis ve ark. (2007), Vendrell ve ark. (2006), *L. garvieae* suşlarının nitrat indirgeme ile glikozdan gaz üretiminin negatif, mannitol ve galaktozdan asit üretimlerinin pozitif, sükroz, inositol, arabinoz, rafinoz ve ksilozdan asit üretimlerinin ise negatif olduğunu bildirmişlerdir.

Soltani ve ark. (2008), çalıştıkları *L. garvieae* suşlarının % 0 NaCl ile % 6 NaCl'de gelişme gösterdiklerini bildirmiştir.

Yaptığımız bakteriyolojik çalışmalarda izole ettiğimiz *L. garvieae* suşlarının Gram-pozitif, hareketsiz, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif, fermentatif koklar oldukları görülmüştür. Suşlar α-hemoliz olup sitrat üretimi ve nitrat indirgemesi negatiftir. VP pozitif olup indol üretimleri ise negatiftir. Suşlar % 0 NaCl ile % 6 NaCl'de gelişme göstermiştir. Bakteri suşlarının arjinin dihidrolaz pozitif, lizin ve ornitin dekarboksilaz sonuçlarının negatif olduğu bulunmuştur. Laktozdan asit üretmeyip, glikoz, mannitol ve galaktozdan asit üretimleri ise pozitif olarak tespit edilmiştir. Rafinoz, inositol, arabinoz ve ksilozdan asit üretimleri negatif olup bu bulguların diğer araştırmacıların bulgularına benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Çalışmamızda izole ettiğimiz *L. garvieae* suşlarının sorbitolden asit üretimleri negatif, sükrozdan asit üretimlerinin ise pozitif olduğu bulunmuştur. Bu bulguların Savvidis ve ark. (2007) ile Vendrell ve ark. (2006)'nın bulgularından farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Kubilay ve ark. (2005), Çağırgan (2004), Ravelo ve ark. (2001), Eldar ve ark. (1999)'nın yapmış oldukları çalışmalarda *L. garvieae* suşlarının % 8 NaCl'de gelişme göstermediği bildirilirken çalışmamızda suşların % 8 NaCl'de gelişme gösterdiği tespit edilmiştir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıkların tedavisi antibiyotiklerle yapılmaktadır. Ancak antibiyotikler çoğu kez etkisiz olmakta ve enfeksiyonun tekrarını önleyememektedir (Mene´ndez ve ark. 2007). Mevcut olan aşılar laktokokkozise karşı sınırlı koruma sağlamaktadır. Günümüzde eritromisin laktokokkozise neden olan Gram-pozitiflere karşı tercih edilen antibiyotik olmaktadır (Esposito ve ark. 2007).

Austin ve Austin (1999), *L. garvieae* suşlarının amfisilin, eritromisin, tetrasiklin antibiyotiklerine hassas, nalidiksik asite ise dirençli olduklarını bildirmiştir.

Mazzolini ve ark. (2003), *L. garvieae* suşlarının amfisilin, amoksisilin, oksitetrasiklin ve eritromisine karşı hassas olduklarını, flumekuin, oksalinik asit, streptomisin, trimetoprim ve sülfadiazin antibiyotiklerine karşı dirençli olduklarını saptamışlardır.

Diler ve ark. (2002), *L. garvieae* suşları için yaptıkları antibiyotik duyarlılık testinde suşların penisilin, klindamisin antibiyotiklerine dirençli, eritromisin, tetrasiklin, amfisilin ve kloromfenikol antibiyotiklerine karşı hassas olduklarını bildirmişlerdir.

Kav ve Erganiş (2008), çalıştıkları *L. garvieae* suşlarının amfisilin, eritromisin, kloromfenikol, oksitetrasiklin antibiyotiklerine karşı hassas olduklarını bildirmişlerdir. Çalıştıkları suşların basitrasine direnç gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Soltani ve ark. (2008), İran'daki alabalık işletmelerinde laktokokkozisin tedavisinde eritromisin, oksitetrasiklin ve enrofloksin antibiyotiklerinin yaygın olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte ilaç tedavilerinin bakteriyel dirençte artışla sonuçlandığını bildirmiştir. Diler ve ark. (2002), Kav ve Erganiş (2008) Türkiye'deki hasta gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının eritromisine hassas olduğunu bulmuşlardır. Bu sonucun *L. garvieae* izolatları arasındaki farklılıklardan ve bölgedeki antibiyotik kullanımlarından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Kav ve Erganiş 2008).

Çalışmamızda hasta gökkuşağı alabalığı yavrularından izole edilen *L. garvieae* suşlarına uygulanan standart disk difüzyon testlerinde suşların amfisilin, eritromisin, kloromfenikol, oksitetrasiklin, tetrasiklin antibiyotiklerine karşı hassas oldukları tespit edilmiştir. Bu bulgular yukarıda belirtilen araştırmacıların bulgularına benzerlik göstermektedir. İzolatlarımızın basitrasin, flumekuin, furozolidon, kanamisin, oksalinik asit antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları görülmüştür. Bu bulgular da diğer araştırmacıların bulgularına benzerlik göstermektedir.

Balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde balık hastalıklarını önlemek ve tedavi etmek için antibiyotik ve diğer kemoterapatiklerin yoğun kullanımı R-plazmitleri kadar ilaca direnç gösteren bakterilerin artışı ile sonuçlanmıştır. Plazmit içeren bakteri hücreleri, plazmit sayılarını değiştirerek doğal çevreye adaptasyon özelliklerini düzenleyebilmektedir. Bununla birlikte ilaç direncini kodlayan bakteriyel plazmitler kemoterapide ciddi sorunlara neden olmaktadır. Balık patojenleri plazmit sayısı ve antibiyotik direnci daha önceden bildirilmiştir (Toranzo ve ark. 1984).

Gökkuşağı alabalıklarında hastalıklara neden olan bakteri türlerinin örneğin *Flavobacterium psychrophilum* (Izumi ve Aranishi 2004), *Vibrio salmonicida* (Søorum ve Olsuiko 1988), *Aeromonas salmonicida, A. hydrophila, Yersinia ruckeri* (Toranzo 1983)'nin plazmit analizleri farklı araştırıcılar tarafından çalışılmıştır. Bununla birlikte gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *L. garvieae* suşlarının plazmit profilleri üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcut olup bu çalışmalar R-plazmitlerinin aktarımı ile ilgilidir (Maki ve ark. 2008).

Maki ve ark. (2008), sarı kuyruk (*S. quinqueradiata*) balıklarından izole ettikleri *L. garvieae* suşlarında plazmitlerin bulunmadığını bildirmiştir.

Bounaix ve ark. (1996), *L. garvieae*'nin plazmit analizinin incelenmesine yönelik yaptıkları çalışma sonucunda bir suşta plazmit görülemezken iki suşta plazmit büyüklüklerini 12,5 kb ve 5,1 kb olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışma sonucunda suşların büyük plazmitlere sahip oldukları anlaşılmıştır. Bakteriyel direnç genellikle transkonjugasyon için plazmitlerin yeteneği ve bulunmaları ile alakalıdır. Genellikle bakteri suşları arasında nakledilebilen plazmitler yüksek moleküler ağırlığa sahiptirler. Çalışmamızda Maki ve ark. (2008) ile Bounaix ve ark. (1996)'nın çalışmalarından farklı olarak suşların plazmit içerdikleri görülmüştür. Maki ve ark. (2008) izole ettikleri tüm suşlarında plazmitlerinin bulunmadığı, Bounaix ve ark. (1996)'nın ise bir suşta plazmitlerinin bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda izole ettiğimiz bakteri suşlarının plazmit içermekle birlikte basitrasin, flumekuin, furozolidon, kanamisin, nalidiksik asit, oksalinik asit ve streptomisin antibiyotiklerine karşı direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. (Jun ve ark. 1999).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışma sonucunda Fethiye bölgesindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde bulunan gökkuşağı alabalığı yavrularından Şubat-Mayıs 2010 (su sıcaklığının yükselmeye başladığı dönem) tarihleri arasında laktokokkozisin etkeni *L. garvieae* suşları izole edilerek tanımlanmıştır. İzolatların farklı ülkelerdeki gökkuşağı alabalıklarından bildirilen *L. garvieae* suşları ile fenotipik yönden homojenite gösterdikleri tespit edilmiştir. Suşların antibiyotik hassasiyetleri de incelenerek hassas ve dirençli olduğu antibiyotikler belirlenmiştir. Suşların antibiyotik hassasiyetlerinin diğer ülkelerdeki izolatlardan farklı oldukları bulunmuştur. Bu durumun diğer ülkelerde hastalığın tedavisinde yoğun antibiyotik kullanımından kaynaklanabileceği gibi diğer bakteri türlerine ait çevresel suşlardan direnç-gen aktarımlarından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda izole edilen *L. garvieae* suşlarının işletme koşullarında kullanılan antibiyotiklerden amfisilin, tetrasiklin ve kloromfenikol'e hassas oldukları, flumekuın, oksalinik asit ve furozolidon antibiyotiklerine ise dirençli oldukları tespit edilmiştir. Tedavi için uygun olmayan antibiyotiklerin kullanımı maddi açıdan dezavantaj olurken balıklarda da direnç oluşumuna neden olabilmektedir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen plazmit analizleri ile suşların plazmit içerdikleri ve bunun da daha sonraki direnç-gen aktarım çalışmaları için faydalı olacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

AKAYLI, ,T. ve TİMUR, G. 2004. Yavru alabalıklarda (*Oncorhyncus mykiss*) pseudomonad septisemisi üzerinde bir çalışma. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 30 (1): 121-131.

ALSINA, M. and BLANCH, AR. 1994. A set key for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. Journal of Applied Bacteriology. 76: 79-85.

ALTUN, S., DİLER, Ö., ve ADİLOĞLU, K. 2004. Genotyping of *Lactococcus garvieae* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by 16s rDNA sequencing. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24: 119-125.

ALTUNAY, S. ve YILDIZ, H.Y. 2008. Kesikköprü Baraj Gölü'nde Bir Kafes İşletmesinde Yetiştirilen Gökkuşağı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Ektoparazitolojik Olarak İncelenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 14 (2): 154-162.

ANDERSON, D.G. and McKAY, L.L. 1983. A simple and rapid method for isolation large plasmid DNA from lactic streptococci. Applied and Environmental Microbiology, 46: 549-552.

ARDA, M. 1997. Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayın, 25: 490.

AUSTIN, B. and AUSTIN, DA. 1999. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. 3rd (Revised) Edition, Praxis Publishing, Chichester, UK.

AYDIN, F., KÖKSAL, G., DEMİR, N., BEKCAN, S., KIRKAĞAÇ, M., GÖZGÖZOĞLU, E., ERBAŞ, S., DENİZ, H., MATLAS, Ö. ve ARPA, H. 2005. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ve Politikalar. IV. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara.

BJORKLUND, H.and BYLUND, G. 1990. Temperature-related Absorption and Excretion of Oxytetracycline in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture, 84: 363-372.

BOUNAIX, S., BENACHOUR, A. and GEORGES, N. 1996. Presence of Lactose Genes and Insertion Sequences in Plasmids of Minor Species of the Genus *Lactococcus.* Applied and Environmental Microbiology, 62(3): 1112–1115.

BRENNER, JD. and FARMER, III JJ. 2005. Order XIII Enteribacteriales. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds) Bergey's, Springer, New York. Manual of Systematic Bacteriology, 2: 587-850.

BROMAGE, N., JONES, J., RANDALL,C., THRUSH, M., DAVIES, B., SPRINGATE, J., DUSTON, J. and BARKER, G. 1992. Brood stock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 100: 141-166.

BURTON,T., FOLLET, J., SHORT,S. and LIPSON,K. 1997. Bacteriology In Fish Pathology Section Laboratuary Manual. (ed by Mayers, T.R.) Special Publication, 12, Alaska.

ÇAĞIRGAN, H. ve TANRIKUL, T.T. 1995. Türkiye'deki Alabalık (*Oncorhynchus mykiss* W.) Çiftliklerinde Yeni Bir Sorun: *Enterococcus* Benzeri Bir Bakteri Enfeksiyonu. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, 19 (33): 9-19.

ÇAĞIRGAN, H. ve TANRIKUL, T. T. 1997. A *Lactococcus* in a trout farm. Mediterranean Fisheries Congress, İzmir, Turkey.

ÇAĞIRGAN, H. 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, Ege Üniversitesi Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, (21): 3-4, 267– 269.

ÇELİKER, S.A. 2003. Su Ürünleri Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış. ISSN 1303-8346, 3: 8.

ÇOLAK, D. 1999. Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı, 81-89.

DİLER, Ö., ALTUN, S., ADİLOĞLU, K.A., KUBİLAY, A. ve IŞIKLI, B. 2002. First occurence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss)* in Turkey. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 22: 21-26.

ELDAR, A., GORIA, M., GHITTINO, C., ZLOTKIN, A. and BERCOVIER, H. 1999. Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia. Applied and Environmental Microbiology, 65: 1005-1008.

EMRE, Y. 2004. Alabalık Yetiştiriciliği. T.C Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, 1-17.

ESPOSITO, A., FABRIZI, L., LUCHETTTI, D., MARVASI, L., CONI, E. and GUANDALINI, E. 2007. Orally Administered Erythromycin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Residues in Edible Tissues and Withdrawal Time. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (51): 3, 1043–1047.

FERGUSON, H. 1988. Anaesthesia and Treatment, Fish Diseases Refresher Course for Veterinarians, 26-35, Post Graduate Committe in Veterinary Science, University of Sydney, Sydney, 08146829.

FRANCIS-FLOYD, R. 2003. Introduction to Fish Health Management. Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

GELDREICH, E.E. and CLARKE, N.A. 1966. Bacterial Pollution Indicators in the Intestinal Tract of Freshwater Fish. Applied and Environmental Microbiology, (14): 3, 429-437.

GRONDEL, J.L., NOUWS, R.V., DEJONG,M., SCHUTTE,R. and DRIESSENS,F. 1987. Pharmocokinetics and Tissue Distribution of Oxytetracycline in Carp, *Cyprinus carpio*, Following Different Routes of Adminastration. Journal of Fish Diseases, 10: 153-163.

GÜLAY, Z. 1999. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 91-108.

HEO, MS., SONG, CB., LEE, JH., YEO, IK., JEON, YJ., LEE, JJ., CHUNG, SC., LEE, KW, RHO,S., CHOI, KS. and LEE, YD. 2001. Characteristic of β-Streptococcus spp. Isolated in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju Island. Journal of Korean Fish Society, 34: 365-369.

HOLT, G.H., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. and WILLIAMS, S.T. 2004. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins Co., Ninth Edition, 787.

INGLIS, V. 1993. *Pseudomonas* and *Alteromonas* Infection. In: Bacterial Disease of Fish. Ed. Inglis,V., Roberts, R.R., Bromage, N.R., Blackwell Science Ltd., 169-173.

INGLIS, V., ROBERTSON, D., MILLER,K., THOMPSON, K.D. and RICHARDS, R.H. 1996. Antibiotic Protection Against Recrudescence of Latent *Aeromonas salmonicida* During Furunculosis Vaccination. Journal of Fish Diseases, 19: 341-348.

IZUMI, S. and ARANISHI, F. 2004. Plasmid profilling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. Journal of Aquatic Animal Health, 16: 99-103.

İSPİR, Ü., ŞEKER, E., SAĞLAM, N. ve DÖRÜCÜ, M. 2004. Doğu Anadolu Bölgesinde Bazı Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde Görülen *Flavobacterium psychrophilum* Enfeksiyonunun Araştırılması. Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16 (4): 718-724.

JUN, L., JUN, Y., RITA,W.T.F., JULIA, M.L.L., HUOISHU, X. and NORMAN, Y.S.W. 1999. Antibiotic Resistance anda Plazmid Profiles of Vibrio Isolates from Cultured Silver Sea Bream, *Sparus sabra*. Marine Pollution Bulletin, 39 (1-12): 245-249.

KARAKAŞ, H.H. ve TÜRKOĞLU, H. 2005. Su Ürünlerinin Dünya ve Türkiye'deki Durumu. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9 (3): 21-28.

KAV, K. ve ERGANİŞ, O. 2008. Antibiotic Susceptibility of *Lactococcus garvieae* In Rainbow Trout (*Oncorhyncus mykiss*) Farms. Bulletin of Veterinary Institute Pulawy, 52 (2): 223-226.

KITAO, T. 1993. Streptococcal Infections. Bacterial Diseases of Fish. Eds. Inglis V, RJRoberts, NR Bromage. Blackwell Science Ltd. Cambridge, 196-210.

KORKUT, A.Y., HOŞSU, B. ve GÜLTEPE, N. 2002. Balıklarda Beslenmeye Bağlı Hastalıklar. Ege Ünivesitesi Su Ürünleri Dergisi, Ege Üniversitesi Journal of Fisheries&Aquatic Sciences, 19 (3-4): 555-564.

KUBİLAY, A., ALTUN,S., ULUKÖY,G. ve DİLER, Ö. 2005. *Lactococcus garvieae* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1 (1): 39-48.

KUSUDA, R., KAWAI, K., TOYOSHIMA, T. and KOMATSU, I. 1976. A new pathogenic bacterium belonging to the genus *Streptococcus*, isolated from epizootic of cultured yellowtail. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 42: 1345-1352.

LORENZEN, N. 2004. Use of plasmid DNA for induction of protective immunity. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24 (1): 11-15.

MAKI, T., HIRANO, I. and AOKI, T. 2008. Drug resistance mechanism of the fish pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. Journal of Fish Diseases, 31: 461-468.

MAZZOLINI, E., VISMARA, D., CESCHIA, G., MALVISI, J., FABRIS, A., PASSERA, A., DANIELİS, L. and GIORGETTI, G. 2003. In vitro activity of several chemiantibiotics against clinical isolates of fresh and marine fish pathogens.

MENENDEZ, A., FERNANDEZ, L., REIMUNDO, P. and GUIJARRO, J.A. 2007. Genes required for *Lactococcus garvieae* survival in a fish host. Microbiology, 153: 3286-3294.

MEYERS, JA., SANCHEZ, D., ELWELL, LP. and FALKOW, S. 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology, **127 (**3): 1529–1537.

MUSA, N., WEI, L. S., WEE, W., LEONG, L. K., SHAH, S. M. and YING, T. H. 2008. Studies of Phenotypic and Numerical Taxonomy of *Vibrio* spp. Isolated from Oyster, *Crassostrea iredalei*. World Journal of Agricultural Sciences, 4 (2): 189-197.

MU´ZQUIZ, JL, ROYO, FM., ORTEGA, C., DE BLAS, I., RUIZ, I. and ALONSO, JL. 1999. Pathogenicity of streptococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): dependence of age of diseased fish. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 19: 114–9.

NCCLS, 2003. Disk Difüzyon Ek Tablolar, M100-S13 (M2). Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 72.

NEEDHAM, D.J. 1988. Anaesthesia and Treatment, Fish Diseases Refresher Course for Veterinarians, Post Graduate Committe in Veterinary Science, University of Sydney, Sydney, 513-531.

ÖZER, S., BULDUKLU, P.S. ve DÖNMEZ, E. 2008. Mersin İlinde Yetiştiriciliği Yapılan Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Streptokokkozis Varlığı. Journal of Fisheries Sciences, 2 (3): 272-283.

ÖZTÜRK, T., DİDİNEN, B.I., DOĞAN,G., ÖZER, A. ve BİRCAN, R. 2009. Gökkuşağı Alabalığında, (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) Lactococcosis Hastalığı ve Etken *Lactococcus garvieae*'nin Antibakteriyel Duyarlılığı. Ulusal Su Günleri 2009 Sempozyumu, 29 Eylül – 1 Ekim ELAZIĞ.

PARKER, R. 2002. Aquaculture Science, 2nd Ed. Delmar Thomson Learning, 621.

PEREIRA, F., RAVELO, C., TORANZO, AE. and ROMALDE, JL. 2004. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24: 274–9.

PILLAY, T.V.R. 1990. In: Aquaculture Principles and Practices, 351-359.

RAVELO,C.,MAGARINOS, B., LOPEZ-ROMALDE, S., TORANZO,A.E. and ROMALDE,J.L. 2002. Molecular Fingerprinting of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of Clinical Microbiology, 41 (2): 751-756.

RAVELO, C., MAGARIN˜OS, B., ROMALDE, JL. and TORANZO, AE. 2001. Convencional versus miniaturizad systems for the phenotypic characterization of *Lactococcus garvieae* strains. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 21: 136–44.

ROBERTS, R.J. and SHEPHERD, C.J. 1990. Handbook of Trout and Salmon Diseases, Fishing News Books, London.

ROSSOLINI, G.M. and MANTENGOLI, E. 2005. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical of Microbiology and Infection, 11 (4): 17-32.

SARIHAN, E. ve TEKELİOĞLU, N. 2005. Balık Üretimi, Nobel Kitabevi, ISBN: 975 8561-33-2.

SAVVIDIS,G.K., ANATOLIOTIS, C., KONAKI,Z. and VAFEAS,G. 2007. Epizootic outbreaks of *Lactococcosis* disease in rainbow trout, *O. mykiss* (Walbaum), culture in Greece. Bulletin ofthe European Association of Fish Pathologists, 28 (5): 207.

SEELEY, Jr. H.W. and VAN DEMARK, P.J. 1972. Microbes in Action A Laboratory Manual of Microbiology. Second Edition. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

SEREZLİ, R., ÇAĞIRGAN, H., OKUMUŞ, İ., AKHAN, S.ve BALTA, F. 2005. The Effect of Oxytetracycline on Non-spesific Immune Response in Sea Bream (*Sparus aurata* L.1758). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 29: 31-35.

SHIN, G.W., PALAKSHA, H.H., YANG, Y.S., SHIN, Y.S., KIM, Y.R., LEE, E.Y., KIM, H.Y., KIM, Y.J., OH, M.J., YOSHIDA, T., and JUNG, T.S. 2006. Discrimination of streptococcosis agents in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) . Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 26: 68-79.

SOFIA, 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

SOLTANI, M., NIKBAKHT, Gh., MOUSAVI, H. A. E. and AHMADZADEH, N. 2008. Epizootic outbreaks of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 28 (5): 170-175.

SUGITA, T., TAKASHIMA, M., SHINODA, T., SUTO, H., UNNO, T., TSUBAI, R., OGAWA, H. and NISHIKIWA, A. 2002. New yeast species, Malassezia dermatis, isolated from patients with atopic dermatitis. Journal of Clinical Microbiology, 40: 1363-1367.

SØORUM, H. and OLSUIKO, P. 1988. Plasmids in *Vibrio salmonicida* isolated from salmonids with haemorrhagic syndrome (Hitra disease). Journal of Clinical Microbiology, 26 (9): 1679-1683.

TAŞ, B. 2007. Vona Koyu'nda (Güney Karadeniz, Ordu, Türkiye) Su Ürünleri Yetiştiriciliği. Journal of Fisheries.Sciences.com, 1 (4): 176-183.

THOMPSON, R. 1986. R plasmid transfer. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 18: 13-23.

THILLAI SEKAR, V., SANTIAGO, T.C., VIJAYAN, K.K., ALAVANDI, S.V., STALIN RAJ, V., RAJAN, J.J.S., SONJUKTHA, M. and KALAIMANI, N. 2008. Aquatic Animal Health Division, Central Institute of Brackishwater Aquaculture, Chennai, India. Letters in Applied Microbiology, 46 (6): 667–672.

TİMUR, G. ve TİMUR, M. 2003. Balık Hastalıkları İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No:5, ISBN 975-404-699-9, 519.

TORANZO, A.E., BARJA, J.L., COLWELL, R.R. and HETRICK, F.M. 1983. Characterization of Plasmids in Bacterial Fish Pathogens. Infection and Immunity, 39 (1): 184-192.

TORANZO, A.E., COMBARRO, P., LEMOS, M.L. and BARJA, J.L. 1984. Plasmid Coding for Transferable Drug Resistance in Bacteria Isolated from Cultured Rainbow Trout. Applied and Environmental Microbiology, 48 (4): 872-877.

TROAST, J.L. 1975. Antibodies Against Enteric Bacteria in Brown Bullhead Catfish (*Ictalurus nebulosus*, LeSueur) Inhabiting Contaminated Waters. Applied Microbiology, 30 (2): 189-192.

TURGUT, E., DEVELİ, N. ve TIRIL, S. 2007. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Probiyotiklerin Kullanımı. GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 24 (2): 13-18.

TÜKEL, Ç. ve AKÇELİK, M. 2000. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Suşlarında Laktoz Plazmidlerinin Tanımlanması. Turkish of Journal Biology, 24: 405–424.

TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU. 2007. Su Ürünleri İstatistikleri, Fishery Statistics, ISSN:1013-6177, ISBN: 978-975-19-4320-0, Ankara.

VAN DER HAIDJEN, M.H.T., VAN MUISWINKEL, W.B., GRONDEL, J.L.and BOON, J.H. 1991. Immunomodulating Effects of Antibiotics. In: Chemotherapy in Aquaculture: From Theory To Reality, Symposium, Paris, 219-239.

VENDRELL, D., BALCAZAR, J. L., RUIZ-ZARZUELA, I., DE BLAS, I., GIRONES, O. and MUZQUIZ, J. L. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. Comparative Immunology**,** Microbiology & Infectious Diseases, 29: 177–198.

YUASA, K., KITANCHAROEN, N., KATAOKA, Y. and ABDULJALIL AL MURBATY, F. 1999. *Streptococcus iniae* the Causative Agent of Mass Mortality in Rabbitfish *Siganus canaliculatus* in Bahrain. Journal of Aquatic Animal Health, 11: 87-93.

ÖZGEÇMİŞ

Mehtap KURTOĞLU 1985 yılında Van'da doğdu. İlköğretimi Van'da, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2004 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden 2008 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldu. Ekim 2008-Haziran 2010 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.