

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*)
İZOLE EDİLEN *Lactococcus* spp. İZOLATLARININ API 20 STREP
TESTİ İLE TANIMLANMASI

Muhammed YAĞMUR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fikri BALTA

JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Bülent VEREP

Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN

RİZE-2022

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE EDİLEN
***Lactococcus* spp. İZOLATLARININ API 20 STREP TESTİ İLE**
TANIMLANMASI

Prof. Dr. Fikri BALTA danışmanlığında, Muhammed YAĞMUR tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından 11/03/2022 tarihinde Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Fikri BALTA	
Üye	: Prof. Dr. Bülent VEREP	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ÖNALAN	

Doç. Dr. Ahmet YANIK
ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasının konusu “Gökkuşuğu Alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilen *Lactococcus* spp. izolatlarının API 20 strep testi ile tanımlanması” olarak belirlenmiştir. Tipik hastalık semptomları gösteren balıklardan elde edilen patolojik bakterilerin tanımlanması amacıyla farklı teknikler kullanılmaktadır. Moleküler, histolojik ve serolojik yöntemler dışında özellikle biyokimyasal metotlar oldukça yaygındır. Biyokimyasal tanımlamada gram pozitif olan bakteriler için API 20 strep tanımlama kiti kullanılmaktadır. Bu kitin kullanımında inkübasyon sıcaklığındaki farklılıklar, bakteri üreme problemleri gibi sorunlar nedeniyle hatalı sonuçlar oluşabilmektedir. Sunulan bu tez çalışması ile bu hataların giderilmesi ve balıklardan izole edilen türlerin tanımlanabilmesi için kullanılan API 20 strep testinin standardizasyonun sağlanması amaçlanmıştır.

Balık yetiştiriciliğinde hastalık etmenlerinin gerek sucul ortam gerek ise yoğun stoklamadan dolayı kolay yayılım göstermesi toplu ölümlere sebebiyet vermektedir. Ülkemizde kültürü yapılan gökkuşuğu balığında sürdürülebilir üretim sağlamak için hastalık etmenlerin doğru ve hızlı tanımlanması bu sektördeki hastalık baskınının etkisini azaltılmasında önemli bir faktör olacaktır. Böylece, ekonomik kayıpların önüne geçilebilecektir.

Yüksek lisans tez çalışmalarım esnasında bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fikri BALTA 'ya ve bu süreçte manevi desteklerinden dolayı değerli meslektaşım Sayın Kağan BUZ'a ve arkadaşım Didem Ayça KARAGÖZ'e, Annem Nazmiye YAĞMUR, Babam Yusuf YAĞMUR'a ve kardeşlerim Veysel YAĞMUR, Gülümser YAĞMUR, Yüksel YAĞMUR Nursel YAĞMUR ve M. Kemal YAĞMUR'a teşekkür ederim. Ailemize yeni katılarak hepimize mutluluk veren yeğenim Filipp Can YAĞMUR' ithaf olunur.

Muhammed YAĞMUR

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “Gökkuşağı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilen *Lactococcus* spp. izolatlarının API 20 strep testi ile tanımlanması” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 11/03/2022

Muhammed YAĞMUR

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

ÖZET

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE EDİLEN *Lactococcus* spp. İZOLATLARININ API 20 STREP TESTİ İLE TANIMLANMASI

Muhammed YAĞMUR

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışmanı: Prof. Dr. Fikri BALTA

Doğu Karadeniz Bölgesindeki 6 farklı gökkuşağı alabalık işletmesinden 2019-2021 yılları arasında kok enfeksiyonu şüphesi ile Fakültemiz Hastalıklar Laboratuvarına getirilen gökkuşağı alabalık örneklerinden izole edilen bakteri izolatları bu tez çalışmasında kullanıldı. Bu tez çalışması kapsamında alabalık üretim çiftliklerinden laboratuvara gönderilen tipik hastalık semptomları gösteren balık numunelerinden izole edilen bakteri 25 izolatı kullanıldı. Hastalık etkenlerin tanımlanmasında moleküler, histolojik ve serolojik yöntemler dışında özellikle biyokimyasal metotlar oldukça yaygındır. *Lactococcus garvieae* bakterisi son yıllarda gökkuşağı alabalıklarından izole edilen ve tanımlamada bazı hataların yapıldığı bir türdür. Biyokimyasal tanımlamada gram pozitif olan bu bakteri için API 20 Strep tanımlama kiti kullanılmaktadır. Bu kitin kullanımında inkübasyon sıcaklığındaki farklılıklar, bakteri üreme problemleri gibi sorunlar nedeniyle hatalı sonuçlar oluşabilmektedir. Bu tez çalışmasında API 20 Strep testi yapılan izolatların çoğunluğu 7143111 ve 7143511 profili gösterdiği görüldü. Referans suşu ile birebir uyuşan bir izolatın (D-372) olduğu tespit edilmiştir. Gökkuşağı alabalıklarından elde edilen izolatların antimikrobiyal ajanlara direnç ve hassasiyetlerini belirlemek için disk diffüzyon yöntemi ile antibiyogram testi uygulanmıştır. Yapılan test sonucuna göre tüm izolatların Sulfamethoksazol ve Streptomisin'e %100 dirençli olduğu gözlenmiştir. *Lactococcus* spp. izolatlarına karşı Amoksisilinin %100, Doksisiklinin %76, Florfenikolun %64 tesirli olduğu gözlemlendi.

2022, 38 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Lactococcus garvieae*, API 20 Strep, Antibiyogram testi.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *Lactococcus* spp. STRAINS, ISOLATED FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*), BY API 20 STREP TEST

Muhammed YAĞMUR

**Recep Tayyip Erdogan University
Graduate Education Institute
Department of Fisheries
Master Thesis
Supervisor: Prof. Dr. Fikri BALTA**

Bacterial isolates isolated from rainbow trout samples brought to the Diseases laboratory of our Faculty between 2019-2021 from 6 different rainbow trout farms in the Eastern Black Sea Region were used in this thesis study. Within the scope of this thesis, 25 bacterial isolates isolated from fish samples showing typical disease symptoms sent to the laboratory from trout farms were used. Apart from molecular, histological and serological methods, especially biochemical methods are quite common in the identification of disease agents. *Lactococcus garvieae* is a species that has been isolated from rainbow trout in recent years and some mistakes have been made in its identification. API 20 Strep identification kit is used for this gram positive bacteria in biochemical identification. In the use of this kit, erroneous results may occur due to problems such as differences in incubation temperature and bacterial growth problems. In this thesis study, it was seen that the majority of isolates tested for API 20 Strep showed 7143111 and 7143511 profiles. It was determined that there was an isolate (D-372) that exactly matched the reference strain. In order to determine the resistance and susceptibility of isolates obtained from rainbow trout to antimicrobial agents, antibiogram test was applied by disc diffusion method. According to the test results, it was observed that all isolates were 100% resistant to Sulfamethoxazole and Streptomycin. It was observed that Amoxicillin was 100%, Doxycycline 76%, Florfenicol 64% effective against *Lactococcus* spp. isolates.

2022, 38 pages

Keywords: *Lactococcus garvieae*, API 20 Strep, Antibiogram test

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Balık Hastalıkları	3
1.2.1. Bakteriyel Balık Hastalıkları	4
1.2.2. <i>Lactococcus</i> spp.....	5
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	8
2.1. Materyal.....	8
2.1.1. Balık Örnekleri	8
2.2. Metod.....	9
2.2.1. Hastalık Etkeninin İzolasyonu	9
2.2.2. Hareket Muayenesi.....	11
2.2.3. Katalaz Testi.....	11
2.2.4. Oksidaz Testi.....	12
2.2.5. Hemoliz Testi.....	12
2.2.6. Gram Boyama.....	13
2.2.7. Hastalık Etkeninin API 20 Strep Testi İle Tanımlanması.....	14
2.2.8. Antibiyogram Testi.....	15
3.BULGULAR.....	17
3.1. API 20 Strep Test Sonuçları.....	21
3.2. Antibiyogram Test Sonuçları.....	24
4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	26
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gökkuşağı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	2
Şekil 2. Kanlı agarda izole edilen <i>Lactococcus</i> spp. izolatlarından steril öze ile örnek alma.....	7
Şekil 3. Kanlı agarda alfa hemoliz gösteren <i>Lactococcus</i> spp. izolatının görünümü.....	13
Şekil 4. Gram Boyama uygulama aşamaları.....	14
Şekil 5. <i>Lactococcus</i> spp. izolatının Gram boyamadan sonraki mikroskop altındaki görünümü.....	14
Şekil 6. API 20 strep test kitlerine homojenize bakteri izolatların yerleştirildikten sonraki ilk görüntüsü.....	15
Şekil 7. Kok enfeksiyonu olan bir gökkuşağı alabalığının tipik dış görünümü	17
Şekil 8. Kok enfeksiyonlu bir gökkuşağı alabalığının iç organların görünümü.....	18
Şekil 9. <i>Lactococcus</i> spp. izolatlarının antibiyogram test sonuçlarına ait görüntü.....	18
Şekil 10. API 20 strep test kitindeki <i>L. garvieae</i> referans izolatının (ATCC43921) ayıraçlar dökülmeden önceki ve döküldükten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları.....	22
Şekil 11. API 20 Strep test kitlerine homojenize bakteri izolatların yerleştirildikten sonraki ilk görüntüsü ve 24 saat sonra ayıraçlar döküldükten sonraki oluşan görüntüsü.....	22
Şekil 12. API 20 Strep test kitlerine 24 saat sonra ayıraçlar döküldükten sonraki testin görüntüsü.....	22
Şekil 13. Hastalıklı alabalıklardan izole edilen <i>Lactococcus</i> spp. İzolatlarının antimikrobiyal direnç miktarları (%).....	25
Şekil 14. <i>L. garvieae</i> izolatlarının API Rapid ID 32 Strep testi sonucu biyokimyasal profil farklılıkları.....	28
Şekil 15. <i>L. garvieae</i> izolatlarının LCGL_0441 ve LCGL_0658 gen lokuslarındaki allellerinden elde edilen binomial veriler ile oluşturulan dendrogram.....	29

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Alabalık yetiştiriciliği 2019-2020 yıllarına göre üretim miktarının dağılımı....	1
Tablo 2. <i>Lactococcus</i> spp. taksonomik sınıflandırma.....	5
Tablo 3. Gökkuşaağı alabalıklardan tespit edilen bakteriyel izolatlara ait bilgiler.....	10
Tablo 4. Antibiyotik disk içerikleri ve inhibisyon disk çapı sınır değerleri.....	16
Tablo 5. <i>Lactococcus</i> spp. izolatlarına ait geleneksel fiziksel ve biyokimyasal testler..	19
Tablo 6. <i>Lactococcus</i> spp. izolatlarına uygulanan API 20 Strep testinin sonuçları.....	23
Tablo 7. <i>Lactococcus</i> spp. izolatlarının antibiyogram testi duyarlılık profilleri.....	24
Tablo 8. Bakteri izolatlarına ait API profillerin API wep sistemindeki benzerlik oranları.....	27

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

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

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Yeryüzündeki insan nüfusunun giderek artmasına paralel olarak gıda üretiminin de bu artışa paralel olarak artması gerekmektedir; aksi durumda ciddi bir gıda yetersizliği ile karşı karşıya kalınması kaçınılmazdır. Ülkeler buna istinaden mevcut gıda üretimini artırmak için modern üretim teknikleri geliştirmekte ve verimliliği artırarak kullanılan alanlardan maksimum üretim sağlamak için çalışmalarını sürdürmektedir. Hayvansal kökenli proteinlerin ülkemizde tüketiminin istenilen düzeyde olmadığı bilinmektedir. Balık eti içermiş olduğu besin değerleri açısından önemli bir hayvansal protein grubunu oluşturmaktadır. Ülkemizin, besleyici değeri yüksek hayvansal protein açığının kapatılması için balıkçılık ürünleri önemli bir kaynağı oluşturmaktadır (Doğan, 2002). Genel olarak ülkemizin iklimi ve ekolojik özellikleri balık üretiminin yapılabilmesi için oldukça uygundur. Alabalık yetiştiriciliği ülkemizin balık üretiminde önemli bir yere sahip olduğu rapor edilmiştir (Akbulut vd., 2001; Dolgun, 2015). Kuzey Amerika kökenli bir tür olan gökkuşağı alabalığı; adaptasyonunun ve yemden yararlanma oranının yüksek olması, suni yöntemlerle yumurta ve sperm sağımının kolaylığı, kuluçka süresinin kısalığı ve hastalıklara karşı dayanıklılığı gibi özellikleri nedeniyle ülkemiz yetiştiricileri tarafından tercih edilen bir tür olmuştur (Yılmaz, 2011). Ülkemizde iç sularda ve denizlerde üretimi yapılan alabalıkların 2019-2020 yıllarına göre artış miktarları Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK-2020) verileri baz alınarak hazırlanan Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Alabalık yetiştiriciliği 2019-2020 yıllarına göre üretim miktarının dağılımı (TÜİK 2020). (URL -1)

Yetiştiricilik alanı	Balık türü	2019	2020
İç su (Ton)	Alabalık (Gökkuşağı)	113678	126101
	Alabalık (<i>Salmo</i> sp.)	2375	1804
Deniz (Ton)	Alabalık (Gökkuşağı)	9411	18182
	Alabalık (<i>Salmo</i> sp.)	281	507

Türkiye’de modern üretim teknikleri kullanılarak yetiştiriciliği yapılan ilk balık türü gökkuşağı alabalığıdır. Ankara üniversitesi, Ziraat Fakültesi ve Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının girişimiyle ilk üretim denemeleri Konya Konuklar Devlet Üretim Çiftliğinde gerçekleştirilmiştir (Çelikkale vd., 1999). 1968 yılında Bilecik-Söğüt’te ilk özel alabalık çiftliği kurulmuştur (Elbek vd., 1992).

Salmonidae familyasından olan alabalıklar soğuk, berrak ve bol oksijenli göl, akarsularda yaşarlar. Genellikle ince uzun bir vücut yapısına sahip alabalıkların en ayırt edici özelliklerinden biri sırt yüzgeci ve kuyruk yüzgeci arasında bulunan adipoz (yağ) yüzgecidir (Şekil 1.) (Çelikkale, 2002). Alabalıklar karnivor (etçil) canlılar olup türlere göre değişen sayıda dişlerinin varlığı bildirilmiştir (Dolgun, 2015). Alabalıklar hayat evrelerini göre hayatlarının tamamını iç sularda geçirenler ve yaşamlarının bir bölümünü tatlı sularda, bir bölümünü de denizel ortamlarda sürdüren (Anadrom) olmak üzere iki gruba ayrıldığı bildirilmiştir (Çelikkale, 2002). Alabalıklar coğrafik kökenlerine göre Avrupa ve Kuzey Amerika olmak üzere iki gruba ayrılmış olup ülkemizde genel olarak Kuzey Amerika orjinli gökkuşağı alabalığının yetiştiriciliği yapıldığı rapor edilmiştir (Dolgun, 2015). Gökkuşağı alabalığı diğer alabalık türlerinde de olduğu gibi sırt tarafında bir adipoz yüzgeci bulunmaktadır. Dorsal yüzgecinde 10-12, anal yüzgecinde ise 8-12 yumuşak ışına sahip olup pul yapısı sikloid ve küçüktür. Bu balıklar yan taraflarında gökkuşağı görünümlü bir bant bulunmasıyla karakterize olmuş ve bu nedenle gökkuşağı alabalığı olarak isimlendirilmiştir (Yılmaz, 2011)



Şekil 1. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Anonim)(URL-2)

Balık yetiştiriciliğinde 1990 yılına kadar olan süreçte 15-20 bakteri türü hastalık etkeni olarak bildirilmiştir (Munro, 1982). Son yıllarda ise balıklardaki hastalık vakalarından 70 civarında bakteri türü hastalık patojeni olarak izole edildiği rapor edilmiştir (Woo vd., 2003).

Coğrafik olarak farklı özellik gösteren bölgelerde yapılan araştırmalarda gökkuşağı alabalıklarında bakteriyel hastalık etkeni olarak *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Streptococcus* spp., *Flexibacter* spp., *Yersinia* spp. tespit edilmiş olup bunlar içinde özellikle *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* ve *Lactococcus garvieae* hastalık etkenlerinin ciddi kayıplara yol açtığı bu araştırmalarda belirtilmiştir (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). Özellikle Doğu Karadeniz Bölgesinde kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarından farklı bakteriyel balık patojenleri izole edilmiştir. Mevsimsel olarak ani su sıcaklığı değişimlerin balıklarda stres nedeni olduğu ve immun sistemin baskılandığı bildirilmiştir (Dengiz Balta, 2010; Dengiz Balta vd. 2017). İmmun sistemi baskılanmış balıklarda bakteriyel hastalık etkenlerinin zaman zaman toplu ölümler meydana getirdiği ve bu ölümlere bağlı olarak büyük ekonomik kayıpların meydana geldiği rapor edilmiştir. Sürdürülebilir bir üretim için bakteriyel balık patojenlerin izole edilerek etkin tedavi ve kontrolün yapılmasının önemi farklı araştırmalarda vurgulanmıştır (Balta vd., 2016; 2017; 2019a; 2019b; Balta vd., 2016; Balta, 2016; 2020).

1.2. Balık Hastalıkları

Kültür balıklarının yetiştiriciliğinde oluşan belli başlı kayıplar; kimyasal zehirler, beslenme eksikliğine bağlı yetersizlikler veya üretim tekniklerindeki hatalar gibi bazı faktörlerden ileri gelebileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte en fazla kayıp oranlarına, patojen mikroorganizmaların sebebiyet verdiği hastalıklar nedeniyle olduğu rapor edilmiştir (Roberts vd., 2001).

Balıklarda hastalığın seyrini; konağın durumu, patojen mikroorganizmanın virülensi ve çevresel faktörler gibi bir dizi karmaşık koşulların etkilediği bir süreç olup bulaşıcı hastalık etkenleri su ürünleri üretimini sınırlayıcı bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Guijarro vd., 2015).

Balık hastalıkları, hastalıklara neden olan patojen mikroorganizmaların, etiyolojilerine göre birlikte sınıflandırılmaktadır. Birçok hastalığın etkeni birbirine yakın özellikler göstermekte olup akraba organizmalar tarafından meydana getirilirken, bu etkenlerin arasındaki farklılıkların doğru tespit edilmesi ile hastalığın tedavi süreçlerini olumlu etkileyeceği bir gerçektir. Hastalıkları meydana getiren patojen organizmaların orjinlerine göre; parazitik, bakteriyel, viral ve fungal olarak sınıflandırılmaktadır (Roberts vd., 2001).

1.2.1. Bakteriyel Balık Hastalıkları

Bakteriler çok küçük canlılar olup hızla çoğalma kabiliyetine ve gücüne sahip oldukları için çok fazla rastlanılan mikroorganizmalardır. Bazı bakteri türleri yoğurt yapımından antibiyotik elde edilmesine kadar geniş bir yelpazede insanlara fayda sağlamak için insanlar tarafından kullanılırken bazı bakteri türleri ise insanlarda ve hayvanlarda ciddi hastalıklar meydana getirebilmektedir (Roberts vd., 2001).

Bazı bakteri türleri de konakçı olarak balıkları seçmekte ve balıklarda hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır. İnsanlarda ve memeli hayvanlarda yaygın olarak bulunan bakteri türleri konakçıların öldürme gücüne sahipken, balıklarda birkaç bakteri türü haricindeki bakteri türleri ise çevre koşullarının olumsuz etkileriyle birlikte virülans özelliğini artırmakta ve balıklarda önemli ekonomik kayıplara neden olan hastalıkları meydana getirmektedir. Laboratuvar ortamlarında balıklarda bulunan bakterilerin teşhisi için enfekte olmuş balıkların solungaç ve iç organlarından uygun besi yerlerine ekim yapılarak bakterilerin izolasyonu ve gelişiminin incelenmesi gerekmektedir. Laboratuvar ortamında katı ve sıvı besi yerleri kullanılarak kolayca üretilen bakteriler, boyama metotları kullanılarak boyanabilmekte ve böylece ışık mikroskobu altında kolaylıkla tespit edilmektedir. (Roberts vd., 2001).

1.2.2. *Lactococcus* spp.

Tablo 2. *Lactococcus* spp taksonomik sınıflandırma (URL-3)

Alem: Bacteria
Alt Alem : Posibacteria
Şube : Firmicutes
Sınıf : Bacilli
Takım : Lactobacillales
Aile : Streptococcaceae
Genus: <i>Lactococcus</i>
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>
Alt Tür : <i>Lactococcus lactis lactis</i>
Alt Tür: <i>Lactococcus lactis tructae</i>
Tür : <i>Lactococcus piscium</i>
Tür : <i>Lactococcus plantarum</i>
Tür : <i>Lactococcus raffinolactis</i>

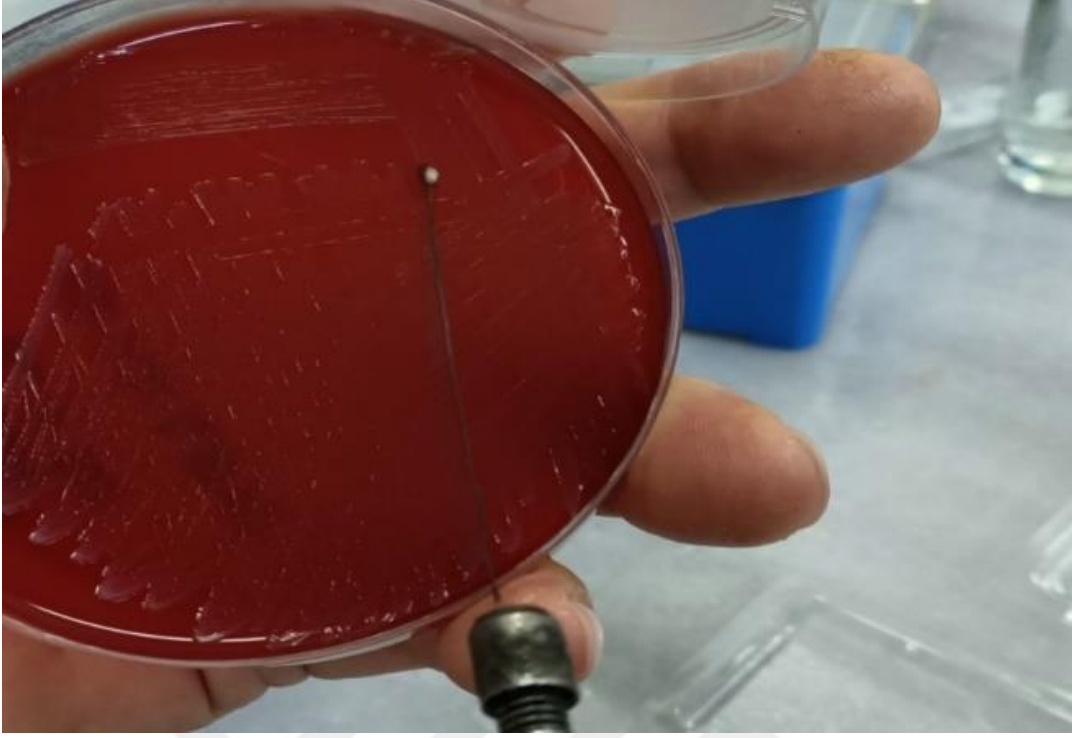
Lactococcus cinsi 7 türü kapsamakta olup (tablo 2.) bunlar içerisinde hastalık etkeni olarak tanımlanan tek tür *Lactococcus garvieae* 'dır. Balıklarda Laktokokkozis olarak bilinen hastalığın etkenidir (Cai vd., 2011). Buna karşın genetik çalışmalar sonucunda gen banka yüklenmiş *Lactococcus garvieae* genomik verilerinin analiz edildiği bir çalışmada ortalama nükleotid kimlik değerlerine dayandırılarak dört farklı grubun veya alt grubun varlığından bahsedilmiştir. (Kumru, 2021).

L. garvieae oval, sporsuz, hareketsiz, kapsüllü ya da kapsülsüz olabilen 0,7-1,4 µm çaplarında gram pozitif bir bakteri olup sıvı besi yerlerinde kısa zincirler, kanlı agarda alfa hemoliz, katı besi yerlerinde gri veya beyaz renkli koloniler oluşturan fakültatif anaerob (oksijensiz solunum) bir bakteridir (Kav vd., 2007; Timur vd., 2011).

Ülkemizde laktokokozis hastalığının etkeni olan *Lactococcus garvieae* ilk kez Ege Bölgesindeki bir gökkuşağı alabalığı üretim çiftliğinde 2001 yılında görüldüğü bildirilmiştir (Diler vd., 2002). Bu hastalık özellikle su sıcaklığının 15-22°C ye ulaştığı yaz aylarında %60-80'lere varan ölümler nedeni ile önemli ekonomik kayıplara neden olduğu rapor edilmiştir (Balta vd., 2019; Eldar vd., 1999; Diler vd., 2002,).

Yapılan çalışmalarda hastalıklı balıkların yem almadıkları, sersem bir şekilde su yüzeyinde durdukları, yüzmede anormallik, gözün korneasında konjesyon (kan birikmesi), solungaç lamellerinde kanama, yüzgeçlerin tabanında, burun - göz çevresi ile çene altında, dalak, böbrek, ve karaciğerde nokta vari hemorajiler, splenomegali (dalak büyümesi), hava kesesinin şişkin ve yangılı olduğu, bağırsaklarında sarımtırak bir içerikle dolu olduğu rapor edilmiştir (Balta vd., 2019; Durmaz vd, 2015).

Ülkemiz sularında yaygın olarak kültürü yapılan gökkuşağı alabalıklarında su sıcaklığının arttığı yaz dönemlerinde toplu ölümlere sebebiyet veren kok hastalığının etkeni olabileceği düşünülen *Lactococcus* spp. izolatları; Doğu Karadeniz Bölgesindeki 6 farklı gökkuşağı alabalığı çiftliklerinde ortaya çıkan değişik zaman aralıklarındaki hastalık vakalarından fakültemiz hastalık laboratuvarına getirilen örnekler arasından tespit edilerek kullanıldı. Hastalıklı balıkların iç organlarından (Böbrek ve Dalak) TSA'ya ekimler yapıldı ve 20°C'de inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılan TSA'da saf kültürler halinde üreyen kolonilerden %5 koyun kanı içeren kanlı agar besi yerlerine ekimleri yapıldı. Bakterilerin hemoliz oluşturup oluşturmadığı kontrol edildi. Kanlı agarda elde edilen saf kültürden elde edilen etkenlere API 20 strep test kitleri kullanılarak biyokimyasal testleri yapıldı.



Şekil 2. Kanlı agarda izole edilen *Lactococcus* spp. izolatlarından streil öze ile örnek alma (Orijinal).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Balık Örnekleri

Doğu Karadeniz Bölgesindeki 6 farklı gökkuşağı alabalık işletmesinden 2019-2021 yılları arasında kok enfeksiyonu şüphesi ile Fakültemiz Hastalıklar Laboratuvarına getirilen hastalıklı gökkuşağı alabalıklarından izole edilen bakteri izolatları bu çalışmada kullanıldı. Genellikle su sıcaklığının arttığı yaz aylarında kok enfeksiyonu şüphesi ile laboratuvara balık örnekleri daha fazla gönderildi.

Laboratuvara getirilecek hasta balıkların örneklenmesinde hastalıktan ölenlerle aynı semptomu gösteren balıkların getirilmesine istenildi. Özellikle halsiz ve iştahsız, renkte kararma, gözlerde çift taraflı ekzofthalmus, gibi semptomlar gösteren balıkların seçilmesine özen gösterilmesi üreticiden talep edildi. Her örneklemede havuzlardan hastalık belirtisi gösteren en az 10'ar adet balık örneklenmesi ve özellikle ölmek üzere olan gökkuşağı alabalıkların laboratuvara gönderilmesi gerektiği üreticiye bildirildi.

Hastalık vakası çıkan gökkuşağı alabalık işletmelerin her birindeki havuz veya kafeslerden en az 10 balık seçilmesi talep edildi. Çalışma süresince laboratuvara 13 kez hastalıklı balık örneği getirildi. Tez çalışması süresince toplam 250 adet balık muayene edildi. Ekim sonucu her havuz veya kafeslerden üreyen kok etkenleri için bir izolat numarası verildi. Alınan örneklere yapılan nekroskopi incelemelerinde iç organlarda kanamalar, karaciğerde renk değişimleri, karaciğerde ve plorik çekumda peteşiel kanamaların olduğu gözlemlendi.

2.2. Metod

2.2.1. Hastalık Etkeninin İzolasyonu

Hastalık vakalarında tipik semptom gösteren balıkların iç organları açılarak öze yardımı ile böbreklerinden ve dalaklarından alınan örnekler lam üzerine ilave edilmiş bir damla steril fizyolojik tuzlu su (FTS; %85'lik NaCl) ile karıştırıldı. Hazırlanan preparat 40'luk objektif altında bakterinin varlığı mikroskopik olarak incelendi. Mikroskop bakıda bakterilerin kısa zincir, tek veya çiftli yuvarlak hareketsiz bakterilerin olduğu görüldü. Hazırlanan bu preparat alevden üç kez geçilerek fikse edildi. Preparat soğuduktan sonra Gram boyama yöntemiyle boyandı. Boyanmış preparatın üzerine immersiyon yağı 1-2 damla damlatılarak mikroskopun 100'lük objektifte muayene edildi. İnceleme sonucunda mikroskopik sahada görülen bakterilerin morfolojik özelliklerine göre bakterilerin mor renkte görülmesi *Lactococcus* spp. olma ihtimali göz önünde bulunduruldu. Bu çalışmada bölgemizde kültürü yapılan gökkuşağı alabalığı çiftliklerinden örneklemelerin yapıldığı yer (şehir), örneklem tarihi, ekim yapılan organ ve izole edilen her bir bakteri izolatına ait verilen kod numaraları tablo 3 verildi.

Tipik hastalık semptomu (renkte kararırma, gözlerde çift taraflı ekzofthalmus) görülen balıkların mikroskopik muayenesi sonucunda böbrek ve dalak gibi organlardan Tryptone Soy Agar (TSA) ve Broth (TSB), Brain Heart İnfusion Agar (BHIA) ve Broht (BHIB) agara alevde strelize edilen öze yardımı ile ekim yapıldı. Ekim yapılan besi ortamları 20±2°C ayarlanmış soğutmalı etüve bakteri üremesi için yerleştirildi. TSA ve BHIA'da 24 saat sonra üreyen küçük beyaz koloniler mikroskopta incelendi. Mikroskopik muayene amacıyla hazırlanan preparatta hareketsiz yuvarlak tek, çift ve kısa zincirli görülen bakterilerin bulunduğu lam havada kurutulup alevden geçirilerek tespit edildi. Gram boyama ile boyandı. Ayrıca TSA ve BHIA'da bulunan bakteri kolonilerine katalaz ve oksidaz testleri uygulandı. Bu inceleme sonunda hareketsiz, Gram boyama testi pozitif, katalaz ve oksidaz testleri negatif olan bakteri izolatlarının her birine ayrı kod verilerek stoklandı. Yapılan çalışmalar sonucunda hareketsiz, katalaz ve oksidaz testi negatif, Gram boyama testi sonucunda hazırlanan preparatların mikroskopun 100'lük objektifinde incelenmesinde yuvarlak şekildeki tek, ikili veya kısa zincir şeklinde görülen 25 adet izolat bu tez çalışmasında kullanıldı.

Tablo 3. Gökkuşığı alabalıklardan tespit edilen bakteriyel izolatlara ait bilgiler.

Sıra No	İzolat kodu	Organ	Çiftlik Konumu	Tarihi
1	D-173	Dalak	Artvin / Borçka	26.10.2019
2	D-174	Böbrek	Artvin / Borçka	26.10.2019
3	D-175	Dalak	Artvin / Borçka	26.10.2019
4	D-180	Böbrek	Artvin / Borçka	26.10.2019
5	D-181	Böbrek	Artvin / Borçka	26.10.2019
6	D-182	Dalak	Rize / Ardeşen	05.11.2019
7	D-183	Böbrek	Rize / Ardeşen	05.11.2019
8	D-184	Böbrek	Artvin / Borçka	18.11.2019
9	D-185	Böbrek	Artvin / Borçka	18.11.2019
10	D-368	Dalak	Artvin / Borçka	30.10.2020
11	D-369	Dalak	Artvin / Borçka	30.10.2020
12	D-370	Dalak	Artvin / Borçka	30.10.2020
13	D-372	Böbrek	Ordu / Perşembe	04.11.2020
14	D-375	Böbrek	Rize / Fındıklı	05.11.2020
15	D-380	Böbrek	Trabzon / Yomra	12.11.2020
16	D-381	Dalak	Trabzon / Yomra	12.11.2020
17	D-382	Böbrek	Trabzon / Yomra	12.11.2020
18	D-383	Böbrek	Trabzon / Yomra	12.11.2020
19	D-384	Böbrek	Artvin / Borçka	18.10.2020
20	D-385	Böbrek	Ordu (Sivas)	11.11.2020
21	D-386	Böbrek	Rize / Fındıklı	12.11.2020
22	D-387	Dalak	Trabzon / Akçabat	03.11.2020
23	D-388	Böbrek	Trabzon / Akçabat	03.11.2020
24	D-398	Böbrek	Trabzon / Akçabat	08.02.2021
25	D-492	Böbrek	Artvin / Borçkaa	24.04.2021
26	Ref.	Meme	ATCC	1984-86

Tipik semptom gösteren hastalıklı balıklardan TSA ve BHIA'da saf olarak izole edilen hareketsiz, katalaz ve oksidaz testleri negatif, Gram boyama testi pozitif olan bakteri izolatları TSB'de üretilerek tez çalışmasının ileri ki safhalarında kullanılmak üzere %20 gliserol ile 1 ml toplam hacimde epondorf tüplere aktarıldı. Vorteks yardımıyla homojenize edildi ve üzerine izolat kodu yazılarak etiketlendi. Etiketlendikten sonra -80 santigrad derecedeki dondurucuda stoklandı.

2.2.2 Hareket Muayenesi

Tipik hastalık semptomları gösteren gökkuşağı alabalıkların böbreklerinden TSA ve TSB besi yerlerine ekim yapıldı. Ekim yapılan besi yerleri 20°C’de soğutmalı etüvde üretildi. Etüvde 24 saatlik süre sonunda TSA’da üreyen kolonilerin saf olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra saf olduğundan emin olunan kolonilerden numune alınarak hareket muayenesi yapıldı. Kısaca, steril bir öze yardımı ile TSA’da üreyen saf koloniden alınan bakteri örneği temiz bir lam üzerine önceden bir damla ilave edilmiş olan FTS ile karıştırıldı. Mikroskopik muayenede bakteri yoğunluğunun uygun olması halinde objektif büyüklüğü 40’a ayarlanarak bakterinin hareketli olup olmadığına karar verildi. Ayrıca, etüvde 12 saatlik süre sonunda TSB besi yerinde üreyen bakteri örneği temiz lam üzerinde direkt bir lup alınarak 40’lık objektifte incelenerek hareketli olup olmadığına karar verildi.

2.2.3. Katalaz Testi

Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen katalaz enziminin varlığının tespit edilmesi amacıyla kullanılır. Katalaz enzimi eritrositlerde de bulunduğu kanlı besi yerlerinden alınan örneklerle yapılan testlerin sonuçları sağlıklı bilgi vermez. Bu nedenle kanlı agarda üretilen bakterilere katalaz testi uygulanmadı.

Saf olarak TSA’da üretilen kolonilerden alınan bakteri örneği steril edilmiş bir öze yardımı ile alındı ve temiz bir lam üzerine distile su ile süspanse edildi. Üzerine %3’lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) damlatılarak karıştırıldı. Bu işlemlerin sonunda oksijen gazının serbest kalmasından dolayı kabarcık oluşturan örnekler pozitif katalaz enzimine sahip örnekler olarak değerlendirildi.

Kabarcık oluşturmayan örnekler ise negatif katalaz enzimi içermeyen olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada izole edilen bakteri örneklerin test sonuçları Tablo 5’de verilmiştir.

2.2.4. Oksidaz Testi

Oksidaz Testi; bazı bakteriler tarafından sentezlenen sitokrom oksidaz enziminin aktivitesini ölçmeye yarayan bir testtir. Elde edilen saf kolonilerden alınan bakteri örnekleri önceden oksidaz ayracı damlatılan kurutma kağıdına steril pasteur pipeti yardımıyla sürülerek renk değişimlerinin olup olmadığı gözlemlendi. 10 ile 60 saniye içinde koyu mavi renk oluşturan örnekler pozitif, oluşturmayan örnekler ise negatif olarak değerlendirildi. Bu çalışmada izole edilen bakteri örneklerine ait oksidaz test sonuçları Tablo 5’de verilmiştir.

2.2.5. Hemoliz Testi

Bakterilerin bazıları sentezledikleri çeşitli hemolizin enzimleriyle kandaki hemoglobini farklı derecede hemoliz etmektedirler. Kanlı agarda oluşturdukları hemolizin tipi bakterilerin tanımlanmasında kullanılan önemli bir özelliktir. TSA’da üreyen bakteri kolonisinden steril bir öze yardımıyla alınan bakteri örnekleri %5 koyun kanı içeren kanlı agarlara ekimi yapıldı. Petri kutusundaki besiyeri 37°C derecedeki etüvde 2 gün boyunca inkübe edildilerek hemoliz zonları oluşturup oluşturmadıkları gözlemlendi. Koloni etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş ve tamamen şeffaf bir halka oluşturanlar beta hemoliz; Koloni etrafında demir birleşiklerinin oluşturduğu yeşil renkli, tam şeffaf olmayan bir halka oluşturanlar alfa hemoliz; Koloni etrafında herhangi farklı bir durum oluşturmayan örnekler ise gama hemoliz olarak değerlendirildi.



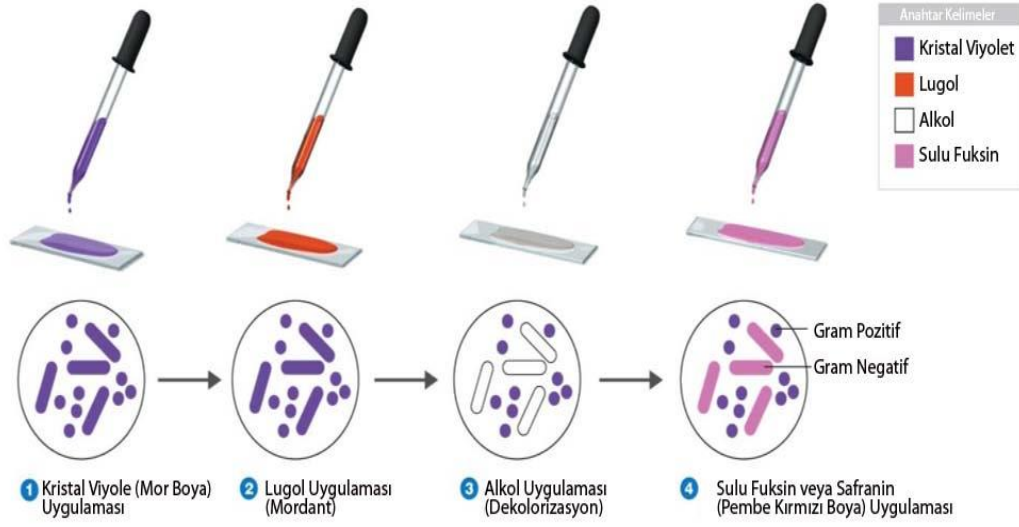
Şekil 3. Kanlı agarda alfa hemoliz gösteren *Lactococcus* spp. izolatının görünümü (Oriijinal).

2.2.6. Gram Boyama

Bakteriler hücre duvarındaki lipitlerin yapılarına göre boyama sonunda mavi-mor ya da kırmızı-pembe renklere boyanırlar. Gram boyama tekniği kullanılarak yapılan boyama işlemi sonunda bakteriler iki gruba ayrılır. Boyama sonunda mikroskopun 100 objektifinde mavi-mor renge boyanmış olarak görünen bakterilerin Gram pozitif, kırmızı-pembe renge boyanmış olarak görünen bakterilerin ise Gram negatif bakteriler olduğu kabul edildi.

TSA’da 24 saat süreyle üreyen saf kolonilerden steril bir öze yardımıyla alınan örnekler temiz bir lam üzerine damlatılmış olan %0,85’lik fizyolojik tuzlu su ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında kuruyan preparatlar alev üzerinden geçirilerek fiksasyon işlemi yapıldı. Hazırlanan preparatlar soğuduktan sonra kristal viyole solüsyonu damlatılarak bir dakika bekletildi ve ardından saf suyla durulandı. Ardından preparat iyot çözeltisi ile kaplanır ve bir dakika beklendikten sonra saf su ile durulandı. Preparat üzerine %96’lık etil alkol kapatılarak 10-15 saniye beklendi ve yeniden saf sudan geçirildi. Bu işlemin adına dekolorizasyon adı verilmektedir. En son işlem olarak preparat safarin solüsyonu ile kaplanarak 1 dakika beklendikten sonra saf sudan geçirildi. Kuruyan örnekler üzerine immersiyon yağı damlattırılarak ışık mikroskobunun 100’lük objektifinde incelendi. Boyama sonunda mikroskobik sahada gözlemlenen bakterinin

şekli ve rengi Tablo 5’de kaydedildi.



Şekil 4. Gram Boyama uygulama aşamaları (Anonim) (URL-4).



Şekil 5. *Lactococcus* spp. izolatının Gram boyamadan sonraki mikroskop altındaki görünümü (Orijinal).

2.2.7. Hastalık Etkenlerin API 20 Strep Testi İle Tanımlanması

TSA, BHIA agarda izole edilen ve bu tez çalışmasında kullanılmak üzere -80°C stoklanan izolatlar derin dondurucudan çıkartılarak TSA’da canlandırıldı. TSA’da üretilen bakterilerin saf olmasına özen gösterildi. TSA’da saf olarak üreyen izolatların

her birine hareket muayenesi, gram boyama testi, katalaz ve oksidaz testleri tekrarlandıktan sonra Kanlı agara (%5 koyun kanı ilave edilmiş.) bakteri suşları ekildi. Her bir kanlı agarın üzerine bakteri stok numarası yazıldı. Ekimi yapılan kanlı agarlar $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı etüve üremesi için yerleştirildi. Bu besi yerleri üzerinde 48 saat sonunda üreyen saf bakteri kolonilerin hemoliz oluşturup oluşturmadığı kontrol edildi. Bu tez çalışmasında bakterilerin tanımlanması amacıyla biyokimyasal testler API 20 strep testi (bioMérieux, Fransa) ile yapıldı. Bu amaçla API 20 strep test kitlerin kullanım prosedürlerine göre kanlı agarda üreyen bakteriler API 20 strep test kuyucuklarına yerleştirildi. Bu test kitleri $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik inkübatöre yerleştirildi. API 20 strep test kitleri prosedüre uygun olarak farklı saatlerde kontrol edildi. Renk değiştiren kuyucuklar pozitif olarak kaydedildi. API 20 strep test kitleri 24 saat sonra etüvden çıkartılarak ayraçlar ilgili kuyucuklara birer damla olarak damlatılarak ve 10 dakikalık reaksiyon sonrası renk değişimine göre pozitif veya negatif olarak kaydedildi (Önalın, 2019) . API 20 strep test kitlerindeki biyokimyasal şeker testleri için 48 saat beklendikten sonra izolatların test sonuçları sarı renge dönenler pozitif (+) veya kırmızı renge dönenler negatif (-) olarak kaydedildi. API 20 strep test kitlerine izolatların inokülesiyondan sonra ilk görüntüleri şekil 6'de verilmiştir.



Şekil 6. API 20 strep test kitlerine homojenize bakteri izolatların yerleştirildikten sonraki ilk görüntüsü (Orijinal).

2.2.8. Antibiyogram Testi

Bu tez çalışmasında hastalıklı gökkuşağı alabalıkların iç organlarından TSA ve Brain Heart Infusion Agar (BHIA)'da saf olarak izole edilen *L. garvieae* olduğu düşünülen 25 izolatın her biri için ayrı ayrı antibiyogram testi yapıldı. Bu besi yerlerindeki 24 saati geçmemiş taze kültürlerden steril öze yardımıyla birkaç koloniden alınan bakteriler FTS içeren 2 ml tüplerde vorteks yardımıyla homojenize edilerek McFarland No:0,5 bulanıklığına ayarlandı. Daha önceden sterilize edilerek hazırlanmış

ve +4°C’de tutulan Müller Hilton Agar (MHA) buzdolabından çıkartılarak 37°C’deki etüvde 20 dakika süre bekletilerek nemi alındı. Hazırlanan bakteri süspansiyondan 0,1-0,2 ml alınarak kurutulmuş MHA üzerine dökülüp cam yayma çubuğu yardımıyla besi yeri yüzeyine kuruyana kadar yayıldı (Önalın vd., 2020).

Antibiyotik dispanseri (disk dağıtıcı) yardımıyla MHA üzerine antibiyotik diskleri dağıtıldı. MHA besiyerinde bulunan bakteriler 25°C’de 18 saat süreyle üremeye bırakıldı. MHA besiyeri üzerinde antibiyotik diskleri tarafından oluşturulan zon çapları dijital bir kumpas yardımıyla ölçümü yapıldı ve ölçülen zon çapları kaydedildi. MHA’da yapılan antibiyogram test sonuçlarına ait veriler Tablo 6’da gösterildi. Antibiyogram test sonuçlarına ait veriler Tablo 4’deki standart inkübasyon zon çapları aralıklarına göre değerlendirildi.

Tablo 4. Antibiyotik disk içerikleri ve inhibisyon disk çapı sınır değerleri

Antimikrobiyel ajanlar	Disk Konsantrasyonu	Standart İnhibisyon Zon Çapı (mm)			
		D	OH	H	Referanslar
Ampisilin (AM)	AM 10 µg	≤13	14-16	≥17	NCCLS, 1997
Amoksisilin (AX)	AX 10 µg	≤13	14-17	≥18	NCCLS, 1997
Doksisiklin (DO)	DO 30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14	NCLSI, 2013
Enrofloksasin (ENR)	ENR 5 µg	≤16	17-20	≥21	NCCLS, 1997
Eritromisin (E)	E 15 µg	≤13	14-22	≥23	NCCLS, 1997
Florfenikol (FCC)	FFC 30 µg	≤14	15-18	≥19	NCCLS, 1997
Oksitetrasiklin (T)	T 30 µg	≤14	15-18	≥19	NCCLS, 1997
Oksolinik asit (OA)	OA 2 µg	≤10	11-12	≥13	NCCLS, 1997
Streptomisin (S)	S 10 µg	≤11	12-14	≥15	NCCLS, 1997
Sülfametoksazol (SMZ)	SMZ 100 µg	≤12	13-16	≥17	NCCLS, 1997
Trimetoprim+Sulfametoksazol	SXT 25 µg	≤10	11-15	≥16	NCCLS, 1997

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

Antibiyogram testinde National Committee for Clinical Laboratory (1997) belirttiği standart disk difüzyon yöntemi yardımıyla yapıldı ve değerlendirildi. Antibiyogram testleri için bu çalışmada, Ampisilin (10µg), Amoksiklin(10µg), Eritromisin(15µg), Enrofloksasin (5 µg), Florfenikol (30 µg), Gentamisin (10 µg), Oksitetrasiklin(30µg), Oksolinik (2µg), Sulfadiazin-Trimetoprim (25µg), Sülfametoksazol (25 µg), Streptomisin (10 µg) gibi antibiyotik diskleri kullanıldı.

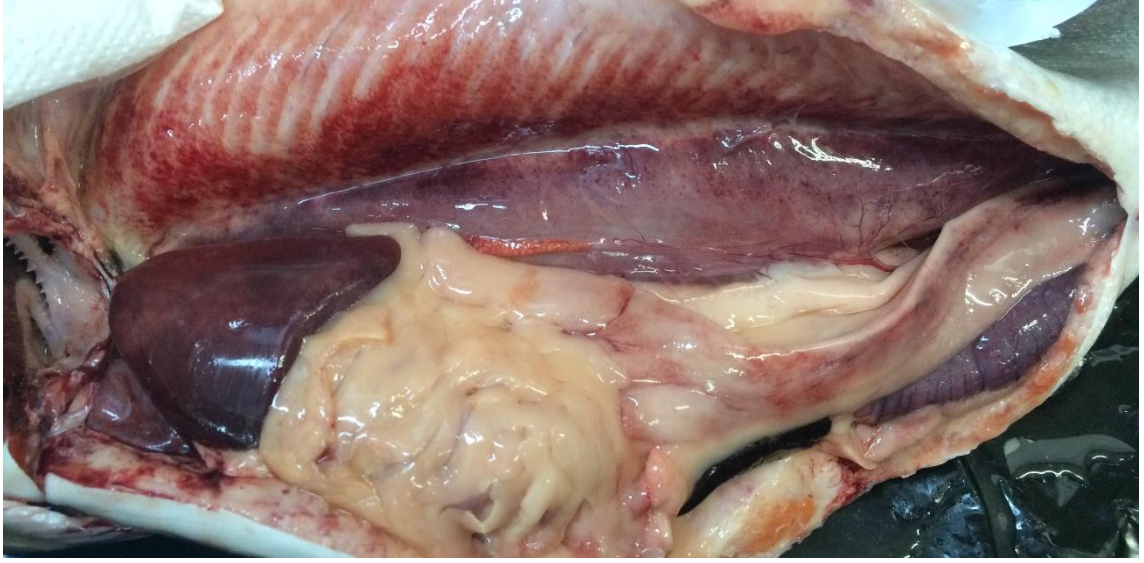
3. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında alabalık üretim çiftliklerinden laboratuvara gönderilen tipik hastalık semptomları gösteren balık numunelerinden izole edilen 25 adet bakteri izolatı kullanıldı. Gökkuşığı alabalıklardan izole edilen ve *Lactococcus* spp. olabileceği düşünülen bakteri izolatlarına ilk olarak Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri yapıldı. Test sonuçlarına göre Gram pozitif, katalaz ve oksidaz testi negatif olan izolatlardan farklı sistemlerden ve bölgelerden 25 adet izolat seçildi. Bu bakteri izolatları kanlı agar besi yerlerine ekilerek 24 saat sonraki kolonilerle API 20 strep testi yapıldı. *L. garvieae*'nin referans (ATCC 43921) suşuna yapılan API 20 strep testi sonuçları, bu çalışmada kullanılan izolatların sonuçları ile karşılaştırıldı.

Hastalığa yakalanan balıklarda iştahsızlık, baş, göz ve yüzgeç tabanlarında kanama, ekzoftalmus (tek ve ya çift taraflı), semptomlar gösterdiği bildirildi. Davranışsal olarak hasta balıkların halsiz bir şekilde su yüzeyine yakın yüzdükleri ve havuzun su çıkış bölgelerinde toplandıkları bildirildi. Nekroskobik muayenede iç organlarda kanamalar, karaciğerde renk değişimleri, karaciğer, plorik çekumda ve hava kesesi üzerinde noktasal kanamalar olduğu görüldü. Bağırsakların şişkin içinin beyaz bir sıvı ile dolu olduğu ve boylu boyunca yaygın kanamalar olduğu gözlemlendi. Kok enfeksiyonlu bir gökkuşığı alabalığının tipik dış görünümü Şekil 7'de ve iç organların görünümü Şekil 8'de verildi.



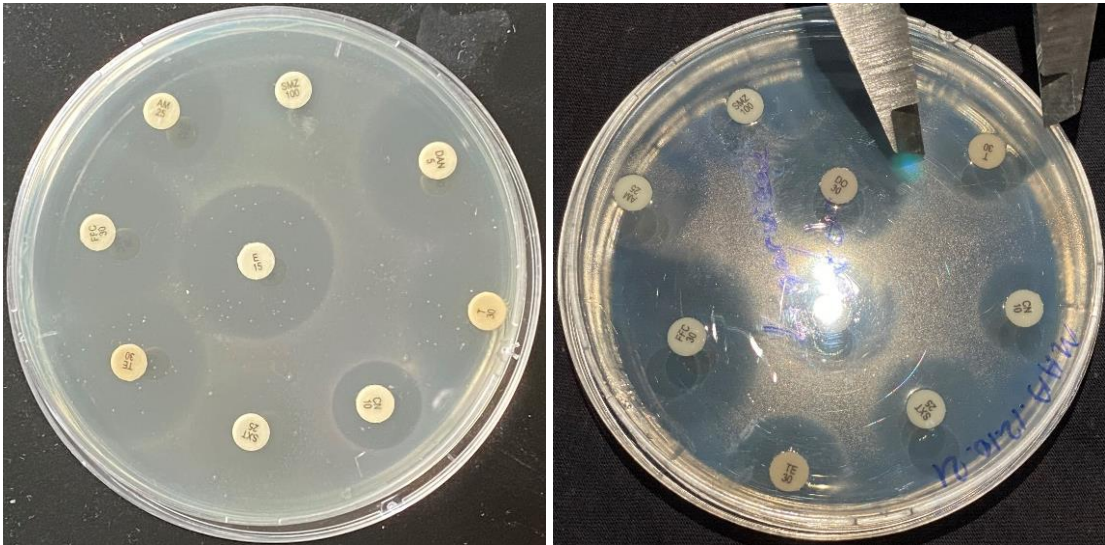
Şekil 7. Kok enfeksiyonu olan bir gökkuşığı alabalığının tipik dış görünümü (Orijinal).



Şekil 8. Kok enfeksiyonlu bir gökkuşığı alabalığının iç organların görünümü (Orijinal).

L. garvieae; Gram pozitif, hareketsiz, yuvarlak formunda kısa zincirler oluşturan bir bakteri olup alınan izolatlarla öncelikle bu özelliklerin varlığına bakmak amacıyla fiziksel ve biyokimyasal testler yapılarak test sonuçları Tablo 5’de verildi.

Hastalıklı gökkuşığı alabalıklarından izole edilen *Lactococcus* spp. izolatlarına yapılan antibiyogram test sonuçlarına ait görüntüsü Şekil 9’da verildi



Şekil 9. *Lactococcus* spp. izolatlarının antibiyogram test sonuçlarına ait görüntü (Orijinal).

Tablo 5. *Lactococcus* spp. izolatlarına ait geleneksel fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları.

Karakter	Balıklardan izole edilen bakteri izolatlarına verilen kod numarası												
	D-173	D-174	D-175	D-180	D-181	D-182	D-183	D-184	D-185	D-368	D-369	D-370	D-372
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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+36°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 5. (devamı)

Karakter	Balıklardan izole edilen bakteri izolatlarına verilen kod numarası												Referans
	D-375	D-380	D-381	D-382	D-383	D-384	D-385	D-386	D-387	D-388	D-398	D-492	
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	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%6,5 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+10°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+36°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.1. API 20 Strep Test Sonuçları

API 20 Strep testi yapılan izolatlarda; Voges Proskuer (VP) tüm izolatlarda pozitif; Hippurat hidroliz (HIP) D-185 / 369/ 370/ 387/ 388 izolat kodlu izolatlarda negatif diğer izolatlarda pozitif; Eskulin hidroliz (ESC) bütün izolat örneklerinde pozitif; Pirrolidonil arilamidaz (PYRA) bütün izolat örneklerinde pozitif; α -Galaktosidaz (α -GAL) D-368 / 369 / 370 / 384 / 387 / 388 izolat kodlu izolatlarda pozitif diğer izolat örnekleri ise negatif, β -Glukuronidaz (β -GUR) bütün izolat örneklerinde negatif, β -Galaktosidaz (β -GAL) D-185 / 368 / 369 / 370 / 384 / 387 / 388 kod numaralı izolatlar pozitif diğer izolatlar negatif, Alkalın fosfataz (PAL) D-185 / 368 / 369 / 370 / 384 kodlu izolatlar pozitif diğer izolatlar negatif, Lösin arilamidaz (LAP) bütün izolat örneklerinde pozitif, Arjinin dihidrolaz (ADH) D-387 kodlu izolatta negatif diğer izolat örneklerinde pozitif, Riboz(RIB) D-387/388 kodlu izolat örneklerinde negatif diğer izolat örnekleri ise pozitif, Arabinoz (ARA) D-384 / 387 / 388 kodlu izolatlarda pozitif diğer izolat örneklerinde negatif, Mannitol (MAN) bütün izolat örneklerinde pozitif, Sorbitol (SOR) D-368 / 375 / 384 / 385 kodlu izolat örneklerinde pozitif diğer izolat örnekleri ise negatif, Laktoz (LAC) D-175 / 368 / 369 / 370 / 375 / 380 / 381 / 382 / 384 / 386 / 387 / 388 / 398 kodlu izolat örnekleri pozitif diğer izolat örnekleri ise negatif, Trehaloz (TRE) D-385 kodlu izolat negatif diğer izolat örnekleri pozitif, İnulin (INU) D-385 / 387 / 388 kodlu izolat örnekleri pozitif diğer izolat örnekleri ise negatif, Rafinoz (RAF) D-175 / 180 / 368 / 369 / 370/ 372 / 375 / 384 / 387 / 388 kodlu izolat örnekleri pozitif diğer izolat örnekleri ise negatif, Amigdalın (AMD) D-385 kodlu izolat örneği negatif diğer izolat örnekleri pozitif, Glikojen (GLYG) D-180 kodlu izolat örneği pozitif diğer izolat örnekleri negatif olduğu belirlendi. Bütün izolat örnekleri alfa hemoliz oluşturduğu gözlemlendi. Labovutara getirilen gökkuşağı alabalıklarının dalak veya böbreğinden izole edilen bakteri izolatları genel olarak bir çoğu 7143111 ve 7143511 profili oluşturduğu tespit edildi. İzolatlara uygulanan API 20 Strep testlerinin sonuçları Tablo.6'te verildi. *L. garvieae* referans izolatı (ATCC43921) ile yapılan API 20 strep test sonuçlarına ait ayıraçlar ilave edilmeden önceki ve ilave edildikten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları Şekil 10'da verilmiştir. Çalışılan bakteri izolatları ile yapılan API 20 Strep testine ait ilk görüntü ve ayıraçlar döküldükten (24 saat) sonraki oluşan görüntüler Şekil 11 ve 12'de sunulmuştur.



Şekil 10. *L. garvieae* referans izolatına (ATCC43921) ait API 20 Strep testinde ayıraçlar dökülmeden önceki ve döküldükten sonraki biyokimyasal testlerin sonuçları (Orijinal).



Şekil 11. API 20 Strep test kitlerine homojenize bakteri izolatların yerleştirildikten sonraki ilk görüntüsü ve 24 saat sonra ayıraçlar döküldükten sonraki oluşan görüntüsü (Orijinal).



Şekil 12. API 20 Strep test kitlerine 24 saat sonra ayıraçlar döküldükten sonraki testin görüntüsü (Orijinal).

Tablo 6. *Lactococcus* spp. izolatlarına uygulanan API 20 Strep testinin sonuçları.

İzolatın	<i>L. garvieae</i> izolatlarının API 20 strep test sonuçları																				
Kodu	VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
D-173	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-174	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-175	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	α
D-180	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	α
D-181	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-182	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-183	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-184	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-185	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-368	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	α
D-369	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	α
D-370	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	α
D-372	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	α
D-375	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	α
D-380	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
D-381	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
D-382	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
D-383	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	α
D-384	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	α
D-385	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	α
D-386	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
D-387	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	α
D-388	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	α
D-398	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	α
D-492	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	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.

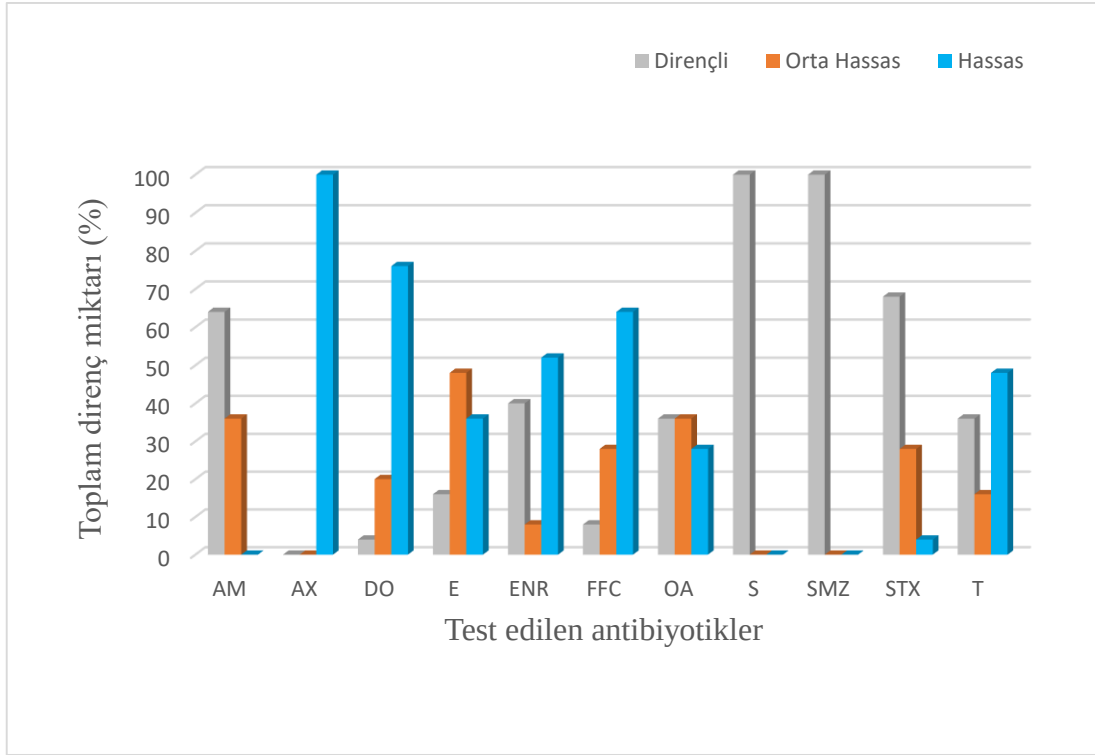
3.2. Antibiyogram Test Sonuçları

Gökkuşığı alabalıklarından izole edilen *Lactococcus* spp. izolatlarına uygulanan antimikrobiyel test sonuçlarına göre; tüm bakteri izolatlarının sulfamethoksazol ve streptomisine %100, trimethoprim+sulfamethaksazole %68, ampisiline %64, enrofloksasine %40, oksitetrasiklin ve oksolinik aside %36 direnç gösterdiği belirlendi. *L. garvieae* izolatlarına karşı amoksisilinin %100, doksisisiklinin %76, florfenikolün %64 oranında tesirli olduğu tespit edildi. Disk difüzyon test sonucunda ölçülen zon çaplarının değerlendirilmesi sonucu *Lactococcus* spp. izolatlarına ait hassasiyet profilleri Tablo 7 'da verildi. İzolatların antibiyotiklere karşı direnç ve hassiyet oranları Şekil 12'de gösterilmiştir.

Tablo 7. *Lactococcus* spp. İzolatlarının antibiyogram testi duyarlılık profilleri.

İzolat kodu	Antibiyotik diskleri										
	T-30 µg	OA-2 µg	SMZ-100 µg	AM-10 µg	FFC-30 µg	S-10 µg	ENR-5 µg	E-15 µg	STX-25 µg	DO-30 µg	AX-10 µg
D-173	D	D	D	OH	H	D	D	H	OH	H	H
D-174	H	D	D	OH	D	D	D	H	D	H	H
D-175	D	OH	D	D	D	D	OH	H	D	H	D
D-180	H	OH	D	D	H	D	H	H	D	H	H
D-181	H	H	D	D	H	D	D	D	D	H	H
D-182	H	D	D	D	H	D	H	D	D	H	H
D-183	D	OH	D	D	D	D	D	OH	D	OH	H
D-184	D	OH	D	D	D	D	D	OH	D	OH	H
D-185	D	OH	D	D	D	D	D	OH	D	OH	H
D-368	D	OH	D	D	D	D	D	OH	D	OH	H
D-369	H	H	D	OH	H	D	H	OH	OH	H	H
D-370	H	H	D	OH	H	D	H	OH	OH	H	H
D-372	H	H	D	OH	H	D	H	OH	OH	H	H
D-375	H	H	D	OH	H	D	H	OH	OH	H	H
D-380	H	H	D	OH	H	D	H	OH	OH	H	H
D-381	H	H	D	OH	H	D	H	OH	OH	H	H
D-382	OH	OH	D	D	H	D	H	H	H	H	H
D-383	OH	D	D	D	H	D	H	H	D	H	H
D-384	OH	D	D	D	H	D	H	H	D	H	H
D-385	D	OH	D	D	OH	D	H	D	D	H	H
D-386	H	D	D	D	D	D	D	H	D	H	H
D-387	D	D	D	D	H	D	OH	D	D	H	H
D-388	H	D	D	D	OH	D	D	OH	D	OH	H
D-398	OH	OH	D	D	H	D	H	H	D	D	H
D-492	D	D	D	OH	H	D	D	OH	D	H	H

AM: Ampisilin, AX: Amoksisilin, DO: Doksisisiklin, ENR: Enrofloksasin, E: Eritromisin, FFC: Florfenikol, T: Oksitetrasiklin, OA: Oksolinik Asit, S:Streptomisin, SMZ: Sulfamethoksazol, STX: Trimethoprim+Sulfamethaksazol, D: Dirençli, OH: Orta Hassas, H: Hassas.



Şekil 13. Hastalıklı alabalıklardan izole edilen *Lactococcus* spp. İzolatlarının antimikrobiyal direnç miktarları (%) (Orijinal).

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Gökkuşığı alabalık çiftliklerinde özellikle su sıcaklığının 15-22°C ulaştığı yaz mevsimindeki hastalık olgularında hastalık etkeni olarak izole edilen *L. garvieae*' nın daha çok porsiyonluk ve üzeri balıklarda şiddetli ölümlere (%60-80) ciddi ekonomik kayıpların meydana geldiği bildirilmiştir (Balta ve Dengiz Balta, 2019; Eldar vd., 1999, Diler vd., 2002).

Hastalıklı havuz veya kafeslerdeki 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 rapor 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 rapor edilmiştir (Balta vd., 2019; Durmaz vd., 2015).

Bu tez çalışması kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesindeki 6 farklı Gökkuşığı Alabalık Çiftliğinden Fakültemiz Hastalıklar Laboratuvarına farklı tarihlerde getirilen tipik hastalık semptomları gösteren (deride kararma, iştahsızlık, yüzme anormallikleri, tek veya çift taraflı ekzoftalmus) örnekleri seçildi. Balıklar seçilerek bunların dalak ve böbreklerinden izole edilen 25 adet bakteri suşu üzerinde API 20 strep testi uygulanmıştır. Karşılaştırmalar için 1 Adet Referans suşu (ATCC43921) kullanılmıştır. Uygulan API 20 strep testi sonuçlarına göre izolatların çoğunluğu 7143111 ve 7143511 profili gösterdiği görüldü. Bakteri izolatlarının 25°C'deki API 20 strep profili 7143551, 7143153, 5173111, 7373751, 5373551, 7143751, 5354571 ve 5355571 olarak tespit edilmiştir. Referans şusun API 20 strep profili 7143151 olarak belirlenmiş ve API web sisteminde *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 8 'de verilmiştir.

Tablo 8. Bakteri izolatlarına ait API profillerin API web sistemindeki benzerlik oranları.

İzolatlar	API profili	Benzerlik yüzdesi	
D-173	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-173	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-175	7143551	%62,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%22 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-180	7143153	%84,6 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%10,1 <i>Enterococcus faecium</i>
D-181	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-182	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-183	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-184	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-185	5173111	%67,3 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-368	7373751	%74,4 <i>Enterococcus faecium</i>	%14,2 <i>Streptococcus uberis</i>
D-369	5373551	%94,9 <i>Enterococcus faecium</i>	%4,1 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-370	5373551	%94,9 <i>Enterococcus faecium</i>	%4,1 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-372	7143151	%82,7 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%9,8 <i>Enterococcus faecium</i>
D-375	7143751	%92 <i>Enterococcus faecalis</i>	%5,8 <i>Streptococcus uberis</i>
D-380	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>	%35 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-381	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>	%35 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-382	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>	%35 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-383	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
D-384	7143751	%92 <i>Enterococcus faecalis</i>	%5,8 <i>Streptococcus uberis</i>
D-385	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>	%35 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-386	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>	%35 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-387	5354571	%77,8 <i>Enterococcus faecium</i>	%20,3 <i>Globicatella sanguinis</i>
D-388	5355571	%99,9 <i>Enterococcus faecium</i>	%0,1 <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>
D-398	7143511	%59,9 <i>Enterococcus faecalis</i>	%35 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
D-492	7143111	% 67,2 <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	%27,9 <i>Enterococcus faecalis</i>
Ref.	7143151	%82,7 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	%9,8 <i>Enterococcus faecium</i>

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.

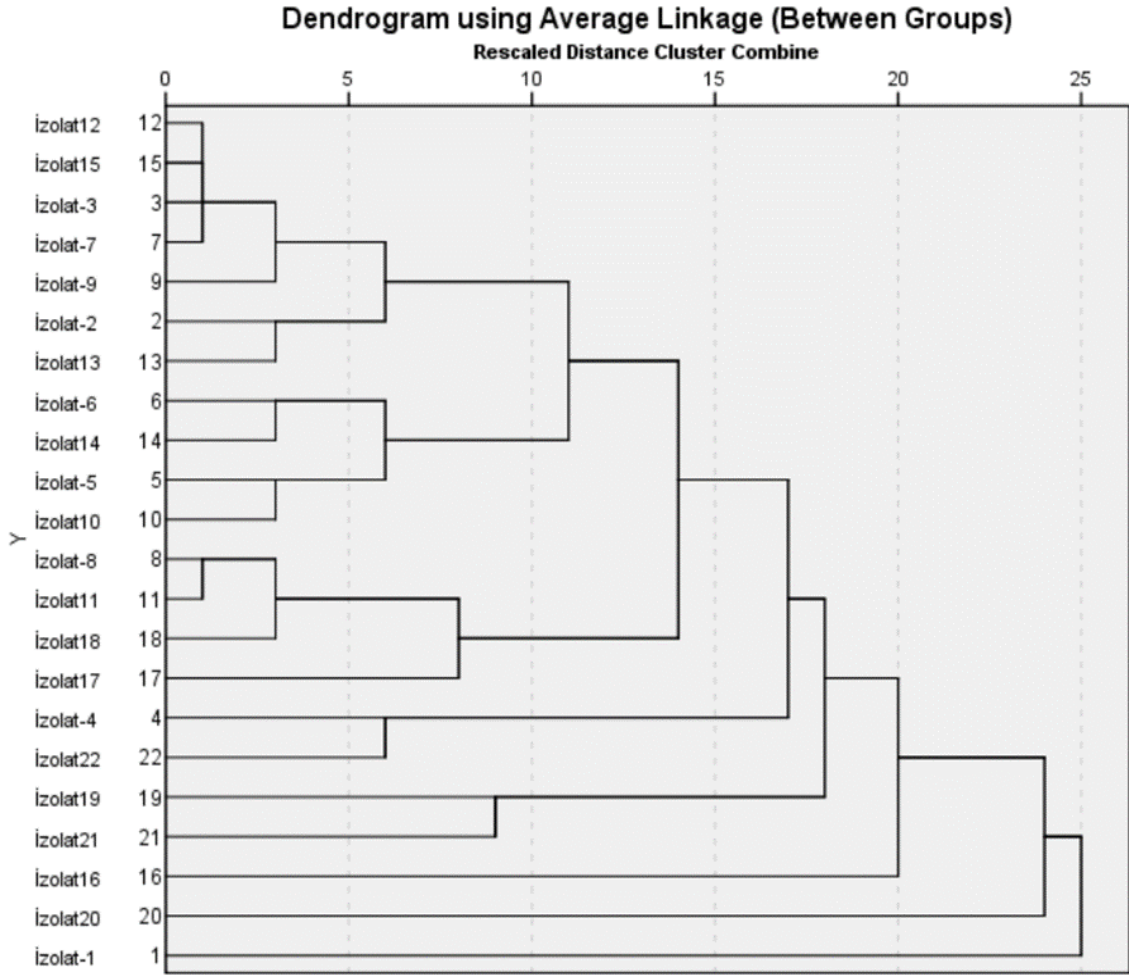
Genetik çalışmalar sonucunda gen banka yüklenmiş *Lactococcus garvieae* genomik verilerinin analiz edildiği bir çalışmada ortalama nükleotid kimlik değerlerine dayandırılarak dört farklı grubun veya alt grubun varlığından bahsedilmiştir (Kumru, 2021).

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).

Testin Kodu	Testin Adı	Fenotip II																	Fenotip III				Fenotip I			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1.0	ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.1	BGLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.2	BGAR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.3	BGUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.4	aGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.5	PAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.6	RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.7	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.8	SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.9	LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.A	TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.B	RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.C	SAC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1.D	LARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.E	DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.F	CDEX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.0	VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1	APPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.2	bGAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.3	PyrA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.4	bNAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	GTA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.6	HIP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.7	GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.8	PUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.9	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.A	MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.B	MLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.C	M8DG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.D	TAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.E	bMAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.F	URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Şekil 14. *L. garvieae* izolatlarının API Rapid ID 32 Strep testi sonucu biyokimyasal profil farklılıkları (Önalın vd., 2020).

Araştırmacılar aynı izolatları ile gerçekleştirdikleri genetik profillemeye sonrasında ise 22 izolatın 10 farklı grup (Şekil 15) oluşturduğunu belirtmişlerdir (Önalın vd., 2016).



Şekil 15. *L. garvieae* izolatlarının LCGL_0441 ve LCGL_0658 gen lokuslarındaki allellerinden elde edilen binomial veriler ile oluşturulan dendrogram (Önalın ve Arabacı, 2016).

Gökkuşuğu alabalıklarından elde edilen izolatların antimikrobiyal ajanlara direnç ve hassasiyetlerini belirlemek için disk diffüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan test sonucuna göre tüm izolatların Sulfamethoksazol ve Streptomisin'e %100 dirençli olduğu gözlenmiştir. *L. garvieae* izolatlarına karşı Amoksisilinin %100, Doksisisiklinin %76, Florfenikolün %64 tesirli olduğu gözlemlendi.

L. garvieae, 0,7-1,4 µm çaplarında gram pozitif,kok şeklinde hareketsiz kapsüllü ya da kapsülsüz olabilen bir bakteri olup sıvı besi yerlerinde kısa zincirler ; kanlı agarda alfa hemoliz , katı besi yerlerinde gri veya beyaz renkli koloniler oluşturan fakültatif anerop bir bakteridir(Kav vd., 2007, Timur vd., 2011).

Gökkuşığı alabalıklarından elde edilen izole edilen izolatlarla yapılan oksidaz, katalaz testinde tüm izolatlar negatif, Gram testinin pozitif, hareket testinin negatif olduğu gözlemlendi.

Bakterilerin tür tanımlamasında en fazla kullanılan yöntemlerin başında geleneksel biyokimyasal ve fiziksel testler gelmektedir. Geleneksel biyokimyasal testlerin yanı sıra API hazır test kitleri de kullanılmakta olup, bu API test kitlerinin hatalı inkübasyon sıcaklığında uygulanması sonucunda hatalı isimlendirmelerin yapıldığı bildirilmektedir.

Hastalık balık üretim çiftliklerinin ekonomik kayıplar verdiği önemli sorunların başında gelmektedir. Hızlı tanı tedavi balık ölümlerinin en az indirgenmesinde önemli rol oynayacaktır. Tedavi süreci hastalığı oluşturan etkenin tanımlanması ile hem doğru hem daha etkili bir şekilde yürütebilecektir.

Doğu Karadeniz Bölgesinde karadaki Alabalık çiftlikleri genellikle aynı dere üzerinde kuruludur yani derenin deniz seviyesine yakın olan çiftlik derenin kaynağına yakın olan çiftliklerde hastalık olması durumunda bu hastalık yükünü en sonda ki çiftliğe kadar iletmiş olacaktır. Çoğu aile işletmesi olan bu çiftliklerin salgın hayvan hastalıklarla mücadele kapsamında aynı büyükbaş ve küçükbaş olduğu gibi devlet destekli aşılama alınımalıdır. Böylece bölgedeki çiftliklerinin hastalık sebebiyle uğrayacağı zararlar azaltılarak ekonomik olarak kalkınma sağlanabilir. Ayrıca sağlıklı bir protein kaynağı olan balığın sürdürülebilir üretimi sağlanacaktır.

Hastalığın etkeninin doğru tanı ve tespiti o etkene karşı kullanılacak antibiyotiklerin doğru doz ve sürede kullanılmasına katkıda bulunacaktır; böylece bu etkenlerin bu antibiyotiklere direnç oluşturmaları ve etkisini azaltılmasının önüne geçilebilir.

Hastalıkların genellikle su sıcaklığının arttığı dönemlerde oluşması nedeniyle su sıcaklıklarının artmadan balıkların bağışıklık sistemini güçlendirici vitamin desteği verilmesi ve aşılamının yapılması önemlidir



KAYNAKLAR

- Akbulut, S. ve Keten, A. (2001). Düzce Yöresindeki Alabalık Yetiştiriciliği Üzerine Bir Çalışma. *Turkish Journal of Forestry*, 2(1), 49-60.
- 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.
- Avci, H. , Aydoğan, A., Tanrikul, T. T. and Birincioğlu, 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.
- 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.
- Balta, F., Dengiz Balta, Z., Ozgumus, O.B. ve Çağırğan, H. (2016). Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*'nin portörlük yönünden tetkiki ve antimikrobiyal direncin tespiti. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 72-76.
- Balta, F. ve Dengiz Balta, Z. (2016). Deniz suyuna nakledilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen vibrio enfeksiyonu ve tedavisi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 14-20.
- 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. DOI: 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.
- Balta, F. ve Dengiz Balta, Z. (2017). Doğu Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı 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. DOI: 10.35229/jaes.544439
- 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.
- 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.
- Çagırgan, 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.

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). Gökkuşaağı alabalıklarından *Lactococcus garvieae* identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.

Durmaz, Y. ve Kılıçoğlu, Y. (2015). Bir Alabalık Çiftliğinde Doğal Enfekte Gökkuşaağı 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).

Elbek, A.G. ve İşören,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.
- Kav, K. ve Erganiş, O. (2007). Konya bölgesinde bulunan gökkuşığı alabalığı (*Onchyrnus mykiss*) çiftliklerinden *Lactococcus garvieae* izolasyonu, identifikasyonu ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi. Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 23(1), 7-17.
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırcan, Ş. ve Sekkin, S. (2004). Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyal 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.
- 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., Arabacı, M., Çağırın, H. (2020). Phenotypic Differences between *Lactococcus garvieae* Isolates Obtained from Rainbow Trout Farms in Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 52(5).
- Önalın, Ş., Arabacı, M. (2016). Van, Bitlis, Muş ve Hakkari illerinde bulunan gökkuşığı alabalığı çiftliklerinden elde edilen *Lactococcus garvieae* izolatlarının fenotipik, serotipik ve genotipik farklılıklarının belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- 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., Çevik, M. (2020). Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance. *Brazilian Journal of Biology*, 80,

934-942.

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.

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.

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 Gökkuşuğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, L.) Lactococcosis'in Bakteriyolojik Ve Histopatolojik Metodlarla Teşhisi. *Aquatic Sciences And Engineering*, 26(2), 63-81.

URL-1, (2021). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2020-37252> (15 Ekim 2021).

URL-2, (2021). <https://www.arthipo.com/image/cache/catalog/poster/animals/panimal/368-rainbow-trout-resim-poster-kanvas-photo-1000x1000.jpg>. (15 Ekim 2021).

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).

Yılmaz, C. (2011) Alabalık Yetiştiriciliği Elazığ İl Tarım Müdürlüğü. Ceren Ofset 2011
Elazığ. Genişletilmiş 2. Baskı 216s. 5-113.

Woo, P.T. and Bruno, D. W. (2003). Fish Disease and Disorders, Volume 3: Viral,
Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.



