



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**BORÇKA BARAJ GÖLÜNDE KÜLTÜRÜ YAPILAN GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*) BAKTERİYEL
HASTALIKLARIN MEVSİMSEL DAĞILIMI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fatma AYDIN

Danışman

Prof. Dr. Fikri BALTA

RİZE

2024

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında, Prof. Dr. Fikri BALTA danışmanlığında, Fatma AYDIN tarafından hazırlanan *Borçka Baraj Gölünde Kültürü Yapılan Gökkuşaağı Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) Bakteriyel Hastalıkların Mevsimsel Dağılımı* adlı bu tez çalışması, 16/12/2024 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı, Adı SOYADI

İmza

Başkan

:

Prof. Dr. Fikri BALTA

Üye

:

Prof.Dr. Bülent VEREP

Üye

:

Doç. Dr. Şükrü ÖNALAN

ETİK BEYAN

Su Ürünleri Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Borçka Baraj Gölünde Kültürü Yapılan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bakteriyel Hastalıkların Mevsimsel Dağılımı” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

16/12/2024

Fatma AYDIN

ÖN SÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında Prof. Dr. Fikri BALTA danışmanlığında Yüksek Lisans Tezi olarak Fatma AYDIN tarafından hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasının konusu “Borçka Baraj Gölünde Kültürü Yapılan Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bakteriyel Hastalıkların Mevsimsel Dağılımı” olarak belirlenmiştir.

Balık yetiştiriciliğinde toplu ölümlere bağlı ekonomik kayıpların önüne geçmek ve sürdürülebilir bir üretim gerçekleştirmek için hastalık etkenlerin doğru ve hızlı tanımlanmasının yapılması oldukça önemli bir konudur. Hastalık etkenlerin izole edip etkili kimyasal ajanların tespit edilerek uygun doz ve sürede kullanılması toplu balık ölümlerini azaltacaktır. Etkili tedavinin yapılması bakterilerde oluşacak bakteriyel direnç şekillenmesini önleyeceği gibi sucul ortamda oluşacak kimyasal kirlenmenin de önüne geçecektir. Aynı zamanda tedavi sonrası ilaç atılım süresine dikkat edilmesi balıkta oluşabilecek antibiyotik kalıntı riskini de azaltmış olacaktır.

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fikri BALTA’ya, laboratuvar çalışmalarında yardımlarından dolayı Dr. Zeynep DENGİZ BALTA’ya ve bu süreçte manevi desteklerini esirgemeyen aileme ithaf olunur.

Hazırlanan bu Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından FYL-2023-1467 nolu proje ile desteklenmiştir.

Fatma AYDIN

RİZE/2024

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIX
TABLolar LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR.....	VIII
GİRİŞ.....	1
1. GENEL BİLGİLER	7
1.1. Literatür Özeti.....	7
1.2. Bakteriyel Balık Hastalıkları	7
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	16
2.1. Materyal.....	16
2.1.1. Balık Numunelerinin Toplanması.....	16
2.2. Metod.....	16
2.2.1. Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu	16
2.2.2. Geleneksel İdentisikasyon Testler.....	19
2.2.2.1. Hareket Muayenesi.....	19
2.2.2.2. Katalaz Testi.....	19
2.2.2.3. Oksidaz Testi.....	20
2.2.2.4. Gram Boyama.....	20
2.2.3. İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testler.....	21
2.2.3.1. Triple Sugar İron Agar.....	21
2.2.3.2. Eskülin Agar.....	22
2.2.3.3. Simmon Sitrat Agar.....	22
2.2.3.4. MR-VP Medium.....	23
2.2.3.5. Üre Testi.....	23
2.2.3.6. Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri.....	24
2.2.3.7. İndol Besiyeri.....	24

2.2.3.8. Nitrat Besiyeri.....	25
2.2.3.9. O/F Basal Medium.....	25
2.2.3.10. L-Arjinin Testi.....	26
2.2.3.11. L-Lysine Hydroclorid Testi.....	26
2.2.3.12. L-Ornithine Monohydroclorid Testi.....	26
2.2.3.13 %0'lık Tuzda Üreme Testi.....	27
2.2.3.14. %1'lık Tuzda Üreme Testi.....	27
2.2.3.15. %6'lık Tuzda Üreme Testi.....	28
2.2.4. Biyokimyasal Teslerin Ayraçları.....	29
2.2.4.1. Kovacs Ayracı.....	29
2.2.4.2. Metil Red (MR) Ayracı.....	29
2.2.4.3. Voges Proskauer (VP) Ayracı.....	29
2.2.4.4. Nitrat Ayracı.....	30
2.2.4.5. Katalaz Ayracı.....	30
2.2.4.6. Oksidaz Ayracı.....	30
2.2.5. Bakteri İzolatların Genomik DNA'ların Elde Edilmesi.....	30
2.2.5.1. Gr (+) ve Gr (-) Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu.....	31
2.2.6. PZR'la Bakteri İzolatlarının Doğrulanması.....	32
2.2.7. Api 20 Strep Testinin Kullanılabilirliği	34
2.2.8. Antibiyogram Testi	35
3. BULGULAR.....	37
3.1. Hastalıklı Gökkuşığı Alabalığındaki Klinik Bulgular.....	37
3.2. Geleneksel İdentifikasyon Test Sonuçları.....	38
3.3. Api 20 Strep Test Sonuçları.....	40
3.4. PZR Ürünlerin Sekans Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	42
3.5. Antibiyogram Test Sonuçları.....	50
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	53
4.1. Sonuç ve Tartışma.....	53
4.2. Öneriler.....	56
KAYNAKÇA.....	58

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Su Ürünleri Anabilim Dalı

Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi

Danışmanı : Prof. Dr. Fikri BALTA

Hazırlayan : Fatma AYDIN

Yıl : 2024

Sayfa Sayısı : 65

ÖZET

BORÇKA BARAJ GÖLÜNDE KÜLTÜRÜ YAPILAN GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*) BAKTERİYEL HASTALIKLARIN MEVSİMSEL DAĞILIMI

Bu çalışmada, Borçka baraj gölündeki yüzer ağ kafeslerinde tipik hastalık şüphesi olan gökkuşağı alabalıkları Fakültemiz Hastalıklar Laboratuvarına getirilen örnekler muayene edildi. Dört farklı mevsimde aylık olarak örneklenen hastalıklı balıkların böbreklerinden izole edilen 44 saf bakteri izolatları kullanıldı. Akuakültürde yoğun balık stoklamak, su kalitesinin bozulmasına bağlı olarak balıklarda strese neden olmaktadır. Mevsimsel su sıcaklığındaki artış ve azalış firstcı patojenlerin sıcaklık stresi nedeniyle gökkuşağı alabalıklarında bakteriyel enfeksiyonların meydana gelmesine neden olmaktadır. Gökkuşağı alabalık çiftliklerinde yoğun stoklama, düşük su kalitesi (pH, amonyak, nitrit, vs) suyun fiziksel ve kimyasal parametrelerindeki olumsuzlukların yanı sıra ani su sıcaklığı değişimine bağlı strese karşı % 70'e varan toplu ölümler nedeni ile büyük ekonomik kayıpların neden olduğu bakteriyel balık patojenleri arasında *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* enfeksiyonları meydana geldiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Borçka Baraj Gölündeki gökkuşağı alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) bakteriyel hastalık etkenleri mevsimsel olarak örneklenmiştir. Yapılan ekimlerden izole edilen bakteri izolatları (44 adet bakteri izole edilmiş) - 80°C'de stoklanmıştır. İzole edilen hastalık etkenlerinin tanımlanması PZR metodu ile belirlenmiş ve kemoterapotik maddelere karşı antimikrobiyel hassasiyetleri bu tez çalışması ile tespit edilmiştir. Yapılan test sonucuna göre tüm izolatların bakteri izolatların kemoterapotik maddelere karşı antimikrobiyel etkinliği disk diffüzyon yöntemi kullanılarak Müller Hinton Agarda gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre en yüksek direnç %86,36 eritromisinde, %81,81 Ampisilin ve %72,27 Amoksiklinde tespit edilmiştir. En düşük direnç %15,90 enrofloksasin ve %6,82 doksisisiklin olduğu belirlenmiştir. Bu kemoterapotik maddelerden en etkin olanı sırasıyla %86,36 doksisisiklin, %56,82 flumequin ve %50 enrofloksasin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı alabalığı, bakteri suşları, antibakteriyel aktivite, identifikasyon.

Recep Tayyip Erdogan University Graduate Education Institute

Department : Fisheries

Thesis Type : Master's Thesis

Supervisor : Prof. Dr. Fikri BALTA

Author : Fatma AYDIN

Year : 2024

Pages : 65

ABSTRACT

SEASONAL DISTRIBUTION OF (*Oncorhynchus mykiss*) BACTERIAL DISEASES IN RAINBOW TROUT CULTURED IN BORÇKA DAM LAKE

In this study, samples of rainbow trout with typical disease suspicion brought to our Faculty Diseases Laboratory in floating net cages in Borçka Dam Lake were examined. 44 pure bacterial isolates isolated from kidneys of diseased fish sampled monthly in four different seasons were used. Intensive fish stocking in aquaculture causes stress in fish due to deterioration of water quality. Increase and decrease in seasonal water temperature causes bacterial infections in rainbow trout due to heat stress of opportunistic pathogens. Intensive stocking in rainbow trout farms, low water quality (pH, ammonia, nitrite, etc.), negative effects on physical and chemical parameters of water as well as stress due to sudden water temperature changes, caused mass mortality of up to 70% and major economic losses due to bacterial fish pathogens such as *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia ruckeri* *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri* infections have been reported by different researchers. Bacterial disease agents in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Borçka Dam Lake were sampled seasonally. Bacterial isolates (44 bacteria were isolated) isolated from the cultures were stored at -80°C. Identification of isolated disease agents was determined by PCR method and their antimicrobial susceptibilities to chemotherapeutic agents were determined in this thesis study. According to the test results, antimicrobial activity of all bacterial isolates against chemotherapeutic agents was determined by disk diffusion method on Müller Hinton Agar. According to the results of this thesis study, the highest resistance was detected in 86.36% erythromycin, 81.81% Ampicillin and 72.27% Amoxicillin. The lowest resistance was determined as 15.90% enrofloxacin and 6.82% doxycycline. The most effective of these chemotherapeutic agents were determined to be 86.36% doxycycline, 56.82% flamequine and 50% enrofloxacin, respectively.

Keywords: Rainbow trout, bacterial strains, antibacterial activity, identification.

KISALTMALAR

ATCC	:	American Type Culture Collection
API	:	Application Programming Interface
BHIA	:	Brain Heart Infizyon Agar
BHIB	:	Brain Heart Infizyon Brot
°C	:	Santigrat Derece
Doç. Dr.	:	Doçent Doktor
Dr. Öğr. Üyesi	:	Doktor Öğretim Üyesi
FTS	:	Fizyolojik Tuzlu Su
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
H ₂ S	:	Hidrojen Sülfür
<i>L. garvieae</i>	:	<i>Lactococcus garvieae</i>
MHA	:	Müller Hilton Agar
NaCl	:	Sodyum Klorür
<i>O. mykiss</i>	:	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Prof. Dr	:	Profesör Doktor
RTEÜ	:	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
TSA	:	Triptik Soy Agar
TSB	:	Triptik Soy Brot
TÜİK	:	Türkiye İstatistik Kurumu
µg	:	Mikrogram
vd.,	:	ve diğerleri

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Alabalık üretiminin 2020-2021 yıllarına ait dağılımı miktarı.....	3
Tablo 2. Karadeniz Bölgesindeki Baraj Göllerindeki işletmeler ve üretim miktarı.....	4
Tablo 3. Karadeniz Bölgesindeki İllerde denizde gökkuşuğu alabalığı üretimi miktarı.....	5
Tablo 4. Borçka Baraj Gölünde Kuzuoğluna ait işletme sayıları ve yıllık üretim miktarı.....	5
Tablo 5. Kok hastalık etkenlerinin taksonomik olarak sınıflandırılması	13
Tablo 6. Gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen bakterilerin kökenlerine ait bilgiler.....	17
Tablo 7. PZR testinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyon miktarları	32
Tablo 8. PZR testinde üniversal primerlerin döngü koşulları.....	33
Tablo 9. Antibiyotik disklerin konsantrasyonları ve zon çapı sınır değer aralıkları..	35
Tablo 10. Bakteri izolatlarına ait geleneksel test sonuçları.....	37
Tablo 11. Kok izolatların Api 20 strep kitindeki biyokimyasal test sonuçları.....	41
Tablo 12. GenBank veri sisteminde PZR ürünlerin benzerlik oranlarının karşılaştırılması.....	42
Tablo 13. Hastalık etkenlerinin mevsimsel dağılımı.....	48
Tablo 14. Bakteri izolatlarına ait kemoterapotiklerin antimikrobiyel hassasiyet profilleri.....	50
Tablo 15. Api 20 strep test kitinde kok izolatlarının api wep sistemindeki benzerlikleri.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Gökkuşığı alabalığı (<i>O. mykiss</i>)’nın genel görünümü	3
Şekil 2. Ülkemiz sularında 2013-2022 yılları arasında en çok yetiştirilen balık türleri..	4
Şekil 3. Kanlı agarda kok hastalık etkeni <i>Lactococcus</i> spp.’nin görünümü.....	14
Şekil 4. Bakteri izolatlarının Gram boyama işlemine ait basamakları	20
Şekil 5. Api 20 strep test kitinde kok izolatının inkübasyondan sonraki ilk görünümü.....	34
Şekil 6. Gökkuşığı alabalığında kok hastalığının tipik dış semptomları.....	36
Şekil 7. Gökkuşığı alabalığında iç organlardaki kok hastalığının belirtileri.....	36
Şekil 8. <i>L. garvieae</i> referans izolatına (ATCC43921) ait API 20 Strep testinde ayıraçlar dökülmeden önceki ve döküldükten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları	40
Şekil 9. Bakteri izolatların api 20 strep test kiti kuyucuklarına ilavesine ait ilk görüntü.....	41
Şekil 10. Api 20 strep kitine ayıraçların ilavesinden 10 dakika sonraki görüntü.....	41
Şekil 11. Disk diffüzyon yöntemi ile iyapılan antimikrobiyel testlerin sonuçları.....	50
Şekil 13. Hastalık vakalarından izole edilen bakteri izolatlarının kemoterapotik maddelere karşı oluşturulan toplam direnç miktarları (%).....	52

GİRİŞ

Dünya nüfusuna paralel olarak ülkemizdeki insan nüfusunun her geçen gün doğum artışına, çevre ülkelerdeki savaşlara ve insan kaçakçılığına baēlı nedenlerle artmasına paralel olarak gıda üretiminin yetersiz kalması insanoēlunun ihtiyacı olan beslenme problemlerini de beraberinde getirmektedir. İnsanların yaşam için günlük ihtiyacı olan proteine, karbonhidrat, yaē ve vitaminlere olan ihtiyaçların karşılanması en önemli ihtiyaçlardan biridir. Saēlıklı bir yaşam için insanın özellikle hayvansal proteinlere ihtiyacı vardır. Ülke nüfusunun bitkisel ve hayvansal üretimin yeterli düzeyde olmaması aksi takdirde önemli bir gıda yetersizliēi probleminin oluşması kaçınılmazdır. Dünyanın gelişmiş ülkeleri nüfus artışına paralel olarak ihtiyaç duyulan gıda üretimini maksimum seviyelere çıkarmak için klasik üretim tekniklerini terk ederek araştırma projeleri ile geliştirilen modern üretim teknikleri kullanılarak bitkisel ve hayvansal üretimi geliştirmek ve gıda verimliliēi artırarak için çalışmalarını her geçen gün hızlı bir şekilde sürdürmektedir. Hayvansal kökenli protein tüketimi gelişmiş ülkelere kıyaslandığında ülkemizde tüketiminin yeterli düzeyin altında olduēu bilinmektedir. 20. yüz yılda insanların şehir hayatına göç etmesi beslenme alışkanlıklarında deēiřikliklere neden olmuştur. İnsanoēlunun beslenme alışkanlıklarında hayvansal üretimin yeri oldukça önemlidir. Hayvan gıdalarda büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar, kanatlılar ve su ürünleri hayvanlarından karşılanmaktadır. İnsanların çeşitli nedenlerle köyden şehirleri göçü hayvansal üretimde düşüşlere neden olmuştur. Son yıllarda hayvansal üretim daha kolay olan kanatlı kümes hayvanları ve su ürünleri doēal kaynaklardan avlanan hayvansal ürünlerin azalması nedeni ile su ürünleri kültür üretimine aēırlık verilmiştir. Ülkemizde akuakültürde üretilen balıkların başında alabalık, levrek ve çipura balıkları gelmektedir. Ülkemizin özellikle Karadeniz bölgesinde yoğun olarak kültürü yapılan balık türü gökkuřaēı alabalıēıdır. Bu balıkların bulundurduēu hayvansal protein grubu ve özellikle essansiyel amino asitler insan besini olarak oldukça önemlidir. Ülkemizde, hayvansal protein açığıнын kapatılması için insan tüketimine sunulan balıketi besleyici deēeri yüksek önemli bir kaynaēı oluřturduēu rapor edilmiştir (Doēan, 2002). Ülkemiz iklim ve ekolojik özellikleri bakımından genellikle balık üretiminin yapılabilmesi için uygun sucul ortamlara sahip olduēu bildirilmiştir. Ayrıca,

Ülkemizde balık üretiminde özellikle alabalık yetiştiriciliği önemli bir yere sahip olduğu rapor edilmiştir (Akbulut vd., 2001; Dolgun, 2015). Gökkuşağı alabalığı, Kuzey Amerika menşeyli bir tür olup, yetiştiricilik acısından havuz ve kafes gibi ortamlara kolay uyum sağlayan, suni yemlerden yararlanma oranının gayet iyi olması, suni şartlar altında yumurta ve sperm sağım işlemlerinin kolay yapılabilmesi, döllenmiş yumurtaların kuluğka sresinin kısa olması, hastalıklarının iyi bilinmesi ve diğer türlere nazaran hastalıklara karşı daha dayanıklı olması gibi birçok özellikleri nedeniyle ülkemiz su ürünleri yetiştiricileri tarafından tercih edilen bir tür olduğu bildirilmiştir (Yılmaz, 2011).

Türkiye’de son yıllarda klasik balık üretiminin terk edilerek modern üretim tekniklerinin devreye girmesiyle yetiştiriciliği yapılan ilk balık türü gökkuşağı alabalığıdır. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının girişimiyle ilk üretim denemeleri Konya Konuklar Devlet retim iftliğinde gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (elikkale vd., 1999). Ülkemizde ilk özel alabalık iftliği 1968 yılında Bilecik-Söğüt’te kurulduğu bildirilmiştir (Elbek vd., 1992).

Salmonidae familyasının bir bireyi olan alabalıklar soğuk, berrak ve bol oksijenli akarsularda yaşamlarını sürdürmekle birlikte uygun gl ve baraj göllerinde de kültür yoluyla yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Gökkuşağı alabalıkları ince uzun bir vücut yapısına sahip olan balıkların en ayırt edici özelliği sırt yüzgeci ile kuyruk yüzgeci arasında bir adet adipoz (yağ) yüzgecine bulunduruğu bildirilmiştir (elikkale, 2002). Alabalıkların beslenme alışkanlıkları bakımından etil (karnivor) canlılar oluğu ve türlere arasında farklı sayıda dişlerinin olabileceği rapor edilmiştir (Dolgun, 2015). Alabalıklar yaşamsal döngülerini göre hayatlarının tamamını iç sularda geçirebildiği gibi hayatlarının belli bir evresini tatlı sularda, belli bir evresini de denizel ortamlarda yaşayabilen (Anadrom) olmak üzere iki farklı grubun var olduğu literatürde bildirilmiştir (elikkale, 2002). Alabalıklar coğrafik kökenlerine bakıldığında Avrupa ve Kuzey Amerika olmak üzere de iki ayrı gruba ayrılmış olduğu bildirilmiş ve ülkemizde ise köken olarak daha çok Kuzey Amerika orjinli gökkuşağı alabalığının kültürünün yapıldığı bildirilmiştir (Dolgun, 2015). Gökkuşağı alabalığı anatomik olarak deri üzerinde sikloid ve küçük pul yapısına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, yzgelerinden dorsalde 10-12 ve analde ise 8-12 yumuşak ışına sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu balıkların yan yüzeylerinde gökkuşağı görünümde bir bantın

bulunmasıyla karakterize olduğu ve bu nedenle de gökkuşağı alabalığı isimi ile adlandırıldığı bildirilmiştir (Yılmaz, 2011). Gökkuşağı alabalığının genel anatomik dış görünümü Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*)’nın genel görünümü (Anonim)(URL-2)

Su ürünleri üretimi Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK-2022) verilerine göre 2021 yılı üretiminden %6,2’lık bir artış sağlayarak 849,808 tonluk bir üretim gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Ülkemizde iç sularda ve denizlerde üretimi yapılan alabalıkların 2022 yılı bir önceki göre artış miktarları baz alınarak hazırlanan Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Alabalık üretiminin 2020-2021 yıllarına ait dağılımı miktarı (TÜİK, 2022), (URL -1)

Yetiştiricilik alanı	Balık türü	2020	2021
İç su (Ton)	Alabalık (Gökkuşağı)	126.101	134.174
Deniz (Ton)	Alabalık (Gökkuşağı)	18.182	31.509

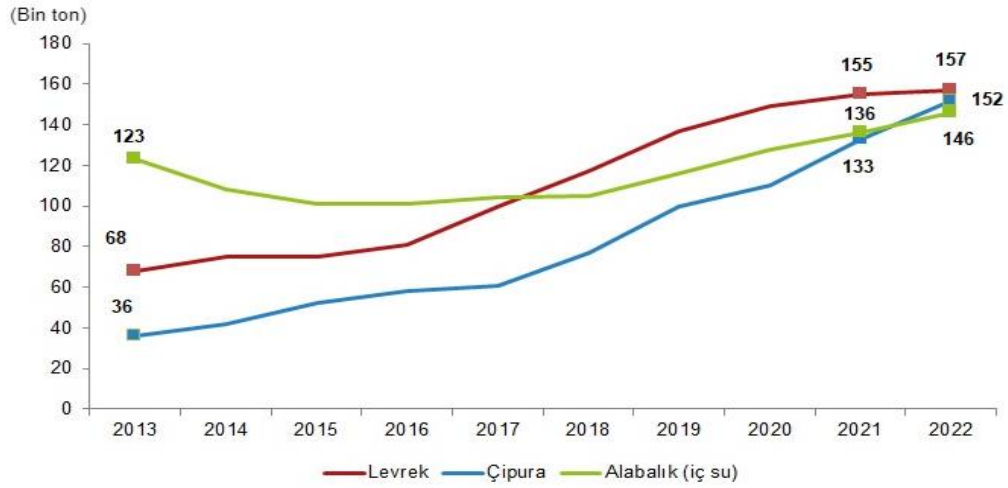
Karadeniz Bölgesindeki 8 farklı ilin sınırları içerisinde baraj göllerinde gökkuşağı üretimi yapılmaktadır. Bu işletmelere bulunduğu iller üretim yapılan baraj gölleri Artvin ilinde Borçka ve Deriner baraj gölü, Bayburt ilinde Demirözü baraj gölü, Gümüşhane ilinde Kürtün ve Torul baraj gölü, Kastamonu ilinde Germeçtepe ve Karadere baraj gölü, Ordu ilinde Topçam baraj gölü, Samsun ilinde Yakakent ve Derbent barajı, Sinop ilinde, Tokat ili Almus baraj gölündeki işletmelerin sayıları ve yıllık üretimleri miktarları Tablo 2’de verilmiştir.

Ülkemizde su ürünleri üretimi Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK-2022) verilerine göre 2013-2022 yılları arasında en çok yetiştiricilik yoluyla hasat yapılan balıklar (Bin ton) grafik olarak Şekil 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Karadeniz Bölgesindeki Baraj Göllerindeki işletmeler ve üretim miktarı

İller	İşletme Sayısı	Yıllık Üretim Miktarı (Ton)
Artvin	11	5645
Bayburt	3	815
Gümüşhane	28	5293
Kastamonu	9	1304
Ordu	3	647
Samsun	22	6802
Sinop	4	1400
Tokat	30	8196
Toplam	110	30102

En çok yetiştiriciliği yapılan balıklar, 2013-2022



Şekil 2. Ülkemiz sularında 2013-2022 yılları arasında en çok yetiştirilen balık türleri

Karadeniz Bölgesindeki illerde karasal gökkuşağı alabalık tesislerin yanı sıra balıkların hızlı büyütülmesi için kış döneminde denizlere taşınmaktadır. Bu amaçla Karadeniz’de farklı illerin açıklarındaki projelendirilerek hazırlanmış yüzer ağ kafeslerde yurt dışı ihracata yönelik alabalık üretimi yapılmaktadır. Karadeniz Bölgesindeki illerin açıklarında konuşlandırılmış gökkuşağı alabalığına ait işletme sayısı ve yıllık üretim miktarları ise Tablo 3’de gösterilmiştir (Yıldırım & Çantaş, 2022).

Tablo 3. Karadeniz Bölgesindeki İllerde denizde gökkuşağı alabalığı üretimi miktarı

İller	İşletme Sayısı	Yıllık Üretim Miktarı (Ton)
Artvin	8	95500
Ordu	10	4869
Rize	3	2850
Samsun	8	10384
Sinop	32	37830
Trabzon	18	25890
Toplam	69	177325

Artvin İl Borçka baraj gölünde kurulu 11 adet farklı işletmenin konumlanmış olduğu görülmektedir. Bu işletmelerden 7 adeti Kuzuoğlu AŞ işletmesine ait olup, Ardesom AŞ, Aydersom AŞ, Ayder Su Ürünleri ve Önder Alabalık işletmeleri mevcuttur. Bu baraj gölünde en büyük kapasite ve yıllık üretim miktarı Kuzuoğlu AŞ işletmesine aittir. Bu çalışmanın yapılmış olduğu Kuzuoğlu AŞ ait 7 işletmenin proje kapasiteleri ve yıllık üretim miktarları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 4. Borçka Baraj Gölünde işletme sayısı ve yıllık üretim miktarı

Kuzuoğlu AŞ	Proje Kapasitesi (Ton)	Yıllık Üretim Miktarı (Ton)
Kuzuoğlu Su Ürünleri	500	480
Kuzuoğlu Et-Balık	950	925
Kuzuoğlu Balıkçılık	950	915
ABU Su Ürünleri	250	240
Laviya	500	450
Seabreeze	245	235
Selazur	500	500
Diğer İşletmeler	Proje Kapasitesi (Ton)	Yıllık Üretim Miktarı (Ton)
Artvin Balıkçılık	1 8*Ğ250*TD<	220
Ayder Yem	500	350
ARDESOM	500	450
AYDERSOM	500	390
TOPLAM	5645	5155

Akuakültürde yetiştiriciliği yapılan balıklarda hastalık etkeni olarak 1990 yılına kadar olan zaman zarfında toplam 15-20 bakteri türünün varlığından bahsedildiği rapor edilmiştir (Munro, 1982). Balık hastalıkları üzerine yapılan son araştırmalar ile bu sayı her geçen gün artış göstermekte olduğu ve hastalık vakalarından tür bazında 70 civarında patojen olan hastalık etkeninin izole edildiği bildirilmiştir (Woo vd., 2003).

Dünyamızın farklı ana kıtalarında değişik coğrafik özellikler gösteren bölgelerinde yapılan araştırmalarda gökkuşağı alabalıklarındaki hastalık vakalarından *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *Flexibacter* spp., *Yersinia* spp. gibi bakteriyel hastalık etkenleri izole edilerek tanımlanmıştır. Bu hastalık vakalarından özellikle *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* ve *Lactococcus garvieae* gibi hastalık etkenlerinin önemli ekonomik kayıplara yol açtığı farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Akinbowale vd., 2006; Avcı vd., 2010; 2014; Burka vd., 1997; Cagırgan, 2004; Kum vd., 2004; Balta vd., 2010; Balta vd., 2019; Schmidt vd., 2000; Tanrikul, 2007). Bu tez çalışmasının yapıldığı Doğu Karadeniz Bölgesindeki yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalık işletmelerin kuluçkahanelerinde, karasal havuzlarında, baraj göllerinde, göletlerde ve denizel ortamdaki kafeslerdeki balıklardan bugüne kadar değişik cinslere ait bakteriyel balık patojenlerine ait tür düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Küresel ısınmaya bağlı olarak mevsimsel olarak meydana gelen ani su sıcaklığı değişimlerinin bölgemizdeki işletmelerde üretimi yapılan alabalıklarda strese neden olduğu ve balıkların immun sistemi üzerine baskı yaparak hastalıkların ortaya çıktığı bildirilmiştir (Dengiz Balta, 2010; Dengiz Balta vd. 2017). Balıklarda immun sistemi baskılayan değişik stres faktörleri nedeni ile oluşan biyokimyasal değişimler nedeniyle zaman zaman balıklarda bakteriyel hastalık etkenleri sebebiyle toplu ölümlerin vuku bulduğu ve oldukça büyük ekonomik zararların oluşabildiği tespit edilmiştir. Kültür balıkçılığında sürdürülebilir bir üretim için balık stoklama miktarına dikkat edilmesi gerektiği, su kalitesinde oluşabilecek olumsuzlukların giderilmesi, balıklarda hastalık oluşturacak patojenlerin erken teşhis edilmesi, antibiyogram testlerinin yapılarak ucuz ve etkili kemoterapotinin erken uygulanması tedavi şansını artıracak ve ekonomik kayıpların önemli ölçüde azaltacağı farklı çalışmalarda belirtilmiştir (Balta vd., 2016; 2017; 2019'a; 2019b; Balta vd., 2016; Balta, 2016; 2020).

1. GENEL BİLGİLER

Akuatik ortamda yaşayan canlıların hayat döngülerini düzün bir şekilde sürdürmeleri balık, çevre ve patojen olabilecek etkenlere bağlıdır. Akua kültürde oluşabilecek kimyasal maddelere bağlı toksinlere bağlı zehirlenmeler olabileceği gibi suda yaşayan canlıların (özellikle alglerin) aşırı çoğalmalarına bağlı olarak meydana gelen kimyasal toksinler veya ötrifikasyona bağlı olumsuzluklar nedeni ile de toplu ölümlerin zaman zaman ortaya çıktığı görülebilmektedir. Balıkların yemlerinde bulunması gerekli olan maddelerin rasyonun hazırlanması esnasında yanlış hesaplanması veya eksik ilave edilmeside balıklarda bazı gelişme bozuklukların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Akarsu havzalarındaki su ürünleri üretiminin yoğun bir şekilde yapıldığı işletmelerde genellikle en önemli kayıplarının balıklarda hastalık oluşturan patojen hastalık etkeni olan organizmalar tarafından meydana geldiği ve toplu ölümler yüzünden önemli ekonomik kayıpların ortaya çıktığı bildirilmiştir (Roberts vd., 2001).

Balık hastalıklarının seyri, çevresel faktörlere, patojen olan etkenin hastalık yapabilme kudretine, balığın bünyesine ve beslenme durumu gibi bir dizi karmaşık biyokimyasal olayların etkilendiği bir süreç olup özellikle bulaşıcı hastalık etkenleri su ürünleri üretiminde önemli ölçüde sınırlayıcı bir etkiye meydana getirdiği bildirilmiştir (Guijarro vd., 2015).

Balık hastalıklar, hastalıkları meydana getiren patojen olan mikroorganizmaların etiyolojilerine göre sınıflandırılmıştır. Akraba mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen birçok hastalık etkeni birbirine yakın özellikler taşımakta olup, bu mikroorganizmalar arasındaki farklılıkların doğru bir şekilde tanımlanması ile hastalığın tedavisinin paralellik gösterdiği bildirilmiştir. Hastalık oluşturan patojenik organizmalar orjinlerine göre parazitik, bakteriyel, viral ve fungal etkenler olarak sınıflandırıldığı rapor edilmiştir (Roberts vd., 2001).

1.1. Literatür Özeti

1.2. Bakteriyel Balık Hastalıkları

Çok küçük canlılar olan bakteriler uygun ortamlarda çok hızlı çoğalma kabiliyetinin yanı sıra hastalık yapabilme gücüne sahip oldukları hastalık vakalarından

çok fazla rastlanılan ve izole edilen mikroorganizmalardır. Bazı bakteri türleri yoğurtun ve ekmeyin (hamurun) mayalanmasında, bağırsak mikroflorasında sindirimi düzenleyici, bazı vitaminlerin üretilmesinde görevli, bazıları da patojen mikroorganizmaların üremesini durduran ve/veya öldüren antibiyotiklerin üretilmesi gibi geniş bir yelpazede görevli olan insan ve hayvanların sağlıklı yaşamasında fayda sağlamanın yanı sıra bazı bakteri türleri ise insanlarda ve hayvanlarda ciddi hastalıklar meydana getirebilen ölümcül canlılar olduğu rapor edilmiştir (Roberts vd., 2001).

Psikrofilik (soğuk seven) ve bazı mezofilik bakteri türleri özellikle konakçı olarak balıkları tercih etmekte ve balıklardaki hastalık vakalarının oluşmasına sebep oldukları tespit edilmiştir. İnsanlarda ve memeli hayvanlarda yaygın olarak bulunan mezofilik bakteriler bakteri türleri konakçıları öldürme gücüne sahipken, balıklarda ise birkaç tür haricindeki bakterileri ise çevre şartlarındaki stres faktörleri ile birlikte virülens kazandıkları takdirde balıklarda hastalık oluşturarak ciddi ekonomik kayıplara neden olarak sürdürülebilir su ürünleri üretimini kısıtlamaktadırlar. Balıklarda hastalık oluşturan bakterileri laboratuvar ortamında teşhisi için enfekte olmuş balıkların solungaçlarındaki ve deri üzerindeki ülserlerden, dalak ve böbrek gibi iç organlarından uygun katı ve sıvı besi yerleri kullanılarak bakterilerin üretilmesi ve üreyen mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması gerektiği bildirilmiştir. Laboratuvar ortamında üreyen bakteriler boyama metotları kullanılarak boyanabileceği ve böylece ışık mikroskobu altında daha kolaylıkla incelenebileceği bildirilmiştir (Roberts vd., 2001).

Ülkemizde kültürü yapılan önemli bir tür olan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) iç su balıkları üretiminin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Akuakültür üretiminin sürdürülebilirliğini kısıtlayan en önemli sorunların başında hastalık etkenlerinden özellikle bakteriyel hastalık etkenleri gelmektedir. Balıklarda hastalık vakalarından izole edilen bakteriyel hastalık etkenlerin çoğunluğu aerobik Gr (-) basiller oluşturmaktadır. Akuakültürde tatlı su ve deniz balıklarında kitlesel ölümlere neden olan bakteriyel balık hastalıkları önemli ekonomik kayıplar oluşturmaktadır. Balıklarda birkaç bakteri türü hariç hastalık yapan bakterilerin çoğu fırsatçı patojenler tarafından uygun olmayan akuatik çevre şartlarındaki stres faktörleri (ani sıcaklık değişimi, organik ve kimyasal kirlenme, vs) gibi yüzünden meydana getirmektedir (Austin ve Austin, 1999; 2007; Buller, 2004). Hastalık vakalarındaki

balık ölümlerinin nedeni enfekte balıkların dokulardan mikroorganizmanın saf kültürler halinde izolasyonu ve izole edilen bu izolatların identifikasyonu ile yapıldığı rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 1999; 2007). Ayrıca, bu fırsatçı bakteri patojenlerinin suyun normal mikrobiyal fauna ve florasında, deniz ve tatlı su balıklarının bağırsak floralarında, deri ve solungaç yüzeylerinde normal olarak bulunabilen predominant hastalık etkenleri olduğu çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir (Austin ve Austin, 2007; Austin ve AlZahrani, 2006; Kılıç vd., 2007). Bu fırsatçı patojen etkenler, Gram negatif, hareketli, katalaz ve oksidaz testlerinde pozitif, O/F glukoz testinde oksidatif reaksiyon veren bakteriler olduğu tespit edilmiştir (Austin ve Al-Zahrani, 2006; Kılıç vd., 2007). Balıklarda görülen *Pseudomonas* enfeksiyonlarının başlıca etkeni olarak önceleri *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. fluorescens* ve *P. chloropsis* rapor edilirken (Austin ve Austin, 1999; Frerichs ve Roberts, 1989), son yıllarda yapılan araştırmalarda farklı balık türlerinden ve diğer su canlılarından *P. pseudomallei*, *P. putrefaciens*, *P. stutzeri*, *P. putida* ve *P. pseudoalcaligenes* türlerinin izole edildiği de rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 2007; Buller, 2004). Ülkemizdeki kültürü yapılan alabalıklardan bugüne kadar yapılan çalışmalarda çeşitli araştırmacılar tarafından *Pseudomonas* cinsi bakterilerden *Pseudomonas* sp. (Kılıç vd., 2007; Mefut vd., 2007; Aydın, vd., 2005). *P. fluorescens* (Akaylı ve Timur, 2004, Özer vd., 2008), *P. putida* (Altınok vd., 2006; Özer vd., 2008; Kayış vd., 2009), *P. luteola* (Altınok vd., 2007; Kayış vd., 2009), *P. aeruginosa* ve *P. oruzihabitans* (Özer vd., 2008) izole edildiği rapor edilmiştir. Gökkuşaağı alabalığı kültür balıkçılığında motil *Aeromonas* enfeksiyonlarına sıklıkla karşılaşılmaktadır. Motil *Aeromonas* enfeksiyonları balıkların yoğun stoklamasına ve suyun organik yükündeki artışa bağlı olarak %98'e varan ölüm nedeni ile büyük ekonomik kayıplara neden olduğu ve tatlı su balıklarında hemorajik sepsis ile seyreden enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Munro, 1982; Diker, 1999). Balıklarda enfeksiyona neden olan fırsatçı patojenlerin organik atıklarla kirlenmiş sularda bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *Aeromonas* cinsine ait bu fırsatçı patojenlerin tuzlu sularda dahil her türlü su kaynaklarında bulunduğu bildirilmektedir (Mascher, 1990; Diler ve Altun, 1994). Japonya'da 1974 yılında sarıkuyruk balıklarında *Lactococcus garvieae* epizootiklerinin yüksek miktarda ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1999; Kusuda vd., 1991; Kusuda ve Salati, 1999). Dünyanın değişik coğrafik

bölgelerindeki tatlı su balıklarında ve deniz balık türlerinde *Lactococcus garvieae* (=Synonim *Enterococcus seriolicida*)'nın hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1999; Chen, vd., 2001; Eldar ve Ghittino, 1999; Kusuda vd., 1991; Muzquiz vd., 1999, Schmidt vd., 2001). İspanya, İtalya, Portekiz, İngiltere, Fransa, Avustralya, Güney Afrika ve Asya ülkelerindeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinde kok hastalığının etkeni olan *L. garvieae*'nin enfeksiyonu meydana getirmiş olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Carson vd., 1993; Chang vd., 2002; Eldar ve Ghittino, 1999; Eldar vd., 1999; Ravelo vd., 2001). Ayrıca, kok hastalık etkenin zoonos (insana bulaşabildiği) olduğu ve insanlardaki hastalık vakalarından izole edildiği de bildirilmiştir (Mofredj vd., 2000; James vd., 2000; Vela vd., 2000, Yiu vd., 2007; Zlotkin vd., 1998). Önceden *Streptococcus garvieae* olarak tanımlanan *L. garvieae*, orjinelinde İngilteredeki mastitisli ineklerin meme enfeksiyonlarından ilk kez izole edilmiştir (Collins vd., 1983). *L. garvieae* ile enfekte çiğ balık eti tüketilmesiyle insanlarda sporadik vakalara rastlandığı bildirilmiştir (Wang vd., 2007). Ülkemizin Ege bölgesindeki gökkuşağı alabalık işletmelerinde 2001 yılında Streptococcosis enfeksiyonları ortaya çıkarak yüksek mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Altun vd., 2004; Çağırğan ve Tanrıkul, 1997; Diler vd., 2002). Ülkemizde gökkuşağı alabalık işletmelerinde son yıllarda ortaya çıkan *L. garvieae*'nin etkeni olduğu streptococcosis enfeksiyonları hızlı bir yayılım göstermekte, toplu ölümler oluşmakta ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ülkemizde bu güne kadar; Kubilay ve ark., (Kubilay v., 2005)'ı *Lactococcus garvieae* suşlarında antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi, Türe, (Türe, 2012) PFGE metodu kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin genetik çeşitliliğinin ve yayılımının belirlenmesi, Öztürk ve ark, (Öztürk vd., 2013) Türkiye'nin orta Karadeniz bölgesindeki gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)'nda laktokokkozis ve *Lactococcus garvieae* etkeninin antimikrobiyal duyarlılığı, Çağırğan (Çağırğan, 2004) Türkiye'den izole edilen *Lactococcus garvieae*'ların biyotiplendirilmesi, Konya Bölgesindeki gökkuşağı alabalığı (*Onchyrnus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi, patojen mikroorganizmaların tespiti ve antibiyotik duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi (Akşit ve Kum, 2008) gibi araştırmalar yapıldığı bildirilmiştir. Hastalık etkenlerinin antibiyotiklere karşı hızlı bir

şekilde direnç kazanması ve tedavide başarısızlıklara neden olması nedeni ile yeni bilimsel çalışmaların yapılmasını zorunlu hale getirmektedir.

Gökkuşığı alabalığı farklı boydaki balıklarda stres faktörlerine bağlı olarak meydana gelen hastalık vakalarında toplu ölümler yüzünden büyük ekonomik kayıplara neden olan Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinden biri olan *Y. ruckeri* tarafından meydana getirildiği bildirilmiş ve antibiyogram test sonuçlarına göre farklı antibiyotikler farklı düzeylerde direnç şekillendiği rapor edilmiştir (Cagırgan & Tanrikul, 1998; Balta vd., 2010; 2016). Kültür balıkçılığında, hastalıkların tedavisinde gelişmiş güzel antibiyotik kullanımı bazı problemleri beraberinde getirmektedir. Antibiyotikler, uygun süre ve dozda kullanılmadığı takdirde bakterilerde bu antibiyotiklere karşı geçici (biyokimyasal) ve kalıcı (genetik) direnç şekillenebilmektedir. Bu durum ise daha sonraki hastalık vakalarında meydana gelen aynı enfeksiyonun sağlıtımında başarısızlığa ve antibiyotik kalıntısı gibi problemlere neden olduğu rapor edilmiştir (Cagırgan & Tanrikul, 1998; Balta, 1999; Balta & Çağırğan, 2007; Balta & Çağırğan, 2010; Balta, 2016; Balta & Dengiz Balta, 2019; Onuk vd., 2015; 2017; Duman vd., 2017; Dinçtürk & Tanrikul, 2021). Bakteriyel hastalıkların tedavisinde antibiyogram testi yapıldıktan sonra kemoterapotik maddelerin kullanımı önerilmelidir. Hastalık vakalarında balıkların erken muayene edilmesi ve hastalık etkeninin erken teşhis edilmesi, uygun tedavi yapılması için antibiyogram testin yapılması başarı şansını artıracaktır. Tedavi için gerekli önlemler alınmaz ise uygun kemoterapotikler kullanılmazsa büyük ekonomik kayıpların ortaya çıkması kaçınılmaz olacaktır. Balıklarda hastalık oluşturmaları yanı sıra toprakta, doğal su kaynaklarında, kontamine et, süt ve market balıkları gibi gıdalarda bulunması nedeniyle bu ürünlerin insanlarda tarafından tüketilmesi ile özellikle direnç genlerinin insan patojenlerine plazmit aracılığıyla aktarılmasına ve özellikle fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa*'nın hasta insanlarda kemik, göz, kulak, kistik fibroza ve deri enfeksiyonlarına neden olması nedeniyle oldukça önemli bir patojendir.

Ülkemizde 1970'li yıllarda gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), karasal tabanlı işletmelerde üretilirken, 1990'lı yıllardan sonra özellikle Karadeniz'de ve baraj göllerinde yüzer ağ kafeslerde yetiştirilen bir balık türüdür. Ülkemizde kültürü yapılan gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) hastalık meydana getiren önemli balık patojenleri arasında *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Citrobacter*,

Vibrio, *Flavobacterium* ve *Lactococcus* cinslerine ait bakteriyel etkenler çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Balta vd., 2016; Balta ve Dengiz Balta, 2017; Duman vd., 2017). Hastalıkların tedavisi amacı ile gelişmiş güzel antibiyotik kullanımı antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi sonucu üreticilerin ciddi ekonomik kayıplara maruz kaldığı, alabalığın doğal bağırsak florasında bulunup antibiyotik kullanımı ile dirençli hale gelen *Staphylococcus aureus* ve *Lactococcus garvieae* gibi bakterilerin oluşturdukları enterotoksinler ile insanlarda önemli zoonoz hastalık problemlerine neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, balık bağırsak mikroflorasında bulunan bakterilerin böbrekler ve dalak gibi organlara ve oradan da kas dokusuna geçerek enzimatik etkiler ile et kalitesini bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir. Gökkuşuğu balığının sürdürülebilir üretimini sınırlayan en önemli sorunlar; su kalite kriterleri ve patojenik hastalık etkenlerin olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda, su kalitesindeki olumsuz değişimlere bağlı olarak bakteriyel hastalık riski genellikle rapor edilmiştir (Austin ve Austin, 2012; Timur ve Timur, 2003). Kültür deniz balıklarında bakterilerin sebep olduğu balık patojenlerinden birinin *Vibrio* cinsine ait *Vibrio anguillarum* olduğu bildirilmiştir. Yılan balıklarındaki bir epizootiden ilk kez hastalık etkeni olarak izole edilen etken *Bacterium anguillarum* olarak tanımlanmıştır. Baltık denizindeki hastalıklı yılan balıklarından izole edilen etken *Vibrio anguillarum* olarak isimlendirilmiştir (Austin ve Austin, 1987). Araştırmacılar, *V. anguillarum*'un taksonomisi, klasifikasyonu ve karakterizasyonu üzerine birçok çalışma yapmış, *Vibrio* türlerinin ilgili bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerini belirlemek için 5S rRNA gen sekanslarının kullanımı ile *Vibrio* cinsinin *Listonella* cinsine transfer edilmesi gerektiği, *Vibrio anguillarum* isminin *Listonella anguillarum* olarak kullanılması gerektiği önerilmiştir (MacDonell ve Colwell, 1985). *V. anguillarum* (*Listonella anguillarum*) Vibrionaceae familyası, Proteobacteria grubu, Gamma altbölümü altında sınıflandırılan bir bakteri olarak kabul edilmiş ve *Listonella anguillarum* isminin araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaması nedeniyle günümüzde hala *Vibrio anguillarum* olarak yaygın bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1999). *Vibrio* izolatlarını isimlendirmede serotiplendirme tür ayrımı için en güvenilir alternatif araçlardan biri olduğu bildirilmektedir. Deniz suyundan ve hastalıklı balıklardan izole edilen *V. anguillarum*'a ait toplam 23 O-serotipi olduğu bildirilmiştir (Grisez ve Oliever, 1995;

Kitao vd., 1983; Pedersen vd., 1999; Sørensen & Larsen, 1986). Dünyada O1, O2 ve O3 serotiplerin balıklarda ölümlerden sorumlu olduğu, fakat O1 ve O2'nin ise en virulent serotipler olduğu rapor edilmiştir (Pedersen vd., 1999). Levrek balıklarında serotip O1, alabalıklarda ise Serotip O1 ve O2'nin ölümlerden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Toranzo ve Barja, 1990; Toranzo vd., 1997). Ülkemizde, hastalıklı gökkuşağı alabalığından izole edilen *V. anguillarum* suşlarının serotip O1 olduğu bildirilmiştir (Tanrikul, 2007; Tanrikul & Gultepe, 2011).

Balıklarda hastalık oluşturan kok enfeksiyonlarını *Lactococcus* cinsine ait 7 türünün mevcut olduğu Tablo 2'de verilmiştir. Bu türler arasında balıklarda Laktokokkozis hastalık etkeni olarak tanımlanan tek türün *Lactococcus garvieae* olduğu bildirilmiştir (Cai vd., 2011). Genetik çalışmalar sonucunda elde edilen ve gen banka yüklenmiş *Lactococcus garvieae* genomik verilerinin analiz edildiği bir çalışmada ortalama nükleotid kimlik değerlerinin sonuçlarına göre dört farklı grubun veya alt grubun olduğu rapor edilmiştir (Kumru, 2021). Son araştırmalar tabloda mevcut olmayan *Lactococcus petauri*'nin de balıklarda hastalık yaptığı farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Altınok vd., 2022; Satıcıoğlu vd., 2023).

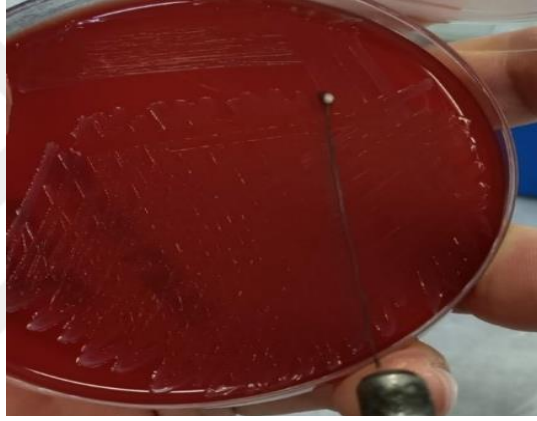
Tablo 5. Kok hastalık etkenlerinin taksonomik olarak sınıflandırılması (URL-3)

Alem : Bacteria	
Alt Alem: Posibacteria	
Şube : Firmicutes	
Sınıf : Bacilli	
Takım : Lactobacillales	
Aile : Streptococcaceae	
Genus : Lactococcus	
Tür: <i>Lactococcus chungangensis</i>	
Tür: <i>Lactococcus fujiensis</i>	
Tür: <i>Lactococcus garvieae</i>	
	Alt Tür: <i>Lactococcus lactis cremoris</i>
	Alt Tür: <i>Lactococcus lactis hordniae</i>
Tür: <i>Lactococcus lactis</i>	Alt Tür: <i>Lactococcus lactis lactis</i>
	Alt Tür: <i>Lactococcus lactis tractae</i>
Tür: <i>Lactococcus piscium</i>	
Tür: <i>Lactococcus plantarum</i>	
Tür: <i>Lactococcus raffinolactis</i>	

Türkiye'de ilk defa Ege Bölgesindeki bir gökkuşağı alabalığı işletmesinde 2001 yılında hastalık vakasından *Lactococcus garvieae*'nin varlığı rapor edilmiştir (Diler vd., 2002). Hastalık özellikle su sıcaklığının 18-24°C'ye ulaştığı yaz aylarında %60-80'ler düzeyinde ölümler meydana getirdiği ve önemli ekonomik kayıplara

neden olduğu rapor edilmiştir (Balta vd., 2019; Eldar vd., 1999; Diler vd., 2002,). Ayrıca, son araştırmalar kok hastalığı etkeni olarak *Lactococcus petauri*'de farklı araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Altınak vd., 2022; Satıcıoğlu vd., 2023)

Yapılan çalışmalarda hastalıklı balıkların yem almadıkları, sersem bir şekilde su yüzeyinde durdukları, yüzmeye anormallik, gözün korneasında konjesyon, solungaç lamellerinde kanama, yüzgeçlerin tabanında, burun etrafında, gözün çevresinde ve çene altında noktasal kanamalar, dalak, böbrek, ve karaciğer üzerinde nokta vari kanamalar, dalağın büyümüş olduğu, hava kesesinin şişkin ve yangılı olduğu, bağırsağın sulu ve sarımsı bir dışkı ile gergin olduğu bildirilmiştir (Balta vd., 2019; Durmaz vd, 2015).



Şekil 3. Kanlı agarda kok hastalık etkeni *Lactococcus* spp.'nin görünümü

Ülkemizde kültür balıkçılığı yapılan işletmelerde genellikle gökkuşağı alabalığı üretimi yapılmaktadır. Doğu Karadeniz Bölgesindeki Borçka Baraj Gölündeki farklı zamanlarda çok sayıda gökkuşağı alabalığı çiftliğinde ortaya çıkan hastalık vakalarından fakültemiz hastalık laboratuvarına getirilen örnekler arasından kok hastalık etkeni tespit edilerek bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Kok hastalığının etkeni olduğu düşünülen *Lactococcus* spp. suşları özellikle akarsuyun sıcaklığının arttığı yaz mevsiminde kitlesel ölümlere neden olduğu tespit edilmiştir. Hastalık vakalarından tipik hastalık belirtisi gösteren balıkların böbrek ve dalak gibi iç organlarında mikroskopik olarak görülen bakterileri üretmek için TSA ve TSB'a ekimler yapılmıştır. Ekim yapılan besi yerleri 20°C'deki soğutmalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. TSA besi vasatlarında saf olarak üreyen koloniler %5

koyunı ilaveli kanlı agara ekilmiştir. Kok izolatlarının kanlı agarda hemoliz oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmiştir. Kanlı agardaki saf kültürden biyokimyasal testleri yapılmak üzere api 20 strep test kitlerine geçilmiştir. Api 20 strep test sonuçları bulgular kısmında Tablo 11’de verilmiştir.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Balık Numunelerinin Toplanması

Doğu Karadeniz Bölgesindeki Artvin iline bağlı Borçka baraj gölü üzerinde kurulmuş Kuzuoğlu AŞ. ait 7 farklı gökkuşağı alabalık işletmesinden 2022-2023 yılları arasında bir yıl boyunca her ay örnekleme yapılmıştır. Barajda işletmeye ait farklı noktalarda kurulu çiftlikler tekne yardımı ile gezilere hastalık semptomu gösteren balıklar toplanıp strofor köpüklerde buz ile uygun şartlarda laboratuvara getirilmiştir.

Balık örnekleme yapılırken hastalık vakalarında ölen balıkların ile benzer belirtileri gösteren henüz ölmemiş balıkların toplanıp ve uygun prosedüre göre laboratuvara sevk edilmesine dikkat edilmesine özen gösterilmiştir. Her örnekleme esnasında en az 10'ar adet balık örnekleme için hastalık çıkan havuzlardaki hastalık belirtisi gösteren tercihen halsiz, iştahsız, renkte kararma, gözlerde tek veya çift taraflı ekzofthalmus belirtileri olan ve ölmek üzere olan gökkuşağı alabalıkları seçilerek laboratuvara gönderilmesi gerektiği üreticiye bildirilmiştir. Tez çalışması süresince her ay iki örnekleme gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması süresince 24 kez örnekleme yapılmış ve her seferinde bir işletmeden 3 kafesten 30 adet balık toplam 210 adet hastalıklı balık numunesi kontrol edilmiştir. Her bir kafesten yapılan ekimlerden üreyen bakteri izolatlarına bir numara verilmiştir. Hastalık balıkların muayeneleri sonunda gözlemlenen dış ve iç belirtiler kaydedilmiştir. Tespit edilen hastalık semptomları bulgular kısmında verilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Bakteriyel Patojenlerin İzolasyonu

Fakültemiz Hastalıklar Laboratuvarına getirilen hastalıklı gökkuşağı alabalıkları solungaçlarından ve deriden alınan kazıntı örnekleri ile bağırsak içerikleri ışık mikroskop altında muayene edilmiştir. Tipik hastalık semptomları gösteren balıkların otopsis yapılarak iç organların genel görünümü kaydedilmiştir

Dış bakıda tipik hastalık semptomları gösteren balıkların iç organları cerrahi bir makas ile açılarak alevde steril edilmiş öze yardımı ile böbrek ve dalaktan alınan örnekler lam üzerine yerleştirilmiş bir lop steril fizyolojik tuzlu su (FTS; %85'lik NaCl) ile karıştırılmıştır. Hazırlanan preparat ışık mikroskopunda 40'lık objektif altında bakterilerin varlığı incelenmiştir. Mikroskop sahasında farklı şekillerde hareketli veya hareketsiz bakterilerin varlığı görülmüştür. Her bir preparat fikse edilmek amacıyla üç kez alevden geçilerek lama tespit edilmiştir. Soğutulan preparat Gram boyama prosedürüne uygun bir şekilde boyanmış alan üzerine 1 damla immersiye yağı damlatılarak mikroskopun 100'lük objektifte muayene edilmiştir. İmmersiye objektifle incelenen bakterilerin morfolojik özelliklerine göre bakterilerin mor veya pembe renkte görülenler izolatlar kayıt edilmiştir. Bakteri gözlenen balık örneklerinin böbrek ve dalaklarından uygun besi yerlerine ekim yapılmıştır. Özellikle tipik hastalık semptomu gösteren balıkların böbrek ve dalak gibi organlardan Tryptone Soy Agar (TSA) ve Broth (TSB), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ve Broth (BHIB) gibi genel besi yerlerine alev ile steril edilmiş öze yardımı ile ekim yapılmıştır. Ekilen besi yerleri $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış olan soğutmalı inkübatöre bakterinin üremesi için en fazla 7 gün kadar bekletilmiştir. Besi yerleri her gün üremenin olup olmadığı kontrol edilmiştir. TSA ve BHIA'da üreyen bakteri kolonileri mikroskopta hareketli olup olmadığı incelenmiştir. Işık mikroskopunda hareket muayenesi yapmak üzere hazırlanan preparat muayene sonrası havada kurutulmuştur. Gram boyama yapmak için alevden geçirilerek lama tespit edilmiştir. Boyama işlemi sonrası lam üzerine immersiye yağı dökülerek Gram boyama sonuçları kayıt edilmiştir. TSA'da üreyen saf bakteri kolonilerinden alınan örnekler ile %3 H_2O_2 dökülü lam üzerinde katalaz testi ve ayrıca dökülmüş süzme kağıtında oksidaz testi yapılmıştır. Saf olarak Triptik Soy Broth ve Agarada üreyen bakteriler saflaştırıldıktan sonra %20 gliserol içeren ependorf tüplere aktarılıp homojenize edilerek daha sonra çalışılmak üzere -80°C 'deki derin dondurucuda stoklanmıştır. Yapılan bu kontroller sonucunda bakteri izolatlarının her biri için ayrı kod verilerek stoklanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda toplam 44 adet izolat bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan izolatlara ait bilgiler; örnekleme yapıldığı baraj (şehir), örnekleme tarihi, ekim yapılan organ ve bakteri izolatlarına ait verilen kod numaraları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Gökkuşığı alabalıklarından izole edilen bakterilerin kökenlerine ait bilgiler

No	İzolat kodu	Kafes No	Organ	Çiftlik Konumu	Tarihi
1	KO01	SDK2	Böbrek	Artvin / Borçka	26.06.2022
2	KO02	CK13	Böbrek	Artvin / Borçka	26.06.2022
3	KO03	LBK2	Böbrek	Artvin / Borçka	26.06.2022
4	KO04	YAK9	Böbrek	Artvin / Borçka	04.07.2022
5	KO05	EK5	Böbrek	Artvin / Borçka	26.07.2022
6	KO06	DK2	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
7	KO07	EK4	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
8	KO08	EK1	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
9	KO09	EK17	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
10	KO10	HK12	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
11	KO13	GK7	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
12	KO14	BK2	Böbrek	Artvin / Borçka	22.08.2022
13	KO15	LBK5	Böbrek	Artvin / Borçka	13.09.2022
14	KO18	HK2	Böbrek	Artvin / Borçka	13.09.2022
15	KO22	EK18	Böbrek	Artvin / Borçka	13.09.2022
16	KO23	EK12	Böbrek	Artvin / Borçka	13.09.2022
17	KO24	GK8	Böbrek	Artvin / Borçka	31.09.2022
18	KO27	HK9	Böbrek	Artvin / Borçka	03.10.2022
19	KO30	HK3	Böbrek	Artvin / Borçka	03.10.2022
20	KO32	HK2	Böbrek	Artvin / Borçka	03.10.2022
21	KO35	HK3	Böbrek	Artvin / Borçka	12.11.2022
22	KO45	HK3	Böbrek	Artvin / Borçka	12.11.2022
23	KO46	AK3	Böbrek	Artvin / Borçka	12.11.2022
24	KO48	CK15	Böbrek	Artvin / Borçka	13.12.2022
25	KO50	GK3	Böbrek	Artvin / Borçka	13.12.2022
26	KO51	AK3	Böbrek	Artvin / Borçka	13.12.2022
27	KO52	EK5	Böbrek	Artvin / Borçka	08.01.2023
28	KO53	EK12	Böbrek	Artvin / Borçka	08.01.2023
29	KO61	GK8	Böbrek	Artvin / Borçka	16.01.2023
30	KO62	AK3	Böbrek	Artvin / Borçka	16.01.2023
31	KO64	CK17	Böbrek	Artvin / Borçka	08.02.2023
32	KO69	AK3	Böbrek	Artvin / Borçka	08.02.2023
33	KO70	AK9	Böbrek	Artvin / Borçka	08.02.2023
34	KO71	GK2	Böbrek	Artvin / Borçka	14.03.2023
35	KO72	GK3	Böbrek	Artvin / Borçka	14.03.2023
36	KO74	SCK10	Böbrek	Artvin / Borçka	14.03.2023
37	KO80	CK17	Böbrek	Artvin / Borçka	11.04.2024
38	KO81	GK2	Böbrek	Artvin / Borçka	11.04.2024
39	KO82	DK2	Böbrek	Artvin / Borçka	11.04.2024
40	KO83	YAK2	Böbrek	Artvin / Borçka	18.04.2023
41	KO84	YBK2	Böbrek	Artvin / Borçka	18.04.2023
42	KO88	YAK1	Böbrek	Artvin / Borçka	06.05.2023
43	KO89	SDK5	Böbrek	Artvin / Borçka	18.05.2024
44	KO90	SDK12	Böbrek	Artvin / Borçka	18.05.2024

Tipik hastalık belirtileri gösteren gökkuşığı alabalığından TSA’da saf olarak üreyen kolonilerden hareket muayenesi, Gram boyama testi, katalaz ve oksidaz testleri yapılmıştır. Saf kolonilerden alınan bakter izolatları TSB’e ekilerek üretilmiş ve tez çalışmasında kullanılmak üzere %20 gliserol ilave edilmiş 1,5’luk eppendorf tüplere 1 ml hacimde aktarılıp stoklanmıştır. Bakteri ve gliserol vorteks yardımıyla hızlı bir şekilde homojenlik sağlanmıştır. Her bir eppendorf tüp üzerine izolat kodu yazılarak

etiketlenmiş ve bilgisayarda gerekli bilgiler işlenmiştir. Etiketlenen eppendorf tüpleri - 80°C'deki derin dondurucuda stoklanmıştır.

2.2.2. Geleneksel İdentifikasyon Testler

2.2.2.1. Hareket Muayenesi

Gökkuşığı alabalıklarının hastalık vakalarından tipik hastalık semptomları gösteren balıkların böbreklerinden TSA besi yerlerindeki 24 saatlik kültürlerinde 20°C'de soğutmalı etüvde saf olarak izole edilmiştir. Bu bakterilerin hareketli olup olmadığı kontrol etmek için %0,85'lik FTS'den %70'lik alkolle temizlenmiş lama bir öze yardımı ile bir lup ilave edilmiştir. Steril bir öze ile TSA'da saf olarak üremiş kolonilerin birinden bakteri örneği alınıp lamdaki fizyolojik tuzlu su ile hafif bir bulanıklık sağlanmıştır. Hazırlanan preperat ışık mikroskobu sehpasına yerleştirilip yeri belirlemek için 4'lük ve 10'luk objektifler kullandıktan sonra 40'luk objektif yardımı ile alan büyütülerek bakterilerin hareketli olup olmadığına bakılmıştır. Ayrıca, şüpheli durumlarda soğutmalı etüvde TSB besi yerine ekilen bakteri örnekleri temiz lam üzerinde saatlik olarak steril öze direkt bir lup alınarak 40'luk objektifte kontrol edilerek bakteri izolatlarının hareketli olup olmadığı tespit edilmiştir.

2.2.2.2. Katalaz Testi

Katalaz testi mikroorganizmaların katalaz enzimine sahip olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır. Besi yerinde saf olarak çoğaltılan bakteri kolonilerden pasteur cam pipeti yardımı ile alınan bakteri örneği %70'lik alkolle temizlenmiş bir lama damlatılan %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile karıştırılarak süspanse edilmiştir. Karıştırma esnasında oksijen gazının serbest kalması nedeni ile oluşan kabarcıkların ortaya çıkması bakteri örneklerinin katalaz enzimine sahip olduğunu göstermiştir. Bu testin sonucunda gaz kabarcıkları oluşturanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Gaz kabarcığı oluşturmeyen bakteri izolatlarının katalaz test sonuçları ise negatif olarak kayıt edilmiştir. Bu çalışmada bakterilere yapılan katalaz test örneklerin test sonuçları bulgura bölümünde Tablo 5'de verilmiştir.

2.2.2.3. Oksidaz Testi

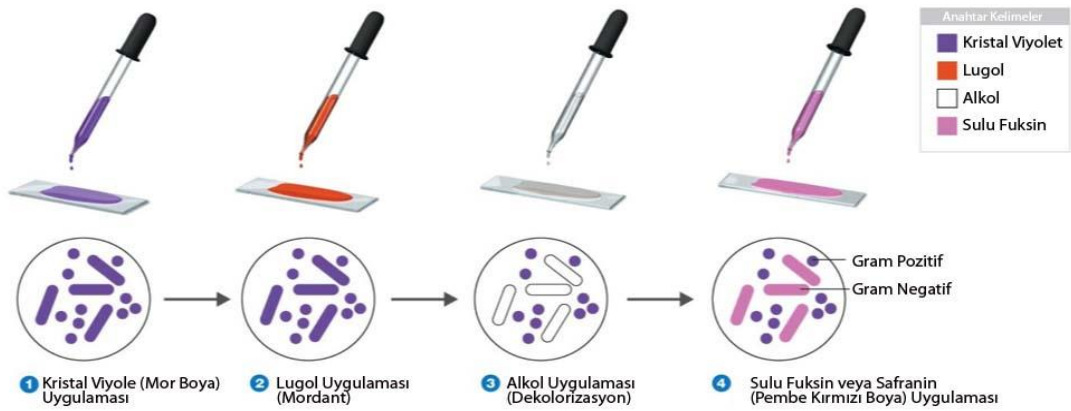
Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan oksidaz testi önemli bir kriterdir. Bakterilerin bazıları tarafından sentezlenebilen sitokrom oksidaz enziminin aktivitesinin varlığını belirlemek için kullanılan bir testtir. Bakteri izolatlarına ait örneklerin TSA'daki 12 saatlik taze ve saf kolonilerden steril pasteur cam pipeti yardımı ile alınmıştır. Oksidaz ayracı damlatılmış kurutma kağıdına pasteur cam pipeti sürülerek mor rengin ilk 5-10 saniye içinde meydana gelip gelmediği gözlemlenmiştir. Süre sonunda oluşan koyu mavi renk pozitif, test sonucunda geç oluşan mavi renk veya renk oluşturmeyen izolatlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan bakteri izolatlarının oksidaz enzimine sahip olup olmasına ait test sonuçları bulgular kısmındaki Tablo 5'e kayıt edilmiştir.

2.2.2.4. Gram Boyama

Bakteriler hücre duvarının anatomik yapısındaki lipidlerin yapılarına göre gram boyama sonunda mor veya pembe renklere boya almaktadırlar. TSA'da üremiz 24 saatlik kültürlerden Gram boyama işlemi sonunda bakterilerin iki gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Boyama sonunda mikroskopun immersiyon objektifi kullanılarak (X100) yapılan muayenede mavi-mor renge olarak görülen bakterilerin Gram pozitif, boyama işlemi sonunda mikroskopik bakıda kırmızı-pembe renge boyanmış olarak görünen bakteriler ise Gram negatif bakteriler olduğu kayıt edilmiştir.

Çalışmada kullanılan soğutmalı etüvde TSA'da 12-24 saatte üretilmiş bakteri izolatların saf kolonilerin birinden steril öze yardımı ile alınmıştır. Alınan bu örnekler önceden %70'lik alkol ile temizlenmiş bir lama üzerine ilave edilmiş %0,85'lik bir lup fizyolojik tuzlu su hafif bir bulanıklık oluşturulmak üzere karıştırılmıştır. Hazırlanan preparat oda sıcaklığında veya 37°C'deki etüvde bekletilerek kurutulmuştur. Sonra kurutulmuş preparatlar tüp alevinden üç kez geçirilerek fiziksel fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Alevde tespit edilen preparatlar soğuması için bekletildikten sonra ilk önce kristal viyole solüsyonu damlatılarak bir dakika bekletilmiştir. Preparat saf suyla geçirilmiştir. İyot çözeltisi preparat üzerine dökülerek ile kaplanmış ve bir dakika sonra saf su ile durulanmıştır. Dekolorizasyon işlemi için %96'lık etil alkol ile preparat üzerine dökülerek 10-15 saniye beklenmiş ve tekrar nazıkçe saf sudan geçirilmiştir. En sonunda preparat safarin veya sulu fuksin solüsyonu ile 1 dakika

süresince boyanmıştır. Boya saf sudan geçirilerek uzaklaştırılmıştır. Preparatlar oda veya 37°C'deki etüvde kurulduktan sonra preparattaki boyanmış alan üzerine bir iki damla immersiyon yağı damlattırılarak ışık mikroskobunun 100'lük objektifinde incelenmiştir. Boyama sonrası ışık mikroskobundaki boyalı alandaki bakterilerin şekillerine ve renklerine ait bilgiler katıt edilmiş ve bulgular bölümündeki Tablo 5'de verilmiştir.



Şekil 4. Bakteri izolatlarının Gram boyama işlemine ait basamakları (Anonim) (URL-4).

2.2.3. İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testler

2.2.3.1. Triple Sugar İron Agar

Hastalıklı gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bakteriler tanımlanmasında kullanılacak biyokimyasal testlerden üçlü şeker testi triple sugar iron agar (TSI, Merck) yapılmıştır. TSI agar besiyerinin üzerinde bildirilen prosedüre göre hassas terazide gerekli miktarda tartılan besiyeri 100 ml saf su içinde kaynatılarak eritilen besiyeri 50°C'ye kadar ısıtılan besiyerinin pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'e ayarlanmıştır. Besiyeri burgu kapaklı cam tüplere 10 ml olacak şekilde cam pipet yardımı ile ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan steril edilen TSI agar tüpleri yarı yatırılarak dip ve yüzey kısmı eşit olacak şekilde bir eğim verilerek donması sağlanmıştır. Bu besiyerlerinin üzerine tarih yazılarak +4°C'deki buzdolabında 1 ay kadar tez çalışmasında kullanmak için stoklanmıştır.

Triple sugar iron agar	6,5 gr
Saf su	100 ml
pH	7.4 $\pm$ 0,2

2.2.3.2. Eskülin Agar

İzole edilen bakteriler tanımlanmasında kullanılmak için eskulin agar (Biolab) kutusunun üzerinde bildirilen prosedüre göre hassas terazide tartılan eskülin agar besi ortamından gerekli miktarda tartılarak 100 ml saf su içine ilave edilmiştir. pH'yı ayarlamak için kaynatılarak eritilen ve 50°C'e ısıtılan besi yerinin pH'sı 7,2 $\pm$ 0,2'e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. Besi yeri soğutulmadan hızlıca 5 ml olacak şekilde steril cam pipet yardımı ile burgu kapaklı cam tüplere ilave edilmiştir. Bu besi yerleri trans marka otoklav yardımı ile bir atmosfer basınçta 121°C'de 20 dakikalık bir zaman zarfında sterilasyonu gerçekleştirilmiştir. Besi yerleri otoklavdan çıkartıldıktan sonra yarı yatık bir şekilde dondurulmuştur. Katılaştıktan sonra eskulin agarlar gerekli bilgileri üzerine yazılmış ve buzdolabında (+4°C) tez çalışmasında kullanılmak üzere bir ay kadar saklanmıştır.

Eskülin agar	3,5 gr
Distile su	100 ml
pH	7,2 $\pm$ 0,2

2.2.3.3. Simmon Sitrat Agar

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan simon sitrat agar (Himedia) kutusunun üzerinde bildirilen prosedüre göre hassas terazide tartılan gerekli miktar 100 ml'e saf suya ilave edilerek kaynatılmıştır. Hazırlanan besi yeri 50°C'e kadar ısıtıldıktan sonra pH 7,4 $\pm$ 0,2'e ayarlanıp soğumadan hemen cam pipet yardımıyla burgu kapaklı tüplere 10 ml miktarında ilave edildikten sonra trans marka otoklavda 121°C'de, bir atmosfer basınçta ve su buharı yardımıyla 20 dakikalık bir zaman zarfında sterilasyonu sağlanmıştır. Besi yerleri otoklavdan çıkarılıp yarı yatık bir şekilde katılaşması için bırakılmıştır. Bu besi yerleri buzdolabında (+4°C) tez çalışmasında kullanılmak üzere en fazla bir aylık zaman zarfında saklanmıştır.

Simon sitrat agar	2,428 gr
Distile su	100 ml
pH	7,2±0,2

2.2.3.4. MR-VP Medium

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan MR-VP broth (Himedia) kutusunun üzerinde bildirilen prosedüre uygun bir şekilde hassas terazide tartılan gerekli miktarı erlendeki 100 ml'e saf suya ilave edilip çalkalanarak homojen olarak eritilmiştir. Hazırlanan besi yerinin pH 6,9±0,2'e ayarlandıktan hemen sonra cam pipet yardımıyla burgu kapaklı tüplere 10 ml miktarında ilave edilmiştir. Trans marka otoklavda 121°C'de, bir atmosfer basınçta ve su buharı yardımıyla 20 dakika süresince steril edilmiştir. MR-VP besi yerleri üzerine gerekli bilgiler yazıldıktan sonra en fazla bir aylık zaman zarfında tazeli korunması amacıyla +4°C'deki buzdolabında saklanmıştır.

MR-VP medium	1,7 gr
Distile su	100 ml
pH	6,9±0,2

2.2.3.5. Üre Testi

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan üre agar base (Himedia) kutusunun üzerindeki prosedüre göre hassas terazide tartılan gerekli miktarı üre agar base ve 95 ml distile su içinde eritmek için kaynatılmış ve 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra pH 6,8±0,2'e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. Besi yeri 115°C'e ayarlanmış otoklavda 20 dakika sürede sterilasyonu gerçekleştirilmiştir. Erlen mayerdeki besi yeri su sıcaklığı 50°C'e ayarlanmış çalkalamalı benmaride ılıklaştırıldıktan sonra tip iki flow (üfler) kabinin altında %40'lık steril üre çözeltisinden 5 ml ilave edilmesi sağlanmıştır. Elle çalkalanıp homojen olması sağlandıktan sonra besi yeri önceden otoklavda steril edilmiş 20 ml cam pipet yardımıyla 10 ml olacak şekilde tüplere bölünmüştür. Besi yeri yarı yatık olacak şekilde düz masa üzerine dizilerek tüplerin katılaşması sağlanmıştır. Bu besi yerlerinin üzerine gerekli bilgiler yazılmış ve daha sonra tez çalışmasında kullanılmak üzere buzdolabında (+4°C) bir aylık zaman zarfında stoklanmıştır.

Üre agar base	2,5 gr
Distile su	95 ml
pH	6,8±0,2

2.2.3.6. Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan jelatin agar kutusunun üzerindeki prosedüre göre hassas terazide tartılan gerekli miktarda jelatin, beef extract ve pepton 100 ml saf suya katılarak besiyeri kaynatılmıştır. Besi yeri 50°C'e kadar ılıklştırıldıktan sonra pH 7,2±0,2'e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. Hazırlanan jelatin agar 20 ml'lik cam pipet yardımıyla 20 ml'lik burgu kapaklı şişelerin herbirine 10 ml miktarında ilave edilmiştir. Besi yeri trans marta otoklav yardımıyla 121°C'de, bir atmosfer basınçta ve su buharı yardımı ile 20 dakika süre ile steril edilmiştir. Jelatin agar biyokimyasal testler yapılana kadar en fazla +4°C'deki buzdolabında bir ay süre zarfında stoklanmıştır.

Jelatin	12 gr
Beef extract	1 gr
Pepton	1 gr
Distile su	100 ml
pH	7,2±0,2

2.2.3.7. İndol Besiyeri

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan indol besi ortamı kutusunun üzerindeki prosedüre göre hassas terazide tartılan gerekli miktardaki pepton manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen 100 ml saf su ile pepton manyetik bar yardımıyla karıştırılıp homojen bir hale gelmesi sağlanmıştır. Besi yerinin pH'sı 7,2±0,2'e ayarlanmak için Hanna marka pH metre kullanılmıştır. Erlen mayerdeki indol broth 20 ml'lik cam pipet yardımı ile 10 ml'lik burgu kapaklı tüplerin herbirine 5 ml miktarında dağıtılmıştır. İndol brothlar otoklavda 121°C'de, bir atmosfer basınçta ve su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Besi yerleri otoklavdan çıkartılıp oda sıcaklığında soğutulduktan sonra biyokimyasal testlerde tez çalışmasında kullanılmak üzere buzdolabında (+4°C) bir ay gibi bir süer zarfında taze olarak saklanmıştır.

Pepton	1 gr
Distile su	100 ml
pH	7,2±0,2

2.2.3.8. Nitrat Besiyeri

Hassas terazide tartılan beef extract, pepton ve KNO₃ içinde manyetik bar bulunan 250 ml’lik erlen mayer manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Besi yeri manyetik bar ile homojen karıştırılmı sağlanmıştır. Nitrat brothun Hanna marka pH metre ile 7,0±0,2’e ayarlanmıştır. Nitrat broth 20 ml’lik cam pipet yardımıyla 10 ml miktarında burgu kapaklı tüplere aktarılmıştır. Besi yerleri trans marka otoklav ile 121°C’de, bir atmosfer basınçta ve su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Besi yerleri +4°C’deki buzdolabında biyokimyasal testler yapılana kadar bir ay süresince stoklanmıştır.

2.2.3.9. O/F Basal Medium

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan indol besi ortamı kutusunun üzerindeki prosedüre göre hassas terazide tartılan gerekli miktardaki O/F basal medium (Himedia) saf suda ilave edilmiştir. O/F medium ısıtmalı manyetik karıştırıcıda ısı ve bar yardımı ile homojen hale getirilmiştir. O/F medium 50°C soğutulup pH 6,8±0,2’e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. O/F medium trans marka otoklav ile 121°C’de, bir atmosfer basınçta ve su buhar ile 20 dakika süresince steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan ve 50°C’ye kadar soğutulan O/F medium enjektöre takılan 0,22 µm membran filtreden geçirilerek önceden steril edilmiş %10’luk glikozdan üfler kabin altında 10 ml ilave edilmiştir. Erlenindeki O/F medium elle çalkalanıp homojen olması sağlanmıştır. O/F medium soğumadan steril 10 ml’lik tüplerin her birine 5 ml miktarda steril uçlu otomatik pipet ile üfler kabin altında taksim edilmiştir. Kontaminasyon olup olmadığını kontrol etmek için 24 saat süre zarfında üfler kabinde bekletilmiştir. O/F medium besi yerleri biyokimyasal testlerde yapılana kadar bir ay süresince +4°C’deki buzdolabında tutulmuştur.

O/F Basal medium	0,94 gr
Distile su	90 ml
pH	6,8±0,2

2.2.3.10. L-Arjinine

Hassas terazide tartılan decarboxylase broth base (himedia) ve L-arjinine (himedia) içinde manyetik bar bulunan erlen mayerdeki 100 ml saf suya aktarılmıştır. Isıtıcıly manyetik karıştırıcıda karıştırılıp homojen olması sağlanmıştır. Besi yerinin pH'sı $6,0\pm0,2$ 'e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. Besi yerleri 20 ml'lik cam pipet ile 5 ml'lik burgu kapaklı şişelerin herbirine 2 ml miktarında bölünmüştür. Besi yerleri 121°C'deki otoklavda bir atmosfer basınc altında su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Besi yerleri biyokimyasal testlerde yapıłana kadar taze kalması için +4°C'deki buzdolabında bir ay süresince bekletilmiştir.

Decarboxylase broth base	1,05 gr
L-Arjinine	1 gr
Distile su	100 ml
pH	$6,8\pm0,2$

2.2.3.11. L-Lysine Hydroclorid Testi

Hassas terazide tartılan decarboxylase broth base (himedia) ve L-Lysine hydrochloride (Himedia) içinde manyetik bar bulunan erlen mayerdeki 100 ml saf su içine aktarılmıştır. Isıtıcıly manyetik karıştırıcı yardımıyla ile karıştırılıp homojen olması sağlanmıştır. Besi yerinin pH'sı $6,0\pm0,2$ 'e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. Besi yerleri 20 ml'lik cam pipet ile 5 ml'lik burgu kapaklı şişelerin herbirine 2 ml miktarında bölünmüştür. Besi yerleri 121°C'deki otoklavda bir atmosfer basınc altında su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Besi yerleri biyokimyasal testlerde yapıłana kadar taze kalması için +4°C'deki buzdolabında bir ay süresince bekletilmiştir.

Decarboxylase broth base	1,05 gr
L-Lysine hydrochloride	1 gr
Distile su	100 ml
pH	$6,8\pm0,2$

2.2.3.12. L-Ornithine Monohydroclorid Testi

Hassas terazide tartılan decarboxylase broth base (himedia) ve L-Lysine hydrochloride (Himedia) erlendeki 100 ml saf su içine dökülmüştür. Isıtıcıly manyetik

karıştırıcıda manyetik bar yardımı ile karıştırılarak homojen olması sağlanmıştır. Besi yerinin pH'sı $6,0\pm 0,2$ 'e Hanna marka pH metre ile ayarlanmıştır. Besi yerleri 5 ml'lik otomatik pipet ile 5 ml'lik burgu kapaklı şişelerin herbirine 2,5 ml ölçülerek dağıtılmıştır. Besi yerleri 121°C 'deki otoklavda bir atmosfer basınc altında su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Besi yerleri biyokimyasal testlerde yapılana kadar taze kalması için $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabında bir ay süresince bekletilmiştir.

Decarboxylase broth base	1,05 gr
L-Ornithine monohydrochloride	1 gr
Distile su	100 ml
pH	$6,8\pm 0,2$

2.2.3.13. %0 Tuzda Üreme Testi

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan tuza duyarlılık testleri için tuz içermeyen peptunlu besi yerine tuz eklenmemiştir. Bu amaçla hazırlanan besi yerine sadece saf suya pepton ilave edilmiş ve karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Besi yerinin pH'sı $7,2\pm 0,2$ 'e Hanna marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır. Daha sonra 5 ml'lik otomatik pipet ile tüplerin herbirine 2 ml miktarda dağıtılmıştır. Bu besi yerleri 121°C sıcaklıktaki otoklavda 1 atmosfer basınc altında su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Tuz içermeyen bu besi yeri biyokimyasal testler yapılana kadar en fazla bir aylık bir süre zarfında $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabında saklanmıştır.

Pepton	1 gr
Deistile su	100ml
pH	$7,2\pm 0,2$

2.2.3.14. %1 Tuzda Üreme Testi

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan tuz dayanıklılık testleri için peptunlu besi yerine farklı konsantrasyonlarda tuz eklenmiştir. Bu amaçla 1 gr tuz (NaCl) ve 1 gr pepton hassas terazide tartılıp 100 ml suya ilave edilmiş ve karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Besi yerinin pH'sı $7,2\pm 0,2$ 'e Hanna marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır. Daha sonra 5 ml'lik otomatik pipet ile tüplerin herbirine 2 ml miktarda dağıtılmıştır. Bu besi yerleri 121°C sıcaklıktaki otoklavda 1 atmosfer basınc altında su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Tuz testleri yapılana

kadar bu besi yeri en fazla bir aylık bir süre zarfında +4°C'deki buzdolabında saklanmıştır.

NaCl	1 gr
Pepton	1 gr
Distile su	100 ml
pH	7,2±0,2

2.2.3.15. %6'lık Tuzda Üreme Testi

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılacak olan %6'lık tuz dayanıklılık testleri için peptunlu besi yeri hazırlanmıştır. Bu amaçla 6 gr tuz (NaCl) ve 1 gr pepton hassas terazide tartılıp 100 ml suya ilave edilmiştir. Besi yerinin homojen karışımı sağlandıktan sonra pH'sı 7,2±0,2'e Hanna marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır. Daha sonra 5 ml'lik otomatik pipet ile tüplerin herbirine 2 ml olacak şekilde bölünmüştür. Bu besi yerleri 121°C sıcaklıktaki otoklavda 1 atmosfer basıncı altında su buharı yardımı ile 20 dakikada steril edilmiştir. Tuz testleri yapılana kadar bu besi yeri en fazla bir aylık bir süre zarfında +4°C'deki buzdolabında saklanmıştır.

NaCl	1 gr
Pepton	1 gr
Distile su	100 ml
pH	7,2±0,2

Kasik methot kullanılarak bakterilerin tanımlanması amacıyla yapılacak biyokimyasal testlerin sonuçlarının değerlendirilmesi için farklı besi ortamlarında inkübe edilen bakteri izolatların meydana getirdiği kimyasal tepkimelerin tespit edilmesi için farklı kimyasal maddeler kullanılarak hazırlanmış ayıraçların ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ayıraçların hazırlanma teknikleri aşağıda sırasıyla ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur.

2.2.4. Biyokimyasal Teslerin Ayraçları

2.2.4.1. Kovacs Ayracı

İndol besi yerlerine yapılan inokülasyondan sonra üremenin ikinci gününde kovacs (Himedia) ayıracı her bir tüpe 0,5 ml miktarında ilave edilerek kimyasal tepkimenin sonucu kaydedilmiştir. İndol tüpünün üst kısmında meydana gelen pembe (kırmızı/mor) bir renk halkasının oluşması bakterinin besi yerinin birleşiminde bulunan triptofan'ı indole dönüştürmüş olduğu için testin sonucunu pozitif olarak kayıt edilmiştir. Eğer iki dakika içerisinde kırmızı/mor renk oluşmaz ve sadece açık sarı bir halkanın varlığı durumunda ise testin sonucu negatif olarak değerlendirilmiştir.

2.2.4.2. Metil Red (MR) Ayracı

Besi yerinin bileşiminde bulunan glikoz şekeri besiyerine inoküle edilen bakteriler tarafından fermentatif metabolizma sonucu kullanılmasına bağlı olarak organik asitlerin oluştuğunu ve pH'da bir düşüşün oluşup oluşmadığını belirlemek için yapılmaktadır. MR-VP besi yerlerine bakteri inokülasyonundan sonraki ikinci gününde üremenin olduğu tüplerin her birinden 1 ml boş bir tüpe aktarılmıştır ve tüplerin içine 6-7 damla metil red ayıracı ilave edilmiştir. Tüplerde kırmızı bir rengin oluşması durumunda testin sonucunun pozitif olarak kabul edilmiştir. Tüplerde kırmızı bir rengin meydana gelmemesi durumunda ise testin sonucunun negatif olarak kayıt edilmiştir.

2.2.4.3. Voges Proskauer (VP) Ayracı

Bakterilerin identifikasyonunda mikroorganizmaların bazıları glikozu fermentasyonla parçalayarak acetylmethylcarbinol'u (acetoin) ortaya çıkarma yeteneğine sahip olup olmadığının belirlenilmesinde kullanılan bir testdir. MR-VP besi yerine bakteri inokülasyonun sonra üremenin ikinci gününde MR testi için alınan her bir 1 ml'nin dışında kalan tüp üzerine VP ayracının (%5 alfa-naftol) solüsyonundan 0,6 ml ve %40'luk KOH çözeltisinden 0,2 ml ilave edilmiştir. Tüpler 20 dakika süresince iyice çalkalandıktan sonra kırmızı bir halkanın meydana gelmesi durumunda test sonucunun pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Kırmızı bir halkanın oluşmaması durumunda test sonucu negatif bir reaksiyon olarak kayıt edilmiştir.

2.2.4.4. Nitrat Ayracı

Mikroorganizmaların idendifikasyonunda bakterilerin besi ortamındaki nitratları ayrıştırabilme yeteneğinin olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. Nitrat besi yerine bakteri inokülasyonundan sonraki ikinci gününde üremenin olduğu her bir tüpe önce Nitrat-A solüsyonundan (alfa naftilamin %0,5) sonra Nitrat-B solüsyonundan (sulfanilik asit %0,8) peş peşe her bir tüpün içine 0,5 ml otomatik pipet yardımıyla eklenmiştir. Eğer besi yerine inoküle edilen bakteriler tarafından nitrat nitrite indirgenir ise meydana gelen pembe-kırmızı renk pozitif bir tepkime olarak kabul edilmiştir. Renk oluşmaması ise nitratın nitrite indirgenemediğini göstermiş ve test sonucu ise negatif olarak kayıt edilmiştir.

2.2.4.5. Katalaz Ayracı

Hiç kullanılmamış bir lam üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu damlatılmıştır. Alevden geçirilerek steril edilen pasteur pipeti yardımı ile TSA besi yerindeki saf bakteri kolonilerinin birinden alınan bakteri örneği lam üzerinde bulunan hidrojen peroksit karıştırılma esnasında köpük şeklinde oksijen gazının açığa çıktığı görülmesi testin sonucu pozitif olarak kabul edilmiştir. Gaz kabarcıklarının görülmemesi durumunda ise test sonucunun negatif olarak kayıt edilmiştir.

2.2.4.6. Oksidaz Ayracı

Hazır olarak satın alınmış olan oksidaz ayırıcı (bioMerieux) kurutma kâğıdı üzerine damlatılmıştır. TSA'da üreyen saf bakteri kolonilerinden steril pasteur pipeti ile alınan bakteri örnekleri oksidaz ayırıcı damlatılmış kurutma kağıtına sürülerek 5-10 saniyede meydana gelen mor renk değişimine göre testin sonucu pozitif reaksiyon olarak kayıt edilmiştir. 10 saniyeden sonra oluşan renk değişimi veya renk değişiminin olmadığı durumlar ise negatif değer olarak kayıt edilmiştir.

2.2.5. Bakteri İzolatların Genomik DNA'ların Elde Edilmesi

Gökkuşağı alabalığı çiftliklerindeki hastalıklı balıkların iç organlarından izole edilen bakteri izolatlarının DNA'sını çıkartmak için 44 adet izolatin TSA besi

yerlerindeki saf kolonilerden steril 5 ml TSB'e inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. TSB besisi yerleri $20\pm1^{\circ}\text{C}$ 'deki soğutmalı etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Pelet hücrelerin elde edilmesi için TSB'de üreyen bakteriler 1,5 ml eppendorf tüplere aktarılmıştır. Eppendorf tüpler $16000 \times g$ 'de 3 dakikada santrafüj edilerek bakterilerin çöktürülmesi sağlanmış ve sıvı kısım atılarak pelet hücreleri elde edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak bakterilerin tamamı çöktürülmüştür. Böylece, pelet hücreler elde edilmiştir. Bakteri izolatların kaynatma yöntemi ile DNA'sı elde edilememiştir. Bakteriler ait genomik DNA'ları elde etmek için hazır kit satın alınmıştır. Bu amaçla Promega firmasına ait mini genomik DNA saflaştırma kiti kullanılmıştır. Bakteri DNA'ları Promega marka genomik DNA saflaştırma kiti prosedüründeki talimata uygun olarak elde edilmiştir. Bu işlem için bakterilerin Gram boyama testi sonuçlarına göre hareket edilmiştir.

2.2.5.1. Gr (+) ve Gr (-) Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Pelet Hücreleri

Eppendorf tüplere 1 ml gece kültürünü $13.000-16.000 \times g$ 'de 2 dakika boyunca santrifüjlenerek çöktürülmüştür.

Süpernatantı atılmıştır. Eppendorf tüplerin dip kısmında pelet kısım kalmıştır.

A. Gram Pozitif Bakteriler İçin

1. Gr (+) bakteri hücreleri 480µl 50mM EDTA içerisinde pipet yardımıyla homojen hale getirilmiştir.
2. Litik enzimler her bir örnek için eppendorf tüplere 120 µl eklenerek nazikçe karıştırılmıştır.
3. Eppendorf tüpler 37°C 'deki etüvde 50 dakika inkübe edilmiştir.
4. Eppendorf tüpler $16.000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatantı uzaklaştırılmıştır.
5. Sonra bakteri hücrelerini parçalama'ya adım 1'e (aşağıda) geçilmiştir.

B. Gram Negatif Bakteriler İçin

Adım 1, bakteri hücrelerin parçalaması (aşağıdaki gibi) gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerin Lizis

1. Eppendorf tüplerdeki pellet üzerine 600 µl Çekirdek Lizis Solüsyonu eklenmiştir. Karıştırmak için yavaşça pipetlenmiştir.
2. Thermo Shaker marka çalkalamalı inkübatörde 80°C'deki eppendorf tüpler 5 dakika inkübe edilmiştir ve ardından oda sıcaklığına soğutulmuştur.
3. Eppendorf tüplere 3µl RNaz çözültisi eklenmiştir. Karıştırılmış, Eppendorf tüpler 37°C'deki 60 dakika inkübe edilmiştir. Ardından oda sıcaklığına soğutulmuştur.

Protein Çökmesi

4. Eppendorf tüplere 200µl protein çöktürme solüsyonu eklemiştir. Tüpler 20 sn vortekslenmiştir.
5. Tüpler buz içinde 5 dakika inkübe edilmiştir.
6. Eppendorf tüpler 16.000 × g'de 3 dakika boyunca santrifüjlemiştir (DNA sıvı kısmında).

DNA Çöktürülmesi ve Rehidrasyonu

7. Süpernatant, 600µl oda sıcaklığında izopropanol içeren temiz bir tüpe aktarılmış ve karıştırılmıştır.
8. Yukarıdaki pelet hücrelerinde olduğu gibi santrifüjlenmiş ve süpernatantı boşaltılmıştır.
9. Eppendorf tüplere oda sıcaklığında %70'lik etanol 600 µl eklenmiş ve karıştırılmıştır.
10. Eppendorf tüpler 16.000 × g'de 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
11. Etanolü aspire edilmiş ve pelet 37 °C'de 15 dakika boyunca etüvde kurutulmuştur.
12. Eppendorf tüplerdeki DNA pelletine 100µl rehidrasyon solüsyonunda ilave edilmiş ve 1 saat boyunca 65°C'deki etüvde tutularak çözündürülmüştür.

Eppendorf tüplerdeki DNA örnekleri PZR testinde kullanılmak üzere -20 °C'deki derin dondurucuda stoklanmıştır.

2.2.6. PZR'la Bakteri İzolatlarının Doğrulanması

İzole edilen 44 adet bakteri izolatlarının tanımlanmasında 16S rRNA geninden yararlanılmıştır. Promega marka kitin kılavuzuna uygun olarak hazırlanan DNA ekstrakte. PZR için ileri ve geri evrensel bakteriyel primerler 27F (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) ve 1492R (50-GGTTACCTTGTTACGACTT-30) kullanılmıştır (Monciardini vd., 2002). PCR için toplam 50 µl son hacim karışımı

bir ortamda hazırlanmıştır. Karışımın içeriği; 31,5 µl deionize saf su içine, 10X standart taq reaction buffer (Biolabs) 5 µl, 25 mg MgCl₂ (Biolabs) 4 µl, dNTP 4 µl, evrensel primerlerden 27F 1 µl ve 1492R 1 µl, Taq DNA polimerase (Biolabs) 0,5 µl ve bakterinin genomik DNA'sından 5 1 µl ilave edilerek son hacim toplamı 50 µl ayarlanmıştır. BİO-RAD T100 Thermal Cycler cihazı amplifikasyon için kullanılmıştır. Reaksiyon standart koşulları denatürasyon, tavlama, uzama ve son uzama işlemleri takip edilmiştir.

Bakteri izolatların DNA'sı moleküler tanımlamada oligonukleotid primerleri ile 27-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1492-R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') spesifik olan üniversal primerler kullanılmıştır (Monciardini vd., 2002). PZR tetsti sonunda agaroz jelde 1100 bp büyüklüğünde ürünün görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. PZR testinde kullanılan kimyasalların adı ve konsantrasyonların miktarları Tablo 7'de verilmiştir. Primerlerin erime sıcaklığının (T_m) önceden yapılan benzer çalışmalar değerlendirilmiş ve erime sıcaklığı 53°C olarak belirlenmiştir. PZR testinde uygulanan döngü koşulları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 7. PZR testinde kullanılan kimyasallar ve konsantrasyon miktarları

Kimyasallar	Konsantasyon	16S rRNA
10X Go Taq Buffer		5 µl
MgCl ₂	25 mM	4 µl
dNTP karışımı	10 mM	4 µl
Primer R	10 pmol	1 µl
Primer F	10 pmol	1 µl
Total DNA	50 (ng/ml)	5 µl
Taq DNA Polimeraz	5 (U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O		29,5 µl
Toplam		50 µl

Tablo 8. PZR testinde üniversal primerlerin döngü koşulları

PZR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Ayrılma	94	3 dk	1
Ayrılma	94	1,50 dk	
Yapışma	48,5	1 dk	36
Uzama	72	1,50 dk	
Son Uzama	72	5 dk	1
Bekleme	4	∞	

PZR ürünleri görüntülemek için %1'lik agaroz jel agar mikro dalga fırında 2 dakika kaynatılıp 50°C'de ılıklaştırıldıktan sonra 5 µl etidiyum bromit ilade edilmiştir. Küvete dökülüp taraklar yerleştirilmiş ve donması sağlanmıştır. PZR ürününden alınan 6 µl DNA ile 3 µl boya otomatik pipet yardımı ile karıştırılıp agaroz jel elektroforezi deki kuyuçuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemi bittikten sonra elektirik akımı açılarak 30 dakika süre ile DNA'lar yürütülmüştür. Yatay agaroz jel elektroforezde yürütülen PZR ürünü UV lambalarına sahip transillüminatör yardımı ile DNA bantlarının varlığı görüntülenmiştir.

2.2.7. Api 20 Strep Testinin Kullanılabilirliği

Tez çalışmasında kullanmak için -80°C saklanan bakteri izolatları derin dondurucudan çıkartılıp triptik soy agarda yeniden üretilmiştir. Saf olarak TSA'da üreyen 24 saatlik izolatların kolonilerine hareketsiz, gram (+), katalaz (-) ve oksidaz (-) olan bakteri izolatları %5 koyun kan içeren kanlı agara (KA) ekilmiştir. İzolat numaraları kanlı agarın üzerine yazılmıştır. Ekilen kanlı agarlar 25±1°C'de soğutmalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. KA'da saf olarak üreyen bakteri kolonilerin 48 saat sonunda hemoliz oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmiştir. Kok olarak izole edilen bakterilerin biyokimyasal testleri api 20 strep test (BioMérieux, Fransa) kitleri kullanılarak yapılmıştır. Api 20 strep test kiti kullanım klavuzunda belirtildiği şekilde bakteriler izolatlarından hazırlanan süspansiyon otomatik pipet yardımı ile kuyuçuklara inoküle edilmiştir. İnoküle edilen api 20 strep test kitleri 25±1°C'lik soğutmalı inkübatöre yerleştirilmiştir. Api 20 strep test kitleri farklı saatlerde kontrol edilmiş ve kuyuçuklarda oluşan renk değişimi gözle kontrol edilerek negatif ve pozitif sonuçlar kaydedilmiştir. Test kuyuçukların bazılarına gerekli ayıraçlar 24 saat sonunda etüvden çıkartılıp kuyuçukların ilgili kuyucuğuna birer damla olarak damlatılmıştır. Biyokimyasal reaksiyonlar 10 dakika beklenildikten sonra renk değişimine göre pozitif veya negatif olarak kaydedilmiştir. Api 20 strep testindeki şeker testleri 48 saat sonra oluşan sarı renge dönmüş olanlar pozitif (+) veya kırmızı renkte kalanlar ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir. TSA'daki izolatlardan hazırlanan süspansiyonların API 20 strep test kitine inokülesiyondan hemen sonra çekilen ilk görüntü Şekil 5'de verilmiştir.



Şekil 5. Api 20 strep test kitinde kok izolatının inkübasyondan sonraki ilk görünümü

2.2.8. Antibiyogram Testi

Bu çalışmada Borçka baraj gölündeki hastalık vakalarından Fakültemizin Hastalık Laboratuvarına getirilen gökkuşağı alabalıkların böbreklerinden triptik soy agara (TSA) ekim yapılmıştır. Hastalık vakalarındaki ölümleri durdurmak ve balıkların tedavilerinin yapılabilmesinde kullanılacak kemoterapotik maddelerin belirlenmesi için TSA’da saf olarak izole edilen 44 adet izolatın her birine için ayrı ayrı anti-biyogram testi yapılmıştır. İzolatların TSA’daki 12 saatlik taze kültürlerinden öze yardımıyla birkaç saf koloniden alınan bakteri FTS (%0,85 NaCl) içeren 3 ml tüplere ilave edilmiş ve McFarland No: 0,5 bulanıklığına homojen gelene kadar vortekslenmiştir. Önceden otoklavda sterilize edilmiş ve steril plastik petrilere dökülerek +4°C’de tutulan Mueller hinton agar (MHA) buzdolabından çıkartılıp 36°C’deki etüvde 20 dakika nemi alındıktan sonra McFarland No: 0,5 bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyondan 200 µl dökülüp cam baget ile MHA besi yeri yüzeyine kuruyana kadar yayılmıştır (Önalın vd., 2020).

Bioanalyse marka 8 diskli antibiyotik dispanseri (disk dağıtıcı) yardımıyla MHA üzerine antibiyotik diskleri dağıtılmıştır. İnokülasyon sonrası MHA besi yerleri 22±2°C’de 18 saat üremeye bırakılmıştır. Kemoterapide kullanılacak antibiyotik disklerin MHA besinde meydana getirmiş olduğu zon çapları dijital bir kumpas yardımıyla ölçülerek zon çapları kaydedilmiştir. Antibiyogram test sonucunda ölçülüp kayıt edilen veriler Tablo 9’daki verilen standart inkübasyon zon çapları aralıklarına göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Antibiyogram test sonucu izolatlarının antibiyogram testi duyarlılık profillerine ait veriler bulgular bölümünde Tablo 6’da sunulmuştur. Antimikrobiyet test sonucu bakteri izolatlarının tedavisinde kullanılacak olan kimyasal maddelerin etkili olup olmadığına ait bilgiler Tablo 13’de verilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan bakteri izolatları National Committee for Clinical Laboratory (1997) tarif ettiği standart disk difüzyon yöntem kullanılarak antimikrobiyel etkinliği test edilmiş ve test sonuçları değerlendirilmiştir. Tez

çalışmasında antimikrobiyel testleri için, ampisilin (10µg), amoksiklin(10µg), eritromisin(15µg), enrofloksasin (5 µg), florfenikol (30 µg), oksitetrasiklin (30µg), oksolinik (2µg), trimetoprim-sulfametoksazol (25µg), trimetoprim-sulfadiazine (30 µg) gibi antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Tablo 9. Antibiyotik disklerin konsantrasyonları ve zon çapı sınır değer aralıkları

Antimikrobiyel ajanlar	Disk Konsantrasyonu	Standart İnhibisyon Zon Çapı (mm)			
		D	OH	H	Referanslar
Ampisilin	AM 10 µg	≤13	14-16	≥17	NCCLS, 1997
Amoksisilin	AX 10 µg	≤13	14-17	≥18	NCCLS, 1997
Doksisiklin	DO 30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14	NCLSI, 2013
Enrofloksasin	ENR 5 µg	≤16	17-20	≥21	NCCLS, 1997
Eritromisin	E 15 µg	≤13	14-22	≥23	NCCLS, 1997
Florfenikol	FFC 30 µg	≤14	15-18	≥19	NCCLS, 1997
Flumequin	FLM 30 µg	≤10	11-12	≥13	NCCLS, 1997
Oksitetrasiklin	T 30 µg	≤14	15-18	≥19	NCCLS, 1997
Trimetoprim+Sülfadiazine	TS 30 µg	≤12	13-16	≥17	NCCLS, 1997
Trimetoprim+Sulfamethaksazol	SXT 25 µg	≤10	11-15	≥16	NCCLS, 1997

D: Dirençli, OH: Orta Hassas, H: Hassas.

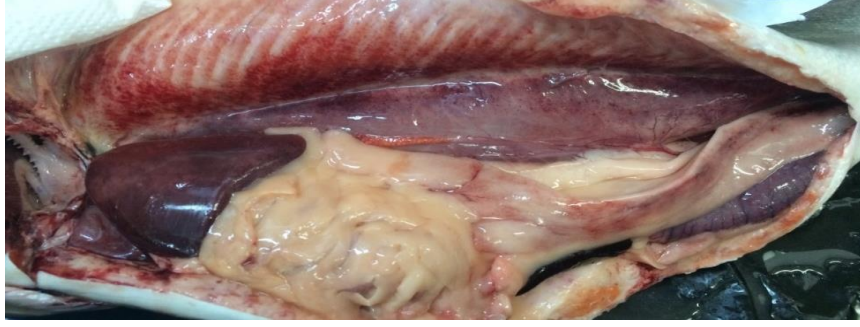
3. BULGULAR

3.1. Hastalıklı Gökkuşığı Alabalığındaki Klinik Bulgular

Hastalığa yakalanan balıklarda tipik hastalık belirtisi olarak iştahsızlık, baş, göz ve yüzgeç tabanlarında kanama, ekzoftalmus (tek veya çift taraflı), semptomlar gösterdiği tespit edilmiştir. Hastalıklı gökkuşığı alabalıkların su yüzeyinde halsiz bir şekilde yüzdükleri, havuzun durgun kısmına toplandıkları ve suyun havuzdan çıktığı yere yığılmış oldukları gözlenmiştir. Hastalıklı balıkların otopsisinde iç organların kanamalı olduğu, karaciğerin solgun olduğu, vakalrın çoğunda karaciğer üzerinde, plorik çekumlarda ve hava kesesinde yaygın bir şekilde noktasal kanamaların mevcut olduğu tespit edilmiştir. Bağırsakların gergin olduğu, bağırsak içeriğinin beyaz veya bazen sarımsı bir sıvının bulunduğu görülmüştür. Bazı vakalarda tüm bağırsağın yaygın bir şekilde kanamalı olduğu tespit edilmiştir. Kok hastalığına yakalanmış gökkuşığı alabalığının dış görünümü Şekil 6'da ve otopsi görünümü ise Şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 6. Gökkuşığı alabalığında kok hastalığının tipik dış semptomları (Orijinal)



Şekil 7. Gökkuşáğı alabalığında iç organlardaki kok hastalığının belirtileri (Orijinal)

3.2. Geleneksel İdentifikasyon Test Sonuçları

Bu tez çalışmasında Borçka baraj gölündeki gökkuşáğı alabalık işletmelerden fakültemiz laboratuvara gönderilen balık örneklerinin böbreklerinden izole edilen 44 adet bakteri izolatu kullanılmıştır. Hastalık vakalarından izole edilen bakterin tanımlanmasında ilk önce hareket muayenesi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapılmıştır. Bu bakteri izolatlarına geleneksel klask fiziksel ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan bakteri izolatlarının ait fiziksel ve biyokimyasal testler sonuçları Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. Bakteri izolatlarına ait fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları

Karakter	Balıklardan izole edilen bakteri izolatlarına verilen kod numarası													
	KO-01	KO-02	KO-03	KO-04	KO-05	KO-06	KO-07	KO-08	KO-09	KO-10	KO-11	KO-12	KO-13	KO-14
Şekli	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR testi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SS testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemoliz	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%1NaCl														
%6NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+36°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 10. (Devamı). Bakteri izolatlarına ait fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları

Karakter	Balıklardan izole edilen bakteri izolatlarına verilen kod numarası												
	KO-15	KO-16	KO-17	KO-18	KO-19	KO-20	KO-21	KO-22	KO-23	KO-24	KO-25	KO-26	KO-27
Şekli	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR testi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SS testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemoliz	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%1NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%6NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+36°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Karakter	Balıklardan izole edilen bakteri izolatlarına verilen kod numarası												
	KO-29	KO-30	KO-31	KO-32	KO-33	KO-34	KO-35	KO-36	KO37	KO-38	KO-39	KO-40	KO-41
Şekli	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OF	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lysin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arjinin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR testi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SS testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemoliz	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α
%0 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%1NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%6NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+36°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.3. Api 20 Strep Test Sonuçları

Bu tez çalışmasında PZR testi ile doğrulanmış olan 18 adet *Lactococcus* sp. tespit edilmiştir. Api 20 strep testi yapılan izolatların biyokimyasal test sonuçları aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir. Voges Proskuer (VP) izolatların hepsinde pozitif reaksiyon meydana getirmiştir. Hippurat hidroliz (HIP) KO-09, KO-18 ve KO-19 nolu izolatlarda negatif iken diğer izolatların hepsinde pozitif olarak belirlenmiştir. Eskulin hidroliz (ESC) ve Pirrolidonil arilamidaz (PYRA) test sonuçlarının bütün izolatlarda pozitif olduğu tespit edilmiştir. α -Galaktosidaz (-GAL) KO-13, KO-18 ve KO-19 nolu izolatlarda pozitif reaksiyon oluşturmaya karşın diğer 15 izolatın ise negatif olduğu belirlenmiştir. İzolatların hepsinde β -Glukuronidaz (β -GUR) test sonuçlarının negatif olduğu tespit edilmiştir. β -Galaktosidaz (β -GAL) ve Alkalın fosfataz (PAL) testlerinde KO-09, KO-13, KO-18 ve KO-19 nolu izolatların test sonuçlarının pozitif olmasına karşın diğer 14 adet izolatın negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Lösin arilamidaz (LAP) izolatların hepsinin pozitif olduğu belirlenmiştir. Arjinin dihidrolaz (ADH), Riboz (RIB) ve Mannitol (MAN)tüm izolatlarda pozitif olmasına karşın Arabinoz (ARA) ve İnulin (INU) bütün izolatların negatif olduğu tespit edilmiştir. Sorbitol (SOR) KO-13 ve KO-21 kodlu izolat örneklerinde pozitif diğer 16 adet izolatın ise negatif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Laktoz (LAC) KO-03, KO-13, KO-18, KO-19, KO-21, KO-22, KO-25 ve KO-26 kodlu izolat örnekleri pozitif iken diğer izolatların ise negatif olduğu belirlenmiştir. Trehaloz (TRE) ve Amigdalın tüm izolatların pozitif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. Rafinoz (RAF) KO-03, KO-04, KO-13, KO-18, KO-19 ve KO-21 nolu izolatların pozitif reaksiyon vermesine karşın diğer izolatların ise negatif olduğu tespit edilmiştir. Glikojen (GLYG) KO-04 nolu izolatın pozitif reaksiyon verirken diğer 17 adet izolatın ise negatif olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan kok izolatların hepsi alfa hemoliz meydana getirdiği tespit edilmiştir. Hastalıklı alabalıkların dalak ve böbrek gibi iç organlarından üretilen bakteri izolatları genelde 7143111 ve 7143511 profili oluşturduğu tespit edilmiştir. Referans izolat olarak kullanılan *L. garvieae* (ATCC43921) ile yapılan api 20 strep test kitindeki kuyucuklara ayıraçlar ilave edilmeden önceki ve ilave edildikten 15 dakika sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları Şekil 9'da verilmiştir. Bakteri izolatların api 20 strep test kiti kuyucuklarına ilavesine ait ilk görüntü Şekil 10'da verilmiştir. Tez çalışmada testi yapılan kok izolatlarına ait api 20 strep testinin (24

saat) sonra ayıraçlar dök döküldükten ve en az 10 dakika beklendikten sonraki oluşan görüntülerin bazıları Şekil 11’de sunulmuştur.



Şekil 8. *L. garvieae* referans izolatına (ATCC43921) ait API 20 Strep testinde ayıraçlar dökülmeden önceki ve döküldükten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları (Orijinal)



Şekil 9. Bakteri izolatların api 20 strep test kiti kuyucuklarına ilavesine ait ilk görüntü



Şekil 10. Api 20 strep kitine ayıraçların ilavesinden 10 dakika sonraki görüntü (Orijinal)

Tablo 11. Kok izolatların Api 20 strep kitindeki biyokimyasal test sonuçları

İzolatın Kodu	<i>L. garvieae</i> izolatlarının API 20 strep test sonuçları																				
	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
KO-01	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-02	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-03	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	α
KO-04	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	α
KO-05	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-06	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-07	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-08	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-09	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
KO-13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	α
KO-18	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	α
KO-19	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	α
KO-20	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	α
KO-21	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	α
KO-22	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
KO-25	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
KO-26	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
KO-33	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
Ref.	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	α

VP: Voges Proskuer, HP: Hippurat hidroliz, ESC: Eskulin hidroliz, PYRA: Pirrolidonil arilamidaz, α -GAL: α -Galaktosidaz, β -GUR: β -Glukuronidaz, β -GAL: β Galaktosidaz, PAL: Alkalın fosfataz, LAP: Lösin arilamidaz, ADH: Arjinin dihidrolaz, RİB: Riboz, ARA: Arabinoz, MAN: Mannitol, SOR: Sorbitol, LAC: Laktoz, TRE: Trehaloz, INU: İnulin, RAF: Rafinoz, AMD: Amigdalın ve GLYG: Glikojen.

3.4. PZR Ürünlerin Sekans Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılmak üzere bakteri izolatlarının kit yardımı ile çıkartılan DNA'ları PZR testi ile elde edilen PZR ürünler hizmet alımı yolu ile okutmak üzere sekan analizine için Solver ArGe şirketine gönderilmiştir. Gönderilen PZR ürünlerinin tek taraflı okuma sonuçları GenBank Nucleotide BLAST sisteminden karşılaştırılarak bakterilerin identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin GenBank Nucleotide BLAST sisteminde elde edilen benzerlik indeksleri ve identifikasyon ait isimler Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. GenBank veri sisteminde PZR ürünlerin benzerlik oranlarının karşılaştırılması

No	Tanımlanan İzolat İsmi	GenBank Kayıt No	Benzerlik (%)
KO01	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%99,34
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%99,33
KO02	<i>Enterococcus</i> sp.	LC484773.1	%83,96
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	MH899230.1	%83,96
KO03	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT597623.1	%98,91
	<i>Lactococcus petauri</i>	OK326448.1	%99,01
KO04	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573780.1	%99,24
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP146746.1	%99,12
KO05	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT597623.1	%98,08
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%98,16
KO06	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%96,99
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP146746.1	%96,78
KO07	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%96,06
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%96,13
KO08	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573706.1	%98,94
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP146746.1	%99,06
KO09	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573780.1	%97,84
KO13	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	MT631976.1	%99,01
	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	HE999757.2	%99,34
KO14	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	KF358269.1	%98,18
KO15	<i>Enterococcus hermanniensis</i>	OQ569416.1	%97,75
	<i>Enterococcus pallens</i>	OP358133.1	%97,75
	<i>Enterococcus pseudoavium</i>	MT597577.1	%96,20
KO24	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%97,54
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP146746.1	%97,63
KO27	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT597623.1	%97,04
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%96,84
KO30	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%98,61
	<i>Lactococcus petauri</i>	OK326376.1	%98,61
KO32	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	HM004215.1	%98,90
	<i>Lactococcus lactis</i>	MT573832.1	%98,90
KO45	<i>Lactococcus garvieae</i>	MZ514086.1	%98,91
	<i>Lactococcus petauri</i>	OK326448.1	%98,80
	<i>Pseudomonas fragi</i>	AB685653.1	%98,78
KO46	<i>Pseudomonas lundensis</i>	PP725226.1	%98,36
	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	LC508012.1	%98,56
	<i>Chryseobacterium</i> sp.	HM629415.1	%98,07
KO48	<i>Kaistella carnis</i>	CP034159.1	%97,75
	<i>Kaistella polysaccharea</i>	CP084528.1	%96,30
KO50	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%96,98
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%96,97
KO51	<i>Lactococcus garvieae</i>	MW785581.1	%98,37
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%98,47
	<i>Pseudomonas fragi</i>	PP725232.1	%98,50
KO52	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	JQ782901.1	%98,18

Tablo 12. (Devamı). GenBank veri sisteminde PZR ürünlerin benzerlik oranlarının karşılaştırılması

No	Tanımlanan İzolat İsmi	GenBank Kayıt No	Benzerlik (%)
KO53	<i>Pseudomonas fragi</i>	PP725234.1	%98,06
	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	MT555373.1	%98,16
KO61	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	KT351715.1	%98,72
	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	MW555186.1	%98,92
KO62	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ON597452.1	%99,03
	<i>Pseudomonas canadensis</i>	PQ061494.1	%99,13
KO64	<i>Pseudomonas putida</i>	MT790733.1	%98,49
	<i>Pseudomonas laurentiana</i>	MT626819.1	%98,48
	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	ON479621.1	%98,29
KO69	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ON337505.1	%97,97
	<i>Aeromonas media</i>	JQ781548.1	%98,37
KO70	<i>Lactococcus garvieae</i>	MT573633.1	%97,31
	<i>Lactococcus petauri</i>	CP045924.1	%97,31
KO71	<i>Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes</i>	KF413416.1	%97,84
	<i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>	CP048223.1	%97,94
KO72	<i>Yersinia ruckeri</i>	CP163503.1	%98,71
	<i>Aeromonas media</i>	MK656372.1	%96,30
KO74	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	CP027856.1	%96,02
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ON337505.1	%96,02
KO80	<i>Klebsiella pneumonia</i>	MZ389250.1	%98,38
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	CP048598.1	%98,28
KO83	<i>Aeromonas sobria</i>	KF554426.1	%98,92
KO84	<i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i>	JX164203.1	%98,94
KO88	<i>Aeromonas veronii</i>	MN582973.1	%98,92
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KC202281.1	%98,92
KO89	<i>Citrobacter werkmanii</i>	MN611471.1	%88,24
	<i>Enterobacter asburia</i>	OK271409.1	%90,18
	<i>Citrobacter werkmanii</i>	MN611471.1	%91,47
KO90	<i>Enterobacter asburia</i>	OK271409.1	%90,55
	<i>Citrobacter tructae</i>	MN093886.1	%86,63

Tez çalışmasında sekans analizine gönderilen PZR ürünlerinin tek taraflı okuma sonuçlarına göre, KO01, KO03, KO04, KO05, KO06, KO07 KO08, KO24, KO27, KO30, KO45, KO50, KO51 ve KO70 *Lactococcus garvieae* veya *Lactococcus petauri* KO09 *Lactococcus garvieae* olduğu tespit edilmiştir. KO02 *Enterococcus* sp. veya *Enterococcus casseliflavus* olduğu, KO15 *Enterococcus hermannienseis*, *E. pallens* veya *E. pseudoavium*, KO89 ve KO90 izolatının *Enterobacter asburia* olabileceği, KO89 *Citrobacter werkmanii* ve KO90 *Citrobacter werkmanii* veya *Citrobacter tructae* benzer olduğu, KO13 ve KO61 *Carnobacterium maltaromaticum*, KO14 *Delftia tsuruhatensis*, KO32 *Lactococcus lactis subsp. lactis* veya *Lactococcus lactis* olduğu, KO46 *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas lundensis* veya *Pseudomonas psychrophila*, KO52 ve KO53 *Pseudomonas fragi* veya *Pseudomonas psychrophila*, KO62 *Pseudomonas fluorescens* veya *Pseudomonas Canadensis*, KO64 *Pseudomonas*

putida veya *Pseudomonas laurentiana*, KO48 *Chryseobacterium* sp. *Kaistella carnis* veya *Kaistella polysaccharea*, KO69, Ko74 *Aeromonas rivipollensis*, *Aeromonas hydrophila* veya *Aeromonas media*, KO71 ve KO84 *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* ve *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, KO72 *Yersinia ruckeri*, KO80 *Klebsiella pneumonia* veya *Klebsiella aerogenes*, KO83 *Aeromonas sobria*, KO88 *Aeromonas veronii* ve *Aeromonas hydrophila* olduğu belirlenmiştir. KO10, KO18, KO22, KO23, KO35, KO73 KO74 KO81 ve KO82 izolatlarının ürünleri okunmadığı ve bu durum DNA'ların saf olarak izole edilemiş olduğuna bağlanmıştır.

Bakteri izolatlarından KO13 GenBankta *Carnobacterium maltaromaticum* olarak tespit edilmiştir. ABD, Virginia eyaletindeki ticari bir su ürünleri yetiştirme tesisinden ölmekte olan gökkuşağı alabalığı *Oncorhynchus mykiss*'in arka böbreğinden ve derisinden elde edilen bakteri olan *Carnobacterium maltaromaticum*, ABD'de ve dünya genelinde somon balıklarında yeni ortaya çıkan bir patojen olarak kabul edildiği rapor edilmiştir (Smith vd., 2023). Pasifik Kuzeybatısı'ndan Laurentian Büyük Göller havzasında Gram pozitif atipik laktobasil tarafından yapılan enfeksiyonların doğal ve kültürü yapılan *Oncorhynchus* spp. anaç balıklarındaki bazı ölümlerle ilişkili olan hastalık etkeninin *Carnobacterium* cinsine ait olduğu rapor edilmiştir. Bakteriyolojik olarak incelenen 1564 gökkuşağı ve Çelikleş gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*), coho somonu (*O. kisutch*) ve Chinook somonu (*O. tshawytscha*) arasından, 51 enfekte balığın böbreklerinden, dalağından, yüzme kesesinden ve/veya dış ülserasyonlarından 57 *Carnobacterium* spp. İzolatı elde edilmiştir. Fenotipik ve biyokimyasal karakterizasyon, kısmi 16S rDNA dizilimi ve 30 temsili izolatın filogenetik analizleri 29'unun *Carnobacterium maltaromaticum* ve 1'inin *C. divergens* olarak tanımladığı bildirilmiştir. *C. maltaromaticum* enfeksiyonları, psödokidney hastalığına özgü belirtilerle ilişkilendirildiği, ancak zaman zaman nefrokalsinozis karakteristik özelliği olan büyük histopatolojik değişiklikleri gösteren balıklarda da gözlemlendiği rapor edilmiştir. *C. maltaromaticum* enfeksiyonlarının Büyük Göller havzasında yaşayan *Oncorhynchus* spp.'nin hem vahşi hem de çiftlik yumurtlama popülasyonlarında yaygın olduğu bulunsa da enfeksiyonun yaygınlığı balık cinsine ve türüne, cinsiyete ve zamana göre önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir (Loch vd., 2011)

Bakteri izolatlarından KO14 GenBankta *Delftia tsuruhatensis* olarak tespit edilmiştir. *Delftia tsuruhatensis*, Comamonadaceae familyasından Gram negatif, çubuk şeklinde, katalaz ve oksidaz pozitif, hareketli bir bakteridir. İlk olarak 2003 yılında Japonya'daki bir atık su arıtma tesisinden izole edilmiştir. *D. tsuruhatensis* fırsatçı bir patojen olduğu bildirilmiş ve tüm insan enfeksiyonları sağlık hizmetleriyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Ranc vd. 2018). *Delftia tsuruhatensis* suşları ilk kez çamurdan izole edildiği, su sistemlerinde, balık bağırsaklarında ve fırsatçı bir insan patojeni olarak ilole edildiği rapor edilmiştir (Chaires vd., 2022).

Bakteri izolatlarından KO15 *Enterococcus hermanni*ensis, *Enterococcus pseudoavium* veya *Enterococcus pallens* olarak tespit edilmiştir. *Enterococcus hermanni*ensis, köpek bademciklerinden izole edilen bir mikroaerofil, Gram pozitif, kok şeklindeki bakteridir (Koort vd., 2004). *Enterococcus pseudoavium*, sığır mastitisinden izole edilen mikroaerofil bir hayvan patojenidir (Collins vd., 1989). *Enterococcus pallens*, *Enterococcus* cinsinin dört sarı pigmentli üyesinden biridir. İnsan patojeni olarak izole edildiği bildirilmiştir (Lévesque, vd., 2016). Ülkemizde hastalıklı gökkuşağı alabalıklarda izole edilen *E. faecalis* ve *E. faecium* bakterilerin ticari yem kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (Kumru vd., 2024).

Pseudomonas fragi'nin vahşi tip suşları floresansız ve hareketsiz olduğu bildirilmesine rağmen floresan olan atipik *P. fragi* suşları çiğ süttten ve bozulmuş balıklardan izole edilmiştir. Bununla birlikte, şu ana kadar incelenen *P. fragi* suşlarının büyük çoğunluğu kamçılı olduğu, ancak bu kamçılı suşların hareketliliği kolayca tespit edilemediği bildirilmiştir (Liao, 2006). Ülkemizdeki gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde yapılan arazi çalışmalardan izole edilen 90 adet *Pseudomonas* suşundan 4'ünün *Pseudomonas fragi* suşu olduğu bildirmiştir (Duman vd., 2021). Aynı çalışmada bir suşun *Pseudomonas lundensis* olarak izole edildiği rapor edilmiştir. İran'ın kuzeyindeki bir gökkuşağı alabalığı çiftliğinde 2017 sonbaharında bir hastalık vakasından izole edilen *Pseudomonas psychrophila*'s'in balıklarda hastalığın yeni bir etiyolojik etkeni olduğuna dair dünyadaki ilk rapor olarak sunulmuştur. (Haghighi, 2021). Hastalıklı gökkuşağı alabalıkların (45-107 gr) iştahsız, uyuşuk ve haftalık ölüm oranı %10 olduğu rapor edilmiştir. Balıklarda koyu pigmentasyon, ekzoftalmi, yüzgeçlerin tabanında kanama ve doku hasarı gibi dış belirtilerin yanı sıra dalakta büyüme, soluğun karaciğer ve sarımsı sıvıyla dolu bağırsak gibi iç belirtilerin varlığı

bildirilmiştir (Haghighi, 2021). Balıklarda hastalığa neden olan *Pseudomonas* enfeksiyonlarının başlıca etkeni *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. fluorescens* ve *P. chloropsis* olarak ilkönce rapor edilirken (Austin ve Austin, 1999), daha sonraki araştırmalarda farklı balık türlerinden ve diğer su canlılarından *P. pseudomallei*, *P. putrefaciens*, *P. stutzeri*, *P. putida* ve *P. pseudoalcaligenes* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Buller, 2004). Ülkemizdeki kültürü yapılan alabalıklardan bugüne kadar yapılan çalışmalarda çeşitli araştırmacılar tarafından *Pseudomonas* cinsi bakterilerden *Pseudomonas* sp. (Kılıc vd., 2007, Aydın vd., 2005), *P. fluorescens* (Akaylı ve Timur, 2004; Özer vd., 2008), *P. putida* (Altınok vd., 2006; Kayış vd., 2009), *P. luteola* (Altınok vd., 2007; Kayış vd., 2009), *P. aeruginosa* ve *P. oruzihabitans* (Özer vd., 2008) etkenlerinin izole edildiği bildirilmiştir.

Bakteri izolatlarından KO-24 izolat gen banktaki HM629415.1 *nolu izolata* %98,07 oranında *Chryseobacterium* sp. benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Chryseobacterium* spp. (Flavobacteriaceae familyası) Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da 2016-2017 yıllarında ortaya çıkan hastalık vakalarında balık patojeni olarak rapor edilmiştir. Farklı tatlı su sistemlerinden kültüre alınmış hastalıklı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), yeşil mersin balığı (*Acipenser medirostris*), beyaz mersin balığı (*A. transmontanus*), mavi ram çikliti (*Mikrogeophagus ramirezi*) ve Chinook somonu (*O. tshawytscha*) arka böbreğinden veya dalağından hastalık etkeni olarak izolatu elde edildiği bildirilmiştir (Loch ve Faisal, 2015; Sebastião vd., 2019). Genellikle gıda bozulma bakterisi olarak bilinen *Chryseobacterium balustinum*'un patojenik özelliklerini yeniden değerlendirmeyi amaçlamıştır. Kore Cumhuriyeti'nin Jeonbuk eyaletindeki bir gökkuşağı alabalığı çiftliğinde kitlesel ölümler gözlenmiş. Kore'de gökkuşağı alabalığı ölümleri veya enfeksiyonları hakkında diğer ülkelere göre daha az çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmalar arasında birkaç hastalık vakasının *Chryseobacterium* enfeksiyonu olarak bildirmiştir. Dizileme analizi, bu bakterinin *Chryseobacterium balustinum* ile yakından ilişkili olduğunu (%99,24) ortaya koymuştur. API testi, dizileme ve filogenetik analiz dahil olmak üzere bakteriyel tanımlama denemeleri, 24 izolatın *C. balustinum* olduğunu rapor edilmiştir (Jung vd., 2022). *Chryseobacterium shigense*, Mayıs 2008 ile Haziran 2009 arasında bir balık çiftliğinde meydana gelen farklı hastalık dönemlerindeki hasta gökkuşağı alabalıklarının karaciğerinden, böbreğinden

ve solungaçlarından izole edildi. İzolatların kimliği 16 S rRNA gen dizilimi ve fenotipik karakterizasyonla doğrulandığı bildirilmiştir (Zamora vd., 2012). Ülkemizde yapılan bir araştırmada ise yem alımında güçlük çeken, renkte kararma, gözlerde ekzoftalmus ve sırt yüzgecinde ülser belirtileri gösteren 1-4 gram ağırlığındaki gökkuşağı alabalığı yavrularında izole edilen oniki adet bakterinin *Chryseobacterium piscicola* rapor edilmiştir (Satıcıoğlu vd., 2020).

Bakteri izolatlarından KO48 *Kaistella carnis* %97,75 ve *Kaistella polysaccharea* %96,30 oranlarında benzerlik gösterse de literatürde bu etkenlerin balıklarda hastalık yaptığına dair herhangi bir rapora rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında PZR ürünlerinin dizi analizi okuma sonuçları GenBank verileri ile karşılaştırıldığında balıklarda motil *Aeromonas* hastalığının etkeni olan *Aeromonas hydrophila* ve *A. media* KO69 ve KO74 izolatları benzerlik göstermiştir. KO83 izolatu *Aeromonas sobria*’a benzerlik gösterirken KO88 izolatu ise *Aeromonas hydrophila* ve *A. veronii*’e benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Bakteri izolatlarından KO71 balıklarda hastalık oluşturan non-motil *Aeromonas* hastalığının etkeni olan *A. salmonicida subsp. achromogenes* ve *A. salmonicida subsp. salmonicida*’a, KO84 izolatu ise *A. salmonicida subsp. salmonicida*’a benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasının sonuçlarına göre “Borçka Baraj Gölünde Kültürü Yapılan Gökkuşağı Alabalıklarında Görülen Bakteriyel Hastalıkların Mevsimsel Dağılımı” incelendiğinde hastalık etkenlerine ait veriler Tablo 13’de verilmiştir.

Çalışmanın sonuçlarına göre Haziran, Kok ve Enterokok enfeksiyonu, Temmuz Kok enfeksiyonu, Ağustos ayında Kok, *Karnobacter* ve *Delftia* yaygın olduğu tespit edilmiştir. Eylül ayında Enterokok enfeksiyonu, Ekim ayında Kok enfeksiyonu, Kasım ayında Laktokozis, Kok enfeksiyonu ve *Pseudomonas* enfeksiyonu yaygın olduğu belirlenmiştir. Kış aylarından Aralık’da *Chryseobacterium* ve kok enfeksiyonu, Ocakta *Pseudomonas* ve *Carnobacterium* enfeksiyonu, Şubat’ta *Aeromonas* ve Kok enfeksiyonuna görülmüştür. İlkbahar aylarından Mart’ta non-motil *Aeromonas*, Yersiniozis ve Motil *Aeromonas* enfeksiyonu, Nisan’da *Klebsiella*, Non motil ve motil *Aeromonas* enfeksiyonu, Mayıs ayında motil *Aeromonas*, *Citrobacter* ve Enterokok enfeksiyonları meydana geldiği tespit edilmiştir.

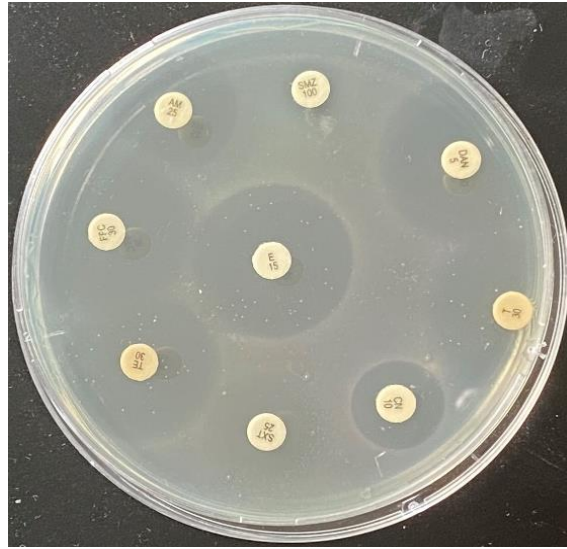
Tablo 13. Hastalık etkenlerinin mevsimsel dağılımı

Mevsimler	Aylar	Hastalığın adı	Hastalık etkenleri	Prevalans
Yaz	Haziran	Kok	<i>Lactococcus petauri</i> , <i>Lactococcus petauri</i>	66,60%
		Enterokok	<i>Enterococcus sp.</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i>	33,40%
	Temuz	Kok	<i>Lactococcus petauri</i> , <i>Lactococcus petauri</i>	100%
		Kok	<i>Lactococcus petauri</i> , <i>Lactococcus petauri</i>	71,44%
	Agustos	Karnobacter	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	%14,28
		Delftia	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	%14,28
Sonbahar	Eylül	Enterokok	<i>Enterococcus hermannienseis</i> <i>Enterococcus pallens</i> <i>Enterococcus pseudoavium</i>	100%
			<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactococcus petauri</i>	100%
			<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i>	33,30%
	Kasım	Kok	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactococcus petauri</i> <i>Pseudomonas fragi</i>	33,40%
			<i>Pseudomonas lundensis</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i>	33,30%
			<i>Chryseobacterium</i>	%33,3
Kış	Aralık	Kaistella	<i>Chryseobacterium sp.</i> <i>Kaistella carnis</i> <i>Kaistella polysaccharea</i>	%33,3
		Kok	<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactococcus petauri</i> <i>Pseudomonas fragi</i>	%33,4
		Pseudomonas	<i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas Canadensis</i>	75%
	Oçak	Pseudomonas	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas laurentiana</i>	25%
			<i>Aeromonas rivipollensis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Aeromonas media</i>	33,40%
			<i>Lactococcus garvieae</i> <i>Lactococcus petauri</i>	33,30%
	Şubat	Aeromonas	<i>A. salmonicida subsp. achromogenes</i> <i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i> <i>Yersinia ruckeri</i>	33,30%
			<i>Aeromonas media</i> <i>Aeromonas rivipollensis</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	33,40%
			<i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Aeromonas sobria</i>	33,30%
	Mart	Motil Aeromonas	<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i> <i>Aeromonas veronii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	33,40%
İlkbahar	Nisan	Citrobacter	<i>Citrobacter werkmanii</i> <i>Citrobacter tructae</i> <i>Enterobacter asburia</i>	33,30%
				33,30%
				33,30%
	Mayıs	Enterobacter		33,30%
				33,30%

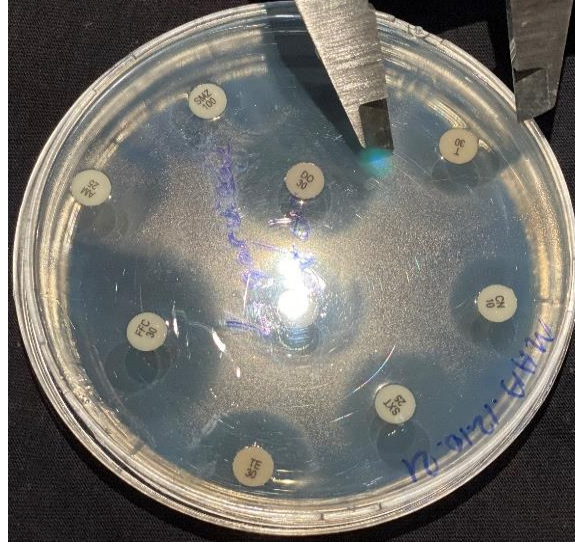
3.5. Antibiyogram Test Sonuçları

Borçka Baraj Gölündeki işletmelerden izole edilen hastalık vakalarındaki gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bakteri izolatlarına uygulanan disk diffüzyon yöntemi ile yapılan antimikrobiyel hassasiyet test sonuçlarına göre; tüm bakteri izolatlarının eritromisine %86,36, ampisiline %81,81, amoksisilinin %72,27, florfenikolun %54,55, oksitetrasiklin %47,73, trimethoprim+sulfamethaksazole %47,73 ve trimethoprim+sulfadiazine karşı %38,64 direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşın doksisiklinin %86,36, flumequine 56,82, enrofloksasine %50, trimethoprim+sulfadiazine %50, trimethoprim+sulfamethaksazole %43,18 oranında etkili olduğu belirlenmiştir.

Hastalık vakalarından izole edilen bakteri izolatlarına yapılan antimikrobiyel test sonuçlarına ait besiyeri Şekil 11’de ve antibiyotik diskleri etrafında oluşan zon çaplarının dijital kumpas ile ölçümü Şekil 12’de gösterilmiştir. Antimikrobiyel hassasiyet testinde en yüksek orta hassasiyet enrofloksasinde %34,10 ve oksitetrasiklinde %25 oranında olduğu ölçülmüştür. Disk difüzyon test sonucunda ölçülen zon çaplarının değerlendirilmesi sonucu bakteri izolatlarına ait hassasiyet profilleri Tablo 13’de verilmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre bakteri izolatlarının antibiyotiklere karşı ölçülen direnç ve duyarlılık oranları hesaplanarak grafik olarak Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 11. Disk diffüzyon yönteminde antimikrobiyel test sonuçları (Orijinal)



Şekil 12. Dijital kumpas ile zon çaplarının ölçülmesi (Orijinal)

Tablo 14. Bakteri izolatlarına ait kemoterapotiklerin antimikrobiyel hassasiyet profilleri

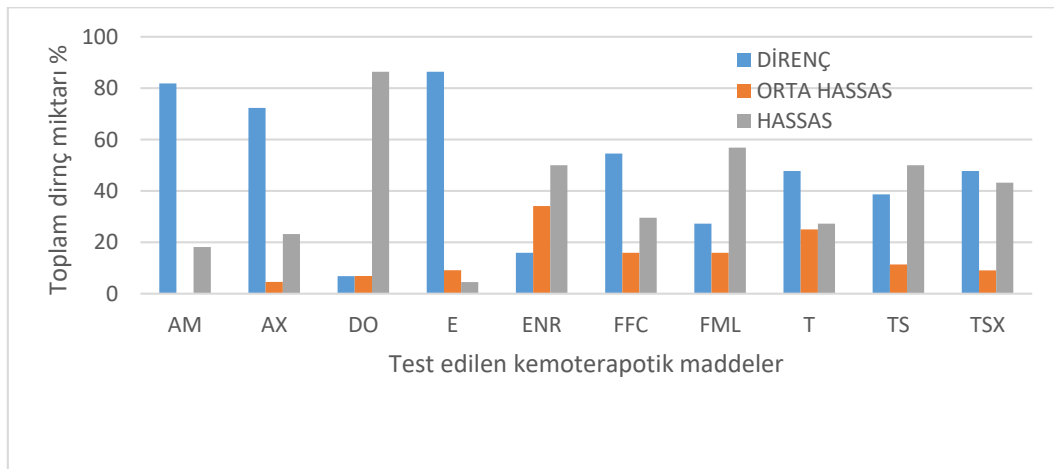
İzolat kodu	Antibiyotik Diskleri									
	AM (10 µg)	AX (10 µg)	DO (30 µg)	ENR (5 µg)	E (15 µg)	FFC (30 µg)	FLM (30 µg)	T (30 µg)	TS (30 µg)	STX (25 µg)
KO-01	D	D	H	H	D	D	H	H	H	D
KO-02	D	D	H	H	D	D	H	H	H	OH
KO-03	D	D	H	H	D	D	H	OH	H	OH
KO-04	D	D	H	H	D	H	OH	OH	H	H
KO-05	D	D	H	H	D	D	D	D	D	D
KO-06	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H
KO-07	D	D	H	D	OH	OH	D	OH	H	H
KO-08	D	D	OH	D	D	D	D	D	D	D
KO-09	D	D	H	D	D	D	D	D	D	D
KO-10	H	H	H	D	OH	OH	D	H	D	D
KO-11	D	H	D	D	D	D	D	D	D	D
KO-12	D	D	H	H	D	H	H	H	OH	H
KO-13	D	D	OH	D	D	D	D	OH	D	D
KO-14	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
KO-15	H	H	H	OH	H	H	OH	H	OH	D
KO-16	D	D	H	H	D	D	H	OH	OH	D

AM: Ampisilin, AX: Amoksisilin, DO: Doksisisiklin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, FFC: Florfenikol, FLM: Flumequin, T: Oksitetrasiklin, TS: Trimethoprim+Sülfafadiazine, STX: Trimethoprim+Sulfamethaksazol, D: Dirençli, OH: Orta Hassas, H: Hassas.

Tablo 14.(Devamı). Bakteri izolatlarına ait kemoterapotiklerin antimikrobiyel hassasiyet profilleri

İzolat kodu	Antibiyotik Diskleri									
	AM (10 µg)	AX (10 µg)	DO (30 µg)	ENR (5 µg)	E (15 µg)	FFC (30 µg)	FML (30 µg)	T (30 µg)	TS (30 µg)	STX (25 µg)
KO-17	D	D	H	H	D	D	H	D	D	D
KO-18	D	D	H	H	D	D	H	D	D	D
KO-19	H	H	H	OH	OH	OH	D	D	D	D
KO-20	D	OH	H	H	D	D	H	OH	H	OH
KO-21	H	H	H	OH	OH	OH	D	H	D	D
KO-22	D	D	H	H	D	H	H	OH	H	H
KO-23	D	D	H	H	D	OH	H	H	H	H
KO-24	D	D	H	OH	D	D	H	D	D	D
KO-25	D	D	H	OH	D	D	H	D	D	D
KO-26	D	D	H	H	D	D	H	H	H	H
KO-27	D	D	H	OH	D	D	OH	D	OH	H
KO-28	H	H	H	H	D	H	H	OH	D	D
KO-29	D	D	H	H	D	D	OH	D	H	H
KO-30	D	D	H	H	D	D	H	OH	D	D
KO-31	D	D	H	OH	D	D	H	OH	H	H
KO-32	D	D	H	H	D	D	H	D	H	H
KO-32	D	D	H	H	D	D	H	D	H	H
KO-33	D	D	H	OH	D	H	OH	D	H	H
KO-34	D	D	OH	OH	D	H	OH	D	H	H
KO-35	D	D	H	OH	D	H	D	H	H	H
KO-36	D	D	H	H	D	H	H	H	H	H
KO-37	D	D	H	H	D	H	H	H	H	H
KO-38	D	D	H	H	D	H	H	D	H	H
KO-39	H	H	H	OH	D	OH	H	D	OH	D
KO-40	D	D	H	H	D	D	D	OH	H	OH
KO-41	D	D	D	OH	D	D	OH	D	D	D
KO-42	H	OH	H	OH	D	H	H	H	H	H
KO-43	D	D	H	OH	D	OH	H	D	H	H
KO-44	D	D	H	OH	D	D	H	D	D	D

AM: Ampisilin, AX: Amoksisilin, DO: Doksisiklin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, FFC: Florfenikol, FLM: Flumequin, T: Oksitetrasiklin, TS: Trimethoprim+Sülfafadiazine, STX: Trimethoprim+Sulfamethaksazol, D: Dirençli, OH: Orta Hassas, H: Hassas.



Şekil 13. Hastalık vakalarından izole edilen bakterilerin kemoterapotik maddelere karşı oluşturduğu toplam direnç miktarları (%) (Orijinal)

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç ve Tartışma

Borçka Baraj Gölünde kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı işletmelerinde özellikle su sıcaklığının 15-22°C ulaştığı yaz mevsiminde kafeslerdeki hastalık olgularından izole edilen *L. garvieae*'nin daha çok porsiyonluk ve üzeri balıklarda şiddetli ölümlere (%60-80) ve ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Balta ve Dengiz Balta, 2019; Eldar vd., 1999, Diler vd., 2002).

Borçka Baraj Gölü kafeslerindeki hastalıklı balıklarda genellikle ilk fark edilen hastalığın tipik semptomları olan; balıklarda durgunluk, iştahsızlık, yüzme bozuklukları, tek veya çift taraflı ekzoftalmus, yüzgeç tabanlarında, burun ve göz çevresi ile çene altında hemorolojiler olduğu tespit edilmiştir. Hastalıklı balıklara yapılan iç muayenelerde ise böbrek, karaciğer ve dalakta nokta vari hemorojiler mevcut, splenomegali (dalak büyümesi), hava kesesinin gergin ve üzerinin kanamalı olduğu; bağırsakların sarı renkte ve sıvı kıvamda bir içerikle dolu olduğu görülmüştür. Bu semptomlar daha önceki çalışmalarda bildirilen semptomlara benzerkik göstermiştir (Balta vd., 2019; Durmaz vd., 2015).

Fakültemizin Hastalık Laboratuvarına Doğu Karadeniz Bölgesindeki Artvin İlinin Broçka İlçesinde bulunan Borçka Baraj Gölünde Kuzuoğlu AŞ ait 7 farklı gökkuşağı alabalık çiftliklerinden değişik tarihlerde hastalık belirtileri olan (iştahsız, deride siyahlaşma, yüzme bozukluğu olan, gözde tek veya çift taraflı ekzolftmus olan) hastalık vakalarından balık örnekleri gönderilmiştir. Balıklarda tipik hastalık belirtisi olanlar seçilerek böbrek ve dalaklarından izole edilen 44 adet bakteri izolatlarına geleneksel testler, kok olanlara api 20 strep testi ve tüm izolatlara PZR testi uygulayarak tür düzeyinde tanımlanmaya çalışılmıştır. Api 20 strep test sonuçlarını karşılaştırmak için bir adet referans suşu (ATCC43921) kullanılmıştır. Api 20 strep testine göre test edilen izolatların çoğunluğu 7143111 ve 7143511 profili gösterdiği belirlenmiştir. Bakteri izolatlarının 25°C'deki api 20 strep profili 7143551, 7143153, 5173111, 7373751, 5373551, 7143751, 5354571 ve 5355571 olarak tespit edilmiştir. Referans şusun ise api 20 strep testinde 7143151 profili göstermiş olduğu tespit edilmiştir. Halbuki, api web sisteminde referans suşun (ATCC43921) api 20 strep test

profili değerlendirildiğinde *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*'e %82,7 ve *Enterococcus faecium*'a %9,8 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Referans suş ile sadece birebir uyuşan bir izolatın (D-372) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda ortaya konulan API 20 strep test sonuçlarının api profili internet ortamından api web sisteminden karşılaştırılarak belirlenmiştir. İzolatlara ait api profili ve benzerlik oranı yüzde olarak Tablo 13'de verilmiştir.

Bakterilerin tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testler organizmanın fizyolojik profili üzerine oldukça önemli bilgiler sunmasına karşın mikroorganizmayı tür seviyesinde tanımlamada yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma referans suşun bile *Lactococcus garvieae* olarak API 20 strep testi ile doğru tanımlanmadığını ve API web sisteminde *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*'e %82,7 ve *Enterococcus faecium*'a %9,8 oranında benzerlik göstermesi ile hatalı sonuç vermiştir. Bu nedenle bu sistemlerle tanımlamanın doğru yapılamayacağı kanısına varılmıştır. Bu da bize doğru tanımlamanın yapılabilmesi için genetik düzeyde çalışmanın yapılması gerektiğini göstermektedir.

Genetik çalışmalar sonucunda gen banka yüklenmiş *Lactococcus garvieae* genomik verilerinin analiz edildiği bir çalışmada ortalama nükleotid kimlik değerlerine dayandırılmış dört farklı grup veya alt grubun varlığını bildirmiştir (Kumru, 2021).

Tablo 15. Api 20 strep test kitinde kok izolatlarının api web sistemindeki benzerlikleri

İzolatlar	API profili	Benzerlik yüzdesi
KO-01	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-02	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-03	7143551	%62,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-04	7143153	%84,6 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-05	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-06	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-07	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-08	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-09	5173111	%67,3 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-13	7373751	%74,4 <i>Enterococcus faecium</i>
KO-18	5373551	%94,9 <i>Enterococcus faecium</i>
KO-19	5373551	%94,9 <i>Enterococcus faecium</i>
KO-20	7143151	%82,7 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
KO-21	7143751	%92 <i>Enterococcus faecalis</i>
KO-22	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
KO-25	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
KO-26	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
KO-33	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
Ref.	7143151	%82,7 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>

L. garvieae'nin fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada Türkiye'nin muhtelif bölgelerinden farklı zamanlarda izole edilmiş 22 farklı *L. garvieae* izolatının fenotipik olarak 3 farklı profil oluşturdukları (Şekil 14) API Rapid ID 32 Strep ile belirtilmiştir (Önalın vd., 2016).

Borçka Baraj Gölü üzerinde kurulu Deriner Baraj Gölünde "Deriner Baraj Gölünde Balık Faunasının Bakteriyel ve Paraziter Patojenler Açısından Araştırılması" Yüksek Lisans Tez çalışmasından elde edilen *Aeromonas hydrophila*, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *Carnobacterium maltaromaticum* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerin varlığı benzerlik göstermiş, fakat *Yersina ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* etkeninin izole edilemediği bildirilmiştir (Düzgün, 2015). Bu tez çalışmasında *Lactococcus garvieae* ve *Yersina ruckeri* izole edildiği tespit edilmiştir. "Kürtün Baraj Gölü'nde Bakteriyel ve Paraziter Balık Patojenlerinin Araştırılması" isimli başka bir Yüksek Lisans Tez çalışmasında *Aeromonas hydrophila*, *A. media*, *A. salmonicida*, *A. sobria*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens* ve *Yersina ruckeri* bakterileri benzerlik göstermiştir (Bingöl, 2018). Bu çalışmada diğer iki yüksek lisans tez çalışmasından farklı olarak *Enterococcus* sp., *Lactococcus garvieae* ve *Lactococcus petauri* cinsi bakteriler izole edilmiştir.

Gökkuşığı alabalıklarından elde edilen izolatların antimikrobiyal ajanlara direnç ve hassasiyetlerini belirlemek için yapılan test sonucuna göre tüm izolatların izolatlarına karşı ampisiline %81,81, amoksisilinin 72,27, eritromisine 86,36 ve florfenikolun %54,55, oksitetrasiklin ve tribressen %47,73 dirençli olduğu tespit edilmiştir. Doksisisiklinin %86,36, flumequin 56,82, enrofloksasin %50 ve Trimethoprim+Sülfafadiazine tesirli olduğu tespit edilmiştir.

Borçka Baraj Gölündeki bu işletmelerde kültürü yapılan gökkuşığı alabalıkları intraperitoneal yolla üçlü (*Lactococcus garvieae*+*Yersinia ruckeri*+*Vibrio anguillarum*) yağ bazlı karma aşı ile aşılmasına karşın yinede hastalık etkenlerin ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu tez çalışması sonuçlarına göre önemli balık patojenlerin varlığının yanı sıra insan patojeni olan bazı farklı bakteriyel ajanların tespit edilmiştir.

4.2. Öneriler

Tez çalışması sonucunda insan patojeni olan bakteriler ilk kez balıklardan izole edilmiştir. Yeni tespit edilen insan kaynaklı bu hastalık etkeni bakterilerin balıklarda patojen olup olmadığı araştırılmalıdır. Bu patojenlerin zoonos olup olmadığı araştırılmalıdır. Bu hastalık etkenlerinin yeni yapılacak çalışmalar ile takip edilip yeni enfeksiyonların meydana gelip gelmeyeceği takip edilmelidir. Bakterilerin birçok hastalık etkenlerine karşı dirençli bakteriler olduğundan hastalıklarla mücadelede aşı kullanımının ön plana çıkarılması gerektiği düşünülmüştür.

Sürdürülebilir gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği için yeni aşı çalışmalarının yapılması gerektirir. Yem kalitesinin artırılmalı ve yemlere immün sistemi destekleyen vitaminlerin ilave edilmelidir.

Hastalık etkeni olan bakteriyel patojenlerin sınırlandırılması için farklı bölgelerden yeni balık nakilleri önlenmelidir.

Gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bakteriler antibiyogram test sonuçlarına göre bakterilere dirençin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle kuluçkahanelerden baraj gölüne gelecek olan balıkların patojen yönünden kontamine olmaması önemlidir. Balık nakillerinin dikkatli yapılması ve kontaminasyon yollarının iyi denetlenmesi baraj gölünde sürdürülebilir üretimi için gereklidir.

Bu tez çalışması bakteriyel balık patojenleri yönünden çalışmış olup, viral ve paraziter patojen enfeksiyonların araştırılması gerçekleştirilmelidir.

Bakterilerin tür tanımlamasında en fazla kullanılan yöntemlerin başında geleneksel biyokimyasal ve fiziksel testler gelmektedir. Geleneksel biyokimyasal testlerin yanı sıra API hızlı test kitleri de kullanılmakta olup hatalı tanımlamalara neden olmaktadır. PZR test sonuçlarına göre yapılan moleküler düzeyde yapılan analizlerde de yanlış isimlendirilme mevcuttur. Bu nedenle moleküler çalışmaların tüm genom düzeyinde gerçekleştirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Balık üretim çiftliklerinde ekonomik kayıpların başında hastalık etkenleri gelmektedir. Balık ölümlerine neden olan etkenlerin hızlı ve doğru tanımlanmasının yanı sıra doğru tedavinin yapılması sürdürülebilir üretimi desteklenmesi açısından önemlidir.

Tedavide kullanılacak antibiyotiklerin gelişi güzel kullanılması bakteriyel patojenlere karşı antibiyotiklere direnç oluşturması ve etkisini azaltılmasının önüne geçilebilir.

Balıklarda antibiyotik kullanımı sıklığı balık etinde antibiyotik kalıntısı (rezidü) problemlerini önlemek için aşı kullanımı ve geliştirme çalışmalarının desteklenmesi önemlidir.

İlaç kullanımı balık patojenlerinde direnç şekillenmesine neden olduğu gibi aynı zaman da akuatik ortamdaki bakteriler transfer edilebilir genlerle aktırılabilir. Bu da baraj göllerinde üretimin sürdürülebilirliğini engellemektedir. Akuatik ortamda H₂S üreten bakterilerin ortama hâkim olması su kalitesinin bozulmasından kaçınılmalıdır. Bu problemler göz önüne alınarak yeni bilimsel çalışmaların yapılarak baraj göllerinde üretimin sürdürülebilir olması desteklenmelidir.

KAYNAKÇA

- Akaylı, T. ve Timur, G. (2004). Yavru alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) *Pseudomonas* sepsisemisi üzerinde bir çalışma. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 30(1), 121-131.
- Akbulut, S. ve Keten, A. (2001). Düzce Yöresindeki Alabalık Yetiştiriciliği Üzerine Bir Çalışma. *Turkish Journal of Forestry*, 2(1), 49-60.
- Akinbowale, O.L., Peng, H. and Barton, M.D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1103-1113.
- Altınok, İ., Kayış, S. and Çapkın, E. (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 261, 850-855.
- Altınok, I., Balta, F., Çapkın, E. and Kayış, Ş. (2007). Diseases of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*. *Aquaculture*, 273(4), 393-297.
- Altınok, İ., Öztürk, R.Ç. & Türe, M. (2022). NGS analysis revealed that *Lactococcus garvieae* Lg-Per was *Lactococcus petauri* in Türkiye. *Journal of Fish Diseases*, 25(12), 1839-1843. <https://doi.org/10.1111/jfd.13708>
- Austin, B. and Austin, D.A. (1999). Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, UK, 1-85233-120-8.
- Avci, H., Aydoğan, A., Tanrikul, T.T. and Birincioglu, S.S. (2010). Pathological and Microbiological Investigations in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Naturally Infected with *Lactococcus garvieae*. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 16 (Suppl-B), 313-318.
- Avci, H., Birincioglu, S.S., Tanrikul, T.T., Epikmen, E.T., Metin, N. and Avsever, M.L. (2014). Experimental *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792: a comparative histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases*, 37, 481-495.
- Aydın, S., Gültepe, N. ve Çiltaş, A. (2005). Çanakkale İlindeki bir gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) işletmesinde *Pseudomonas* sp. enfeksiyonu. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 36(1), 39-43.
- Balta, F. (2016). Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio anguillarum*, isolated cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(10), 4393-4400.
- Balta, F. (2020). Fırtına Deresindeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinde izole edilen *Aeromonas* spp. İzolatlarının antimikrobiyel hassasiyetin belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(3), 397-407.

- Balta, F. and Dengiz Balta, Z. (2019a). The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(1), 27-33. <https://doi.org/10.35229/jaes.527258>
- Balta, F. and Dengiz Balta, Z. (2019b). Preparation of O-antigen from *Yersinia ruckeri* serotype O1 and use in the slide agglutination test. *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(3), 480-483. <https://doi.org/10.35229/jaes.645416>
- Balta, F. ve Dengiz Balta, Z. (2016). Deniz suyuna nakledilen gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen vibrio enfeksiyonu ve tedavisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 1(1), 14-20. <https://doi.org/10.35229/jaes.272222>
- Balta, F. ve Dengiz Balta, Z. (2017). Doğu Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşığı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64, 321-328.
- Balta, F. ve Yılmaz, H. (2019). Kültür Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* Enfeksiyonu. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 4(2), 104-110. <https://doi.org/10.35229/jaes.544439>
- Balta, F., Dengiz Balta, Z., Ozgumus, O.B. ve Çağırğan, H. (2016). Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*’nin portörlük yönünden tetkiki ve antimikrobiyal direncin tespiti. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 1(3), 72-76. <https://doi.org/10.35229/jaes.280741>
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S. and Ozgumus, O.B. (2010). Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30(6), 211-219.
- Bingöl, A. (2018). Kültür Baraj Gölü’nde Bakteriyel ve Paraziter Balık Patojenlerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 27s.
- Buller, N.B. (2004). Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals, A Practical Identification Manual. CABI Publishing Wallington Oxfordshire, UK.
- Burka, J.F., Hammell, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J. and Speare, D.J. (1997). Drugs in salmonid aquaculture—A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20(5), 333-349.
- Çağırğan, H. (2004). Biotyping of *Lactococcus garvieae* Isolated from Turkey. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(3-4), 267-269.

- Cai, Y., Yang, J., Pang, H. and Kitahara, M. (2011). *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(7), 1590-1594.
- Çelikkale, M.S. (2002). İç Su Balıkları ve Yetiştiriciliği (Cilt 1). *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi. Genel Yayın*, (124).
- Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E. & Okumuş, İ. (1999). Türkiye Su Ürünleri Sektörü Potansiyeli, Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. İstanbul Ticaret Odası, Yayın no: 1999-2.
- Chaires, A., Thomas, K., Estes, A.M. and Jozwick, A.K.S.(2022). Draft Genome Sequence of *Delftia tsuruhatensis* Strain 45.2.2, Colonizer of Zebrafish, *Danio rerio*, Skin Mucus. *Microbiol Resour Announc*, 11: e00666-22. <https://doi.org/10.1128/mra.00666-22>
- Collins, M.D., Facklam, R.R., Farrow, J.A. and Williamson, R. (1989). *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol Lett.*, 57(3), 283-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03350.x>, PMID: 2721919.
- Dengiz Balta, Z. (2010). Ani sıcaklık şoku uygulanmış Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811)'nda fizyolojik stres cevabın belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 48 s.
- Dengiz Balta, Z., Akhan, S. and Balta, F. (2017). The physiological stress response to acute thermal exposure in Black sea trout (*Salmo Trutta Labrax*, Pallas, 1814). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41, 400-406.
- Diler, O., Altun, S., Adiloglu, A.K., Kubilay, A. and Isikli, B. (2002). First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 22(1), 21-26.
- Doğan, K. (2002). Su ürünleri sektörünün tarım sektörü içindeki yeri ve önemi. Tarım, İstanbul TKB İstanbul İl Müdürlüğü Yayın Organı, İstanbul, Türkiye, 80, 8-12.
- Dolgun, O. (2015). Gökkuşığı alabalıklarından *Lactococcus garvieae* identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
- Duman, M., Mulet, M., Altun, S., Satıcıoğlu, I.B., Özdemir, B., Ajmi, N., Lalucat, J. and García-Valdés, E. (2021). The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey. *Aquaculture*, 535, 736369, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736369>
- Durmaz, Y. ve Kılıçoğlu, Y. (2015). Bir Alabalık Çiftliğinde Doğal Enfekte Gökkuşığı Alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) *Lactococcus garvieae*'nin Kültür ve PCR ile Saptanması ve Etkenin

Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10(2).

- Düzgün, A. (2015). Deriner Baraj Gölünde Balık Faunasının Bakteriyel ve Paraziter Patojenler Açısından Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 34s.
- Elbek, A.G. ve İşgören, D. (1992). Türkiye’de Su Ürünleri Yetiştiriciliği Sektöründe Makro Planlama Gereksinimi. *Ege Üni. Su Ürünleri Dergisi*, 9, 215-235.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier, H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1005-1008.
- Guijarro, J.A., Cascales, D., García-Torrico, A.I., García-Domínguez, M. and Méndez, J. (2015). Temperature-dependent expression of virulence genes in fish-pathogenic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 700.
- Haghighi, M. (2021). Introduce of *Pseudomonas psychrophila*, as a new pathogen causing disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 8(1), 65-75.
- Kayış, S., Çapkın, E., Balta, F. and Altınok, İ. (2009). Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey – A Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh* 61(4):339-344.
- Kav, K. ve Erganiş, O. (2007). Konya bölgesinde bulunan gökkuşağı alabalığı (*Onchyrnus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi. Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 23(1), 7-17.
- Kılıç, A., Şeker, E., Özcan, M. and İspir, Ü. (2007). Bacterial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in farms in Elazığ region. *Science and Engineer Journal of Fırat University*, 19(2), 129-132.
- Koort, J., Coenye, T., Vandamme, P., Sukura, A. and Björkroth, J. (2004). *Enterococcus hermanniensis* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54(5), 1823-1827. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.63112-0>, PMID: 15388750.
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırcan, Ş. ve Sekkin, S. (2004). Gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. *Vet. Hek. Dern. Derg.*, 75, 47-53.
- Kumru, S. (2021). *Lactococcus garvieae*'nin Genomik Yaklaşımlarla Çeşitliliği ve Antimikrobiyal Direnci. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 6(4), 506-513. <https://doi.org/10.35229/jaes.894280>

- Kumru, S., Dengiz Balta, Z., Aliu, H., & Balta, F. (2024). Identification of Enterococcus Species Isolated from Commercial Fish Feeds and Infected Fish Specimens. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 75(2), 7523-7530. <https://doi.org/10.12681/jhvms.35199>
- Lévesque, S., Longtin, Y., Domingo, M.C., Massé, C., Bernatchez, H., Gaudreau, C. and Tremblay, C. (2016). *Enterococcus pallens* as a potential novel human pathogen: three cases of spontaneous bacterial peritonitis. *JMM Case Rep.* 23; 3(1):e005024. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005024>
- Liao, C.H. (2006). Chapter 19 - *Pseudomonas and related genera*. Editor(s): Clive de W. Blackburn. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Food Spoilage Microorganisms, Woodhead Publishing, Pages 507-540.
- Loch, T.P., Kumar, R., Xu, W. & Faisal, M. (2011). *Carnobacterium maltaromaticum* infections in feral *Oncorhynchus* spp. (Family Salmonidae) in Michigan. *The Journal of Microbiology*, 49(5), 703-713. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0527-1>
- Loch, T.P. and Faisal M. (2015). Polyphasic characterization reveals the presence of novel fish-associated *Chryseobacterium* spp. in the Great Lakes of North America. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113, 113-125.
- Jung, W.J.; Kim, S.G.; Giri, S.S.; Kim, S.W.; Kang, J.W.; Kwon, J.; Oh, W.T.; Lee, S.B.; Lee, Y.M.; Jo, S.J.; et al. (2022). The Opportunistic Pathogen *Chryseobacterium balustinum* WLT: Pathogenicity and Antibiotic Resistance. *Fishes*, 7, 26. <https://doi.org/10.3390/fishes7010026>
- Munro, A.L.S. (1982). The Pathogenesis of bacterial diseases of fishes. (in) Microbial Disease of Fish. RJ Roberts (Editor), Academic Press, London, UK. 131-149.
- Önalın, Ş. (2019). Expression differences of stress and immunity genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) with different bacterial fish diseases. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 71(1).
- Önalın, Ş., Arabacı, M. (2016). Van, Bitlis, Muş ve Hakkari illerinde bulunan gökkuşuğı alabalığı çiftliklerinden elde edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarının fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Önalın, Ş., Arabacı, M. and Çağırgan, H. (2020). Phenotypic Differences between *Lactococcus garvieae* Isolates Obtained from Rainbow Trout Farms in Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 52(5).
- Önalın, Ş. and Çevik, M. (2020). Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Biology*, 80, 934-942.

- Özer, S., Demirel, M., Us, M. and Yıldırım, S. (2008). Microbial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) hatcheries in Çağlarca, province Mersin-Turkey. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 2(3), 261-271.
- Ranc, A., Dubourg, G., Fournier, P.E., Raoult, D. and Fenollar, F. (2018). *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen. *Emerging Infectious Diseases*. 24(3), 594-596. <https://doi.org/10.3201/eid2403.160939>
- Roberts, J.R. ve Shepherd, J.C. (2001). Alabalık ve Salmon Hastalıkları. Yücel Ofset Matbaacılık Turizm San. Ve Tic. Ltd.Şti 1. Baskı, ISBN: 975-94467-2-3, 254s., Vatansever, H. (Çeviri), 1-85.
- Saticioglu, I.B., Altun, S. & Duman, M. (2020). Phenotypic, Phylogenetic Characterization and Antimicrobial Susceptibility Determination of *Chryseobacterium piscicola* Isolates Recovered from Diseased Rainbow Trout. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(4), 624-629. <https://doi.org/10.35229/jaes.808537>
- Saticioglu, I.B., Onuk, E.E., Ay, H., Ajmi, N., Demirbas, E. & Altun, S. (2023). Phenotypic and molecular differentiation of *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri* isolated from trout. *Aquaculture*, 577, 739933, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739933>
- Sebastião, F.d.A., Loch, T.P., Marancik, D.P., Griffin, M.J., Maret, J., Richey, C. & Soto, E (2019). Identification of *Chryseobacterium* spp. isolated from clinically affected fish in California, USA. *Dis Aquat Org* 136, 227-234. <https://doi.org/10.3354/dao03409>
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. and Larsen, J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4908-4915.
- Smith, S.A., Newman, S.J., Harrison, C.E. and Loch, T.P. (2023). First isolation of *Carnobacterium maltaromaticum* from farmed Rainbow Trout in Virginia. *Journal of Aquatic Animal Health* 35(1), 3-10. <https://doi.org/10.1002/aah.10176>
- Tanrikul, T.T. (2007). Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(10), 1733-1737.
- Timur, G., Yardımcı, R., Ürkü, Ç. ve Çanak, Ö. (2011). Marmara Bölgesi Kültür Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, L.) Lactococcosis'in Bakteriyolojik Ve Histopatolojik Metodlarla Teşhisi. *Aquatic Sciences and Engineering*, 26(2), 63-81.

- URL-1, (2022). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2022-49678> (23 Temmuz 2024).
- URL-2, (2021). <https://www.flyfisherman.com/editorial/all-about-rainbow-trout/454217>. (23 Temmuz 2024).
- URL-3, (2022). https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&anchorLocation=SubordinateTaxa&credibilitySort=TWG%20standards%20met&rankName=Subspecies&search_value=957445&print_version=SCR&source=from_print#SubordinateTaxa (11.03.2022).
- URL-4, (2021). <https://microbiologylabnotes.blogspot.com/2019/03/gram-boyama.html> (15.10.2021).
- Woo, P.T. and Bruno, D. W. (2003). Fish Disease and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.
- Yıldırım, Ö. & Çantaş, İ.B. (2022). Türkiye’de Gökkuşaağı Alabalığı yetiştiriciliğinin üretim ve ekonomik göstergelerinin incelenmesi. *Acta Aquatica Turcica*, 18(4), 461-474. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1101098>
- Yılmaz, C. (2011). Alabalık Yetiştiriciliği Elazığ İl Tarım Müdürlüğü. Ceren Ofset 2011 Elazığ. Genişletilmiş 2. Baskı 216s. 5-113.
- Zamora, L., Vela, A.I., Palacios, M.A., Domínguez, L. and Fernández-Garayzábal, J.F. (2012). First isolation and characterization of *Chryseobacterium shigense* from rainbow trout. *BMC Veterinary Research*, 8:77, 1-5.