



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİNE

Proje Numarası :	2021/1-13 M (YLS)
Projenin Adı :	Kahramanmaraş ilindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un konveksiyonel kültür ve moleküler yöntemlerle tanımlanması
Projenin Türü :	Münferit Proje (M)
Proje Yön. Unv.-Adı-Soyadı :	Doç.Dr. Mikail ÖZCAN
Görev Yeri :	Ziraat Fakültesi
Bölümü :	Su Ürünleri
Sözleşmeye Göre Projenin	
Başlangıç Tarihi :	25-03-2021
Bitiş Tarihi :	22-02-2024
Alınan Ek Süre :	25 Ay
Sonuç Raporu Tarihi :	26-04-2024
Proje Bütçesi :	15.972,48 TL
Alınan Ek Ödenek :	0,00 TL
Projenin Toplam Bütçesi :	15.972,48 TL
Harcanan Miktar :	14.567,74 TL
Proje Kalan Bütçesi :	1.404,74 TL
İşyeri Telefon Numarası :	(344)280-2097
Cep Telefon Numarası :	(536)483-6453
Proje Yöneticisinin İş Adresi :	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü 46100 KAHRAMANMARAŞ
Demirbaş/Taşınır Alımları	Proje Kapsamında Demirbaş Niteliğinde Taşınır Alınmamıştır.

Projemin sonuç raporunun kabulünü arz ederim./...../202..

Doç.Dr. Mikail ÖZCAN
(İmza)

Projemin Sonuç Raporunun, Üniversitemiz BAP/Kütüphane İnternet Sayfasında;

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1.Yayınlanmasına İzin Vermiyorum. | ☒ |
| 2.Sadece Özetin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. | ☐ |
| 3.Tam Metin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. | ☐ |
| 4. Tarihinden İtibaren Tam Metin Yayınlanmasına İzin Veriyorum. | ☐ |



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
SONUÇ RAPORU

F-6

Proje Adı

Kahramanmaraş ilindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde Flavobacterium psychrophilum'un konveksiyonel kültür ve moleküler yöntemlerle tanımlanması

Proje No	Başlama Tarihi	Bitiş Tarihi	
2021/1-13 M (YLS)	25-03-2021	22-02-2024	
Rapor Türü	Raporun Kapsadığı Dönemin Tarihleri		
Sonuç Raporu	25-03-2021	22-02-2024	
Bilimsel Araştırmalar Birimi Tarafından Sağlanan Destek Miktarı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan
15.972,48 TL	14.567,74 TL	14.567,74 TL	1.404,74 TL
Destek Sağlayan Diğer Kuruluşların Katkısı	Gelişme Raporu Döneminde Harcanan	Şimdiye Kadar Harcanan	Kalan

SAĞLANAN DESTEKTEN ŞİMDİYE KADAR YAPILAN HARCAMALARIN FASILLARA GÖRE DAĞILIMI

Fasıl	Harcanan	Kalan
TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI	11.594,14 TL	1.404,74 TL
HİZMET ALIMLARI	2.973,60 TL	0,00 TL

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ YAYINLAR

No	Yayın
Bulunmamaktadır	

RAPOR DÖNEMİNE AİT İLGİLİ FİKRİ MÜLKİYETLER

No	Fikri Mülkiyet Adı	Fikri Mülkiyet No	Alındığı Ülke	Tescil Tarihi
Bulunmamaktadır				

RAPOR DÖNEMİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR VE ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Sonuç Rapor Özeti :

Bu çalışma ile Kahramanmaraş ilinde bulunan bulunan 68 ayrı Gökkuşağı alabalığı (Oncorhynchus mykiss) işletmesinde yavru larada Flavobacterium psychrophilum bakterisinin belirlenip, fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla, Aralık 2022 ve Temmuz 2023 tarihleri arasında alabalık işletmelerinden 5 gramdan küçük yavru ve 5 gramdan büyük yavru örnekleri alındı. Flavobacterium psychrophilum izolasyonu için; Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (CB), Modified Anacker ve Ordal agar (MAOA), Modified Anacker ve Ordal Broth (MAOB), Tryptone Yeast Salt Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Salt Broth (TYES-B), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum+ Agar (EAO+FBS+A), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+ B), Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin (TYESA+ T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum (TYFBS) agarlar kullanıldı. Bu besiyerleri 15 oC'de 5--7 gün süreyle etüvde inkübe edildi. Üreyen saf sarı renkteki kolonilere biyokimyasal tanımlama testleri aynı sıra Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) uygulanıp fenotipik özellikleri incelendi. Biolog Sistemi ile identifiye edilen suşların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğiyle teyit edilmesinde özel primer kullanıldı. Takiben bu suşların tamamının moleküler olarak teyit yapıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulanmış suşların sekans analizi yapıldı ve analiz sonucu NCBI'daki referans bakteriye göre yorumlandı. Sonuç olarak; 12 adet Flavobacterium psychrophilum suşu fenotipik ve genotipik özelliklerine göre tanımlama yapıldı.

Rapor içeriği için lütfen eke bakınız.

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :b4f9a5aad6

Belge Takip Adresi : <https://bapotomasyon.ksu.edu.tr/belgedogrula>

Adres : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni
Telefon : (344)280-2097
e-Posta:mikailozcan@ksu.edu.tr

Bilgi için: Mikail ÖZCAN
Unvan: Doç.Dr.
Telefon : (344)280-2097



DemirbaşTaşınır Alımları

Proje Kapsamında Demirbaş Niteliğinde Taşınır Alınmamıştır.

Proje Yürütücü Unvanı, Adı SOYADI	İmzası	Tarih
Doç.Dr. Mikail ÖZCAN		26-04-2024

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :b4f9a5aad6

Belge Takip Adresi : <https://bapotomasyon.ksu.edu.tr/belgedogrula>





**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM
ÜNİVERSİTESİ**

**KAHRAMANMARAŞ İLİNDEKİ GÖKKUŞAĞI
ALABALIĞI İŞLETMELERİNDE *Flavobacterium
psychrophilum*'un KONVEKSİYONEL KÜLTÜR VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI**

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**

2024 KAHRAMANMARAŞ

**KAHRAMANMARAŞ İLİNDEKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
İŞLETMELERİNDE *Flavobacterium psychrophilum*'un
KONVEKSİYONEL KÜLTÜR VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI**

Proje No: 2021/1-13 M (YLS)

Doç. Dr. Mikail ÖZCAN

Mihriban ÖZER

2024 KAHRAMANMARAŞ

ÖNSÖZ

Psikrofilozis (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkul hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS); *Flavobacterium psychrophilum* balıklarda neden olduğu, özellikle balıkçılık işletmelerinin kuluçkahanelerinde su sıcaklığının 10 °C'nin altına düştüğü durumlarda meydana gelen, septisemik karakterli, akut seyirli, epidemik ve öldürücü bir enfeksiyondur. Psikrofilozis, ilk defa ABD'nin batı Virginia eyaletinde 1941 ve daha sonra 1945 yıllarında görülmüştür. Son yıllarda hastalık dünyada birçok ülkede görülmektedir. Türkiye'de ilk olarak 1993 yılında yavru gökkuşağı alabalıklarında saptanmış ve daha sonraki yıllarda farklı bölgelere yayılarak balık üretim tesislerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmuştur. Enfeksiyona neden olan *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin fenotipik ve biyokimyasal özellikleri ile genotipik karakterleri ve antibiyotik duyarlılıkları izole edilen coğrafik bölgelere göre değişmektedir.

Araştırmada, Kahramanmaraş ilin bulunan gökkuşağı alabalığı işletmelerindeki alabalıklarda örnekler alınarak kültür yöntemi ile spesifik besiyerlerine ekimler yapıldı. Elde edilen saf suşlara biyokimyasal testler ve Biolog Systemi (The biolog GENIII micro plate) ile fenotipik identifikasyon, PCR (Polymerase Chain Reaction), ve Sekans Analizi ile moleküler tanımlama yapıldı. Böylece *Flavobacterium psychrophilum*'un bölgedeki yaygınlığı, Kahramanmaraş ilindeki dağılımı ve kaynakları tespit edildi. Ayrıca *Flavobacterium psychrophilum*'a karşı uygulanacak antibiyogram ile hastalığın yayılması önlenerek, sektörün verimliliği arttırılacaktır. Bu amaçla “**Kahramanmaraş ilindeki gökkuşağı alabalığı işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum*'un konveksiyonel kültür ve moleküler yöntemlerle tanımlanması**” başlıklı bilimsel araştırma projesi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi tarafından proje numarası 2021/1-13 M (YLS) ile desteklenmiştir. Destekleri için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

Projenin başlama tarihi 25.03.2021 ve bitiş tarihi 22.02.2024'tür.

Doç. Dr. Mikail ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER DİZİSİ	V
ÇİZELGELER DİZİSİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	6
2.1. Materyal	6
2.1.1. Çalışma alanı	6
2.1.2. Balık materyali	6
2.1.3. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un izolasyonunda kullanılan besiyerleri	6
2.1.4. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un identifikasyonunda kullanılan besiyerleri	8
2.1.4.1. Cytophaga Broth	8
2.1.4.2. Tryptone Yeast Extract Salts Broth (TYES-B)	9
2.1.4.3. Nitrat Broth	9
2.1.4.4. Oksidasyon- Fermentasyon Besiyeri (O/F)	9
2.1.4.5. Jelatin Hidrolizi	9
2.1.4.6. Metil Kırmızısı - Voges Proskauer (MR-VP)	9
2.1.4.7. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glikan)	9
2.1.4.8. Simmons Sitrat Yatık Agar	10
2.1.4.9. Tryptic Soy Agar (TSA)	10
2.1.4.10. Tryptic Soy Broth (TSB)	10
2.1.4.11. Plate Count Agar (PCA)	10
2.1.4.12. Mueller-Hinton Agar (MHA)	10
2.1.4.13. Kanlı Agar	10
2.1.4.14. MacConkey Agar (MCA)	10
2.1.4.15. NaCl içeren TYES	11
2.1.4.16. Triple Sugar İron Agar (TSIA)	11
2.1.4.17. İndol Besiyeri	11
2.1.4.18. Eskülin Besiyeri	11
2.1.4.19. Nişastalı Agar	11
2.1.4.20. Jelatin Broth	11
2.1.4.21. Kazein hidrolizi	12
2.1.4.22. Tween 20 ve 80 Hidrolizi	12
2.1.4.23. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)	12
2.1.4.24. Biolog Dehydrated Growth Agar	12
2.1.5. Kimyasallar ve Ayıraçlar	12
2.1.5.1. % 20 Potasyum Hidroksit	12
2.1.5.2. Hidrojen Peroksit (% 3'lük)	12
2.1.5.3. Gram Boyama Ayıraçları	12
2.1.5.4. Kovaks İndol Ayıracı	12
2.1.5.5. Oksidaz Ayıracı	13
2.1.5.6. Lugol Solusyonu (1/5)	13

2.1.5.7. 400 ppm Povidin/iodin Solüsyonu	13
2.1.5.8. Metil Kırmızısı Ayırıcı	13
2.1.5.9. Fenol Kırmızısı Ayırıcı (% 0,2'lik)	13
2.1.5.10. Nitrat A Ayırıcı	13
2.1.5.11. Nitrat B Ayırıcı.....	14
2.1.5.12. 1/80 Normal'lik Amonyum Oksalat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$)	14
2.1.5.13. 1/80 Normal'lik Potasyum Permanganat (KMnO_4).....	14
2.1.5.14. 1/3 Seyreltilmiş Sülfirik Asit (H_2SO_4)	14
2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İşleminde Kullanılan Ayıraçlar.....	14
2.1.6.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayıraçlar	14
2.1.6.1.1. Proteinase K Solüsyonu (100 mg, Sigma, P2308, St. Louis, MO)	14
2.1.6.1.2. TNES buffer tampon solüsyonu	14
2.1.6.1.3. Phenol Equilibrated, Stabilized: Chloroform: Isoamyl Lcohol 25:24:1 (A0889, AppliChem, Darmstadt).....	14
2.1.6.1.4. Natriumacetat Kristalle	15
2.1.6.1.5. Absolute Ethanol	15
2.1.6.2. DNA izolasyon kit kimyasalları.....	15
2.1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Analizinde Kullanılan Ayıraçlar	16
2.1.6.3.1. 10x PZR Buffer (MBI Fermentas).....	16
2.1.6.3.2. MgCl_2 (MBI Fermentas)	17
2.1.6.3.3. dNTP Set (100mM; dATP, dCTP, dGTP, dTTP; MBI Fermentas).....	17
2.1.6.3.4. Taq DNA Polymerase Enzimi (500 U; MBI Fermentas).....	17
2.1.6.3.5. Primerler.....	17
2.1.7. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar	17
2.1.7.1. 5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu	17
2.1.7.2. Agarose LE, (Promega, Madison).....	18
2.1.7.3. 100 bp DNA Ladder (50 μg /100 μl ; MBI Fermentas)	18
2.1.7.4. 6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (1 ml; MBI Fermentas)	18
2.1.7.5. Ethidium Bromide (10 mg/ml; AppliChem GmbH, Darmstadt)	18
2.1.8. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	18
2.1.9. Referans Kültür	19
2.1.10. Kullanılan Diğer Malzemeler	20
2.2. Metot.....	25
2.2.1. Balıkların toplanması ve taşınması	25
2.2.2. Balıklarda otopsi.....	26
2.2.3. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un izolasyonu	26
2.2.4. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un kültür ile identifikasyonu	26
2.2.4.1. Gram boyama.....	27
2.2.4.2. Katalaz testi	27
2.2.4.3. Fleksirubin pigment testi	27
2.2.4.4. Oksidaz (Sitokrom Oksidaz) testi	27
2.2.4.5. Kongo kırmızısı (Galaktozamin Glikan) testi.....	27
2.2.4.6. İndol testi ve hareket muayenesi.....	28
2.2.4.7. Metil red (MR) - Voges proskauer (VP) testleri.....	28
2.2.4.8. Nitrat redüksiyon testi	28
2.2.4.9. Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) testleri.....	28

2.2.4.10. Ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase (ONPG) testi.....	29
2.2.4.11. Dekarboksilase testi.....	29
2.2.4.12. Jelatin hidrolizasyon testi	29
2.2.4.13. Simmons sitrat testi	29
2.2.4.14. Üreaz testi	30
2.2.4.15. Hidrojen sülfür (H ₂ S) oluşumu	30
2.2.4.16. Glukoz ve laktoz testleri	30
2.2.4.17. Hemoliz testi	30
2.2.4.18. Nişasta hidrolizasyon testi	30
2.2.4.19. Eskülin hidrolizasyon testi.....	31
2.2.4.20. Kazein hidrolizasyon testi	31
2.2.4.21. Tween 20 ve tween 80 hidrolizasyon testi.....	31
2.2.4.22. Karbonhidrat fermentasyon testleri.....	31
2.2.4.23. Çeşitli sıcaklıklarda (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 °C) üreme.....	31
2.2.4.24. Çeşitli tuzluluk oranlarında (% 0.0, 0.5, 1.0, 2.0) üreme	32
2.2.4.25. Tryptic soy agar, tryptic soy broth, plate count, mueller-hinton kanlı ve macconkey agarlarda üreme	32
2.2.5. Biolog sistemi ile identifikasyon	32
2.2.6. Moleküler tanılama	34
2.2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)'unda <i>Flavobacterium</i> <i>psychrophilum</i> 'un teyit edilmesi için DNA izolasyonu	34
2.2.6.2. Kit ile kromozomal DNA izolasyonu.....	34
2.2.6.3. DNA'nın çoğaltılması için PZR karışımının hazırlanması ve uygulanması	35
2.2.6.4. DNA'nın jel elektroforezi.....	36
2.2.6.5. Kapiller elektroforez DNA sekanslama	36
2.2.7. Antibiyogram testler	38
2.2.8. Bakteri suşlarının stoklanması.....	38
2.2.9. Verilerin analizi	38
3. BULGULAR	39
3.1. Çalışma alanı.....	39
3.2. Balık	39
3.3. Su.....	40
3.4. Morfolojik bulgular	40
3.5. Fenotipik ve biyokimyasal bulgular	45
3.5.1. Klasik test bulgular	45
3.5.2. Biolog (The biolog GENIII micro plate) bulgular	50
3.6. Moleküler bulgular	53
3.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu bulguları	53
3.6.2. Sekans analizi bulgular	54
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Alabalık örneklerinin toplandığı işletmelerinin bulunduğu Kılavuzlu Baraj Gölü'nün lokasyonu	6
Şekil 2.2. DNA izolasyon kiti	15
Şekil 2.3. Lyse BG buffer	15
Şekil 2.4. Lysozyme (BL)	15
Şekil 2.5. RNase A.....	16
Şekil 2.6. Proteinase K buffer	16
Şekil 2.7. Sol T	16
Şekil 2.8. Wash TX1.....	16
Şekil 2.9. Wash TX2.....	16
Şekil 2.10. Stomacher homojenizatör.....	20
Şekil 2.11. Spin kolon tüpü.....	21
Şekil 2.12. Thermocycler (PZR cihazı)	21
Şekil 2.13. Mikrodalga fırın	22
Şekil 2.14. Elektroforez ve güç kaynağı.....	22
Şekil 2.15. Ultraviyole transillüminatör.....	22
Şekil 2.16. Dijital bakteriyolojik su banyosu	22
Şekil 2.17. -26 derin dondurucu	23
Şekil 2.18. Soğutmalı etüv	23
Şekil 2.19. Otoklav	23
Şekil 2.20. Laminer flow kabin	23
Şekil 2.21. Ultralow temperature-86 freezer.....	24
Şekil 2.22. Soğutmalı santrifüj	24
Şekil 2.23. Otomatik buz makinası.....	24
Şekil 2.24. Spektrofotometre.....	24
Şekil 2.25. Trinoküler biyolojik laboratuvar araştırma mikroskobu	25
Şekil 2.26. Eppendorf Santrifüj	25
Şekil 3.1. İşletmede görülen toplu alabalık ölümleri.....	41
Şekil 3.2. Hasta alabalıkta görülen asites.....	42
Şekil 3.3. Hasta alabalıkta görülen ekzoftalmus.....	42
Şekil 3.4. Hastalıklı alabalıklarda derinin renginden kararırma	42
Şekil 3.5. Hastalıklı alabalığın sırt ve kaval yüzgecinde oluşan beyaz renkteki lezyonlar.....	43
Şekil 3.6. Hastalıklı alabalıkta kaval yüzgecin tahrip olması ve radiusların ortaya çıkması.....	43
Şekil 3.7. Hastalıklı yavru alabalığın iç organlarının çıkarılması	44
Şekil 3.8. Hastalıklı yavru alabalığın karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi.....	44
Şekil 3.9. TYES-A agarda ilk ekimden sonra çoğunluğu sarı renkte olan karışık koloniler	45
Şekil 3.10. TYES –A agarda üreyen saf koloniler	46
Şekil 3.11. Gökkuşağı Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)'nda izole edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'nın biyolog tanılama sisteminin çıktıları.....	52
Şekil 3.12. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> DNA'larının, PZR'nunda analizi sonucu oluşan 396 bp'lik bantları gösteren agaroz jel; 1–19: <i>Flavobacterium psychrophilum</i> şüpheli örnekler; M: 100 bp'lik moleküler marker; N:	

	Negatif kontrol (E. coli) (MBI, Fermantas); P: Pozitif kontrol referans suş (<i>Flavobacterium psychrophilum</i> NCIMB 1947T).....	53
Şekil 3.13.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> DNA'larının, PZR'nda analizi sonucu oluşan 1089 bp'lik bantları gösteren agaroz jel; 1–12: <i>Flavobacterium</i> <i>psychrophilum</i> şüpheli örnekler; M: 100 bp'lik moleküler marker; N: Negatif kontrol (E. coli) (MBI, Fermantas); P: Pozitif kontrol referans suş (<i>Flavobacterium psychrophilum</i> NCIMB 1947T)	54
Şekil 3.14.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> suşlarından ileri okuma ile 16S sekans hizalaması.....	55
Şekil 3.15.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> 16S ribosomal RNA (Sequence ID: KU212250.1)'in NCBI'dan alınan consensüs dizisi	55
Şekil 3.16.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> sekans kromatogramı.....	58
Şekil 3.17.	Bir adet <i>Flavobacterium psychrophilum</i> sekans sonuçlarının NCBI'daki referans <i>Flavobacterium psychrophilum</i> suşlarıyla benzerlik açısından karşılaştırılması.....	59
Şekil 3.18.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> taksonunun hizalama (alignment) sonucu (Query: <i>Flavobacterium psychrophilum</i> , Sbjct: <i>Flavobacterium</i> <i>psychrophilum</i> 16S ribosomal RNA (Sequence ID: KU212250.1).....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un izolasyonu için hazırlanan besiyerleri.....	7
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler	17
Çizelge 2.3. Antibiyotik disklerin isimleri, miktarları ve standart zon çapları (Anonim, 2000; Anonim, 2001)	18
Çizelge 2.4. Mikroplakalarda kodlanan 94 adet karbon kaynağı ve kimyasal listesi (Anonim, 2008).....	33
Çizelge 2.5. ExoSAP Pürifikasyonu için reaksiyon karışımı.....	36
Çizelge 2.6. ExoSAP PCR protokolü	37
Çizelge 2.7. Cycle Sequencing PCR reaksiyon karışımı	37
Çizelge 2.8. Cycle Sequencing PCR protokolü.....	37
Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı işletme, balık türü, alındığı ili, balık ve örnek sayısı	39
Çizelge 3.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un fenotipik ve biyokimyasal özellikleri.....	47
Çizelge 3.3. İzole edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'un antibakteriyel duyarlılık durumları.....	50
Çizelge 3.4. Gökkuşuğu alabalığından izole edilen <i>Flavobacterium psychrophilum</i> 'nın Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) cihazı ile diğer fenotipik özellikleri.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
RTFS	: Rainbow Trout Fry Syndrome
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
dNTP	: Nükleotid
A	: Ademin
T	: Timin
G	: Guanin
C	: Sitozin
NCIMB	: National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria
CA	: Cytophaga Agar
CB	: Cytophaga Broth
MAOA	: Modified Anacker ve Ordal Agar
MAOB	: Modified Anacker ve Broth
TYES-A	: Tryptone Yeast Salt Agar
TYES-B	: Tryptone Yeast Salt Broth
EAO+FBS+A	: Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum+ Agar
EAO+FBS+ B	: Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth
TYESA+ T	: Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin
TYFBS-A	: Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum +Agar
FBS	: Fetal Bovine Serum
BHIA	: Brain Heart Infusion Agar
TSIA	: Triple Sugar İron Agar
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
PC	: Plate Count Agar
MCA	: MacConkey Agar
MHA	: Mueller-Hinton Agar
O/F	: Oksidasyon / Fermentasyon
MR	: Metil Red
VP	: Voges Proskauer
NB	: Nitrat Broth
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
TBE	: Trisbase boric acid- Ethylenediaminetetraacetic acid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
rRNA	: Ribosomal ribonucleic acid
RNA	: Ribonükleik asit
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TE	: Tris Edta
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
ONPG	: Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase
OD	: Ornitindekarboksilaz
TNES	: Tris, NaCl, EDTA, SDS,
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
H₂S	: Hidrojen sülfür
CN	: Gentamisin
AX	: Amoxicillin

AMC	: Amoksisilin/Klavulanik asit
AK	: Amikasin
AMP	: Ampisilin
C	: Kloramfenikol
CAZ	: Ceftriaxone
CZ	: Cefazolin
CEP	: Cefoperazone
İPM	: İmipenem
E	: Eritromisin
EN	: Enoxacin
CLR	: Clarithromycin
CIP	: Ciprofloxacin
F/M	: Nitrofurantoin
SMZ	: Sülphamethoxazole
P	: Penisilin
OT	: Oksitetrasiklin
PIL	: Piperacillin
FP	: Furazolidone
B	: Bacitracin
OP	: Optochin
BC	: Bactrim
ENR	: Enrofloksasin
FFC	: Florfenikol
S	: Streptomisin
N	: Neomisin
CC	: Klindamisin
OFX	: Ofloksasin
VA	: Vankomisin
NN	: Tobramisin
FOX	: Cefoxitin
NA	: Nalidixic Acid
NET	: Netilmicin
ATM	: Aztreonam
LC	: Linkomisin
TMP	: Trimetoprim

Kahramanmaraş ilindeki gökkuşuğu alabalığı işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum*'un konveksiyonel kültür ve moleküler yöntemlerle tanımlanması

ÖZET

Bu çalışma ile Kahramanmaraş ilinde bulunan bulunan 68 ayrı Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesinde yavruarda *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin belirlenip, fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması hedeflendi. Bu amaçla, Aralık 2022 ve Temmuz 2023 tarihleri arasında alabalık işletmelerinden 5 gramdan küçük yavru ve 5 gramdan büyük yavru örnekleri alındı.

Flavobacterium psychrophilum izolasyonu için; Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (CB), Modified Anacker ve Ordal agar (MAOA), Modified Anacker ve Ordal Broth (MAOB), Tryptone Yeast Salt Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Salt Broth (TYES-B), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum+ Agar (EAO+FBS+A), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+ B), Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin (TYESA+ T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum (TYFBS) agarlar kullanıldı. Bu besiyerleri 15 °C’de 5–7 gün süreyle etüvde inkübe edildi.

Üreyen saf sarı renkteki kolonilere biyokimyasal tanımlama testleri aynı sıra Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) uygulanıp fenotipik özellikleri incelendi. Biolog Sistemi ile identifiye edilen suşların Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğiyle teyit edilmesinde özel primer kullanıldı. Takiben bu suşların tamamının moleküler olarak teyit yapıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulanan suşların sekans analizi yapıldı ve analiz sonucu NCBI’daki referans bakteriye göre yorumlandı.

Sonuç olarak; 12 adet *Flavobacterium psychrophilum* suşu fenotipik ve genotipik özelliklerine göre tanımlama yapıldı.

Anahtar kelimeler: Gökkuşuğu alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*, Fenotipik, genotipik, *Flavobacterium psychrophilum*, BIOLOG GEN III, PZR, Sekans

Identification by convectional culture and molecular methods of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout farms in Kahramanmaraş province

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the phenotypic and genotypic characteristics of *Flavobacterium psychrophilum* bacteria in the fry of 68 different rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Kahramanmaraş province. For this purpose, fry smaller than 5 grams, fry larger than 5 grams, water and feed samples were taken from trout farms between December 2022 and July 2023.

For isolation of *Flavobacterium psychrophilum*; Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (CB), Modified Anacker and Ordal agar (MAOA), Modified Anacker and Ordal Broth (MAOB), Tryptone Yeast Salt Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Salt Broth (TYES-B), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum + Agar (EAO+FBS+A), Enriched Anacker And Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+B), Tryptone Yeast Salt Agar + Tobramycin (TYESA+T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum (TYFBS) agars were used. These media were incubated in an oven at 15 °C for 5-7 days.

The pure yellow colonies were subjected to biochemical identification tests as well as Biolog System (The biolog GENIII micro plate) and their phenotypic characteristics were examined. Special primers were used to confirm the strains identified with Biolog System by Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Subsequently, all of these strains were molecularly confirmed. Sequence analysis of the strains confirmed by PCR was performed and the result of the analysis was interpreted according to the reference bacteria in NCBI.

As a result; 12 *Flavobacterium psychrophilum* strains were identified according to their phenotypic and genotypic characteristics.

Key Words: Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Phenotypic, genotypic, *Flavobacterium psychrophilum*, BIOLOG GEN III, PCR, Sequence

1. GİRİŞ

Günümüzde balık, besin ihtiyacımızın önemli bir kısmını karşılamaktadır. Bu nedenle, tüm dünyada intensif kültür balıkçılığına verilen önem gün geçtikçe artmaktadır. Ancak gelişen intensif kültür balıkçılığı uygulamalarıyla birlikte balık hastalıkları da gittikçe sorun olmaya başlamıştır (Anderson, 1974).

Su ürünleri yetiştiriciliği tüm dünyada hızlı bir gelişme göstermektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun açıkladığı son rakamlara göre ülkemizde 2022 yılında, 335.003 tonu avcılıkla, 514.805 tonu yetiştiricilikle olmak üzere toplam 849.808 ton su ürünleri üretimi yapılmıştır. Kültür balığı üretiminin %28'ü içsularda; %72'si ise denizlerde gerçekleştirilmiştir. Yetiştirilen en önemli türler içsularda 145 bin 649 ton ile alabalık; denizlerde ise 156 bin 602 ton levrek ile 152 bin 469 ton çipura olmuştur (TÜİK, 2022).

Kahramanmaraş ilinde, su ürünleri açısından önem arz eden ve debisi 1000 litre/sn'nin üzerinde olan toplam 20 civarında akarsu varlığı mevcuttur. Bunların toplam uzunluğu 1034 km ve toplam debisi ise 60721 litre/sn dir. Bölgede 8 adet baraj gölü ve 7 adet gölet mevcut olup bunların oluşturduğu toplam yüzey alanı 18317 hektardır (Alp ve Büyükçapar, 2006).

Bölgede balık yetiştiriciliği tek bir tür üzerine olup, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimine dayanmaktadır. Kahramanmaraş iç sularında iki tür yetiştiricilik yöntemi olup, bunlardan birincisi kaynak yada akarsular üzerinde kurulan beton havuzlarda alabalık yetiştiriciliği ve ikincisi ise baraj göllerinde yapılan kafeslerde alabalık yetiştiriciliğidir (Alp ve Büyükçapar, 2006).

Kültür balıkçılığı nedeniyle çok sayıda balığın bir arada ve yakın temas halinde bulunması, doğada (dere, göl, gölet, deniz, vs) serbest yaşayanlara oranla, daha fazla hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Balıkların içinde yaşadıkları ortamın (tuzlu, acı, tatlı su) sınırlı olan besleyici, fiziksel, kimyasal, biyotik ve abiyotik optimal yaşam koşullarının olumsuz yönde değişmesi bunların kısa süre içinde düzelmemesi ve devam etmesi, özellikle, bir çok infeksiyöz hastalığın çıkmasına neden olmaktadır (Arda ve ark., 2005).

Kültür balıkçılığında bakteriyel kökenli balık hastalıkları, işletmelerde ekonomik kayıplara neden olan etkenlerin en önemlilerinden birini oluşturmaktadır. Hastalığın şiddeti, balığın yaşına ve türüne göre değişmektedir. Buna karşın balıklardaki birçok enfeksiyonun da tedavisi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Ancak çevre şartlarının

olumsuzluğu balıkların hastalıktan korunmasını ve kontrol önlemlerinin alınmasını zorlaştırmakta, hatta imkansız hale getirebilmektedir (Austin ve Austin, 1987; Buckley ve ark., 1998).

Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de alabalık üretimi yapılan işletmelerde oldukça sık rastlanan baslıca patojen bakteriyel etkenler (*Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Flexibacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Yersinia spp.*, *Renibacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, gibi) rapor edilmekle birlikte son yıllarda Gram pozitif kokların sporadik ve endemik olarak yayıldığı ve bunlardan altı farklı türün (*Streptococcus parauberis*, *Streptococcus diffcile*, *Streptococcus iniae*, *Vagococcus salmoninarum*, *Lactococcus piscium* ve *Lactococcus garvieae*) balık hastalıkları ile ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Kum ve ark., 2004; Supriyadi ve Rukyani, 1992; Egidius, 1987; Larsen ve ark., 1988; Eldar ve ark., 1999; Dalsgaard ve Madsen 2000; Roberts, 2001; Timur ve Timur, 2003; Timur ve Korun, 2004; Aydoğan, 2005; Avcı ve ark., 2010).

Flavobacterium psychrophilum A.B.D.’de ilk kez 1946’de Coho salmonlardan (*Oncorhynchus kisutch*) izole edilmiştir (Bernardet ve Keroualt, 1989; Inglis ve ark., 1993; Ekman, 2003; Cipriano ve Holt, 2005). *Salmo salar*, *Anguilla anguilla*, *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* gibi bir çok balık türünden bu patojenin izole edildiği ve önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Lehmann ve ark., 1991; Bernardet, 1997). Japonya’da da 1987’den beri doğal sulara ve *Plecaglossus altivelis* üretimi yapılan işletmelerde *Flavobacterium psychrophilum* ciddi sorunlar oluşturmuştur (Wakabayashi ve ark., 1994; Lido ve Mizokomi, 1996). Türkiye’de; gökkuşağı alabalığı işletmelerinde yavru alabalıklardan Flavobakterilerin izole edildiği bildirilmiş (Balta, 1997; Korun ve Timur, 2001), hatta 0.5 – 1.0 g’lık alabalıklarda yüksek mortaliteye (% 75) neden olduğu tespit edilmiştir (Balta, 1997). Ayrıca 1–5 g’lık alabalık yavrularında mortalite % 70 iken, 10–15 g’lık yavrularda % 10 olduğu belirlenmiştir (Austin ve Austin, 1987; Bernardet ve Keroualt, 1989; Austin, 1992).

Psikrofiloz (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkül hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome-RTFS); *Flavobacterium psychrophilum*’un neden olduğu, özellikle kuluçkahanelerde su sıcaklığının 10°C’nin altına düştüğü durumlarda meydana gelen, septisemik karakterli, akut seyirli, epidemik ve öldürücü bir enfeksiyondur. Bu nedenle işletmeler için ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Psikrofilozis, Türkiye’de ilk olarak 1993 yılında yavru gökkuşağı alabalıklarında saptanmış ve daha sonraki yıllarda farklı coğrafik bölgelere yayılarak balık üretim tesislerinde ciddi ekonomik kayıplara neden

olmuştur. Şimdiye kadar ülkemizde bu hastalık şubat-haziran aylarında yaygın halde görülmüş, yavru alabalıkların önemli bir bakteriyel hastalığı haline gelmiştir (Bernardet ve Keroualt, 1989; Austin, 1992; Lumsden ve ark., 1996; Diler ve ark., 2003; İspir ve ark., 2004; Arda ve ark., 2005).

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

Flavobacterium psychrophilum, hastalığa yol açtığı gibi alabalıkların deri, mukoza, yüzgeç, solungaç, operkulum, ovaryum sıvısı ve sindirim sisteminin doğal florasında da bulunmaktadır (Diler ve ark., 2000; Nematollahi ve ark., 2003; Arda ve ark., 2005; Kubilay ve ark., 2009a; Kubilay ve ark., 2009b). Ayrıca etkenin hasta anaç balıkların yumurtalarına, buradan da yavru balıklara bulaşabildiği bildirilmiştir (Balta, 1997; Diler ve ark., 2003). Çevresel faktörlerin (özellikle su sıcaklığının düşmesi, kalitesi düşük sular, balık popülasyonundaki artış, kötü bakım-besleme gibi) değişmesiyle etkenin virulensi artmakta ve enfeksiyona neden olmaktadır. Etken temas ve su yoluyla balıklar arasında hızlı bir şekilde yayılarak bulaştığından gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerde aşırı ölümlere ve sonuçta işletmelerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Cipriano ve Holt, 2005).

Hastalığın kontrolünde etkin bir aşı uygulamasının olmaması ve bakteriyel bir hastalık olması nedeniyle antibiyotik ile sağaltımı ön plana çıkmaktadır. Ancak kültür balıkçılığında yaygın olarak görülen bakteriyel hastalıkların tanı ve sağaltımında etken

izolasyonu ve identifikasyonu yapılmadan, bilinçsiz ve yaygın bir şekilde antibiyotik kullanımı, dirençli suşların gelişmesine neden olmakta ve sonuçta hastalıkların sağaltımında güçlüklerle karşılaşilmektedir (Faruk, 2000; Midtlyng, 2002; Cipriano ve Holt, 2005).

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

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

Fenotipik yöntem genetik özellikleri yansıtır ve genellikle spesifiktir. Belli bir fenotipik özellik patojen bir etkenden ender bulunuyorsa tek başına bu etkenin yayılma yolu hakkında fikir verebilir. Ancak her zaman görülebilen fenotipik özelliklere sahip olan etkenler söz konusu ise alt tiplendirme yapılmalıdır (Swaminathan ve Matar, 1993; Arda, 1995; Olive ve Bean, 1999).

Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate); 94 biyokimyasal test uygulanarak Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin tanımlanmasında kullanılır. Bu testler 71 karbon kaynağı kullanım deneylerine ve 23 kimyasal duyarlılık deneylerine dayanır. Biolog Mikrobiyal tanımlama sistemi (Mikro İstasyon Kimliği Sistemi) çok yönlü bir sistemdir. Mikrobiyolojinin çok geniş bir alanında çevresel ve patojenik organizmaların identifikasyonunda ve karakter özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır (Singh ve ark., 2011; Bochner, 1989a ve 1989b).

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

1980’li yıllardan beri 16S rRNA gen sekansı bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyaldir. 16S rRNA’nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara üniversal primerler denir. Çoğaltılan bölgeler aynı zamanda tür identifikasyonunu sağlayan özgün değişken bölgeleri de içerir. Bundan dolayı 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemleri insanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların identifikasyonunda kullanılan önemli bir yöntem halini almıştır (Carlos ve ark., 2001; Donnelly, 1986; Esteban ve ark., 2009).

16S rRNA gen bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için beşeri hekimlikte kullanılmaktadır. Artık sekansa dayalı moleküler identifikasyon veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin tanılanmasında da kullanılmaya başlanmıştır (Chai ve ark. 2003).

Bu proje ile, Kahramanmaraş il’indeki Gökkuşuğu Alabalığı İşletmelerinde balıklarda sıklıkla rastlanan Psikrofiloz (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkül hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS) hastalığına neden olan *Flavobacterium psychrophilum*’un izolasyonu, biyokimyasal testler ve Biolog Systemi (The biolog GENIII micro plate) ile fenotipik identifikasyon, PCR (Polymerase Chain Reaction) ve Sekans analizi ile genotipik tanımlama yapıldı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma alanı

Bu çalışma Kahramanmaraş ili Kılavuzlu Baraj Gölü'nde 18 adet işletmeden oluşmaktadır. Bu çalışmada kullanılacak alabalık örneklerinin toplandığı işletmelerin bulunduğu Kılavuzlu Baraj Gölü'nün lokasyonu Şekil 2.1.'de gösterildi.



Şekil 2.1. Alabalık örneklerinin toplandığı işletmelerinin bulunduğu Kılavuzlu Baraj Gölü'nün lokasyonu

2.1.2. Balık materyali

Balık örnekleri Aralık 2022 ve Temmuz 2023 tarihleri arasında 68 farklı işletmeden toplam 1.088 adet yavru Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) alındı.

2.1.3. *Flavobacterium psychrophilum*'un izolasyonunda kullanılan besiyerleri

Flavobacterium psychrophilum izolasyonu için Cytophaga Agar (CA), Cytophaga Broth (Sıvı besiyeri) (CB), Modified (Modifiye) Anacker ve Ordal Agar (MAOA), Modified Anacker ve Ordal Broth (MAOB), Tryptone (Tripton) Yeast Extract (Maya özü) Salt (Tuz) Agar (TYES-A), Tryptone Yeast Extract Salt Broth (TYES-B), Enriched (Zenginleştirilmiş) Anacker ve Ordal + Fetal Bovine (Sığır Fetüs) Serum + Agar

(EAO+FBS+A), Enriched Anacker ve Ordal + Fetal Bovine Serum + Broth (EAO+FBS+B), Tryptone Yeast Extract Salt Agar + Tobramycin (TYES-A+T) Tryptone Yeast Extract Fetal Bovine Serum Agar (TYFBS-A) spesifik besiyerleri (Çizelge 2.1) kullanıldı (Pacha, 1968; Daskalov ve ark., 1999; Austin ve Austin, 1999; Madetoja ve Wiklund, 2002; Starliper ve ark., 2007; Kumagai ve ark., 2004; Toshio ve ark., 2006; Stenholm ve ark., 2008; Holt ve ark., 1993; Holt, 1987; Vastos ve ark., 2003).

Çizelge 2.1. *Flavobacterium psychrophilum* 'un izolasyonu için hazırlanan besiyerleri

CYTOPHAGA AGAR Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Agar: 9 g Distile su: 1000 ml	CYTOPHAGA BROTH Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Distile su: 1000 ml
MODIFIED ANACKER VE ORDAL AGAR (MAOA) Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Agar: 10–12 g Distile su: 1000 ml	MODIFIED ANACKER VE ORDAL BROTH (MAOB) Tryptone: 0,5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,2 g Sodyum asetat: 0,2 g Distile su: 1000 ml
TRYPTONE YEAST EXTRACT SALT AGAR (TYES-A) Tryptone: 4 g Yeast extract: 0,4 g MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5 g CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,5 g Agar: 11g Distile su: 1000 ml	TRYPTONE YEAST EXTRACT SALT BROTH (TYES-B) Tryptone: 4 g Yeast extract: 0,4 g MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5 g CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,5 g Distile su: 1000 ml pH: 7,2

pH: 7,2	
ENRICHED ANACKER AND ORDAL + FETAL BOVINE SERUM+ AGAR (EAO+FBS AGAR) Tryptone: 5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5 g Sodyum asetat: 0.2 g Fetal Bovine Serum: 50 ml Agar: 10 g Distile su: 1000 ml	ENRICHED ANACKER AND ORDAL + FETAL BOVINE SERUM (EAO+FBS BROTH) Tryptone: 5 g Yeast extract: 0,5 g Beef extract: 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5 g Sodyum asetat: 0,2 g Fetal Bovine Serum: 50 ml Distile su: 1000 ml
TRYPTONE YEAST EXTRACT SALT AGAR+ TOBRAMYCİN (TYESA+ T) Tryptone: 4 g Yeast extract: 0,4 g MgSO ₄ .7H ₂ O: 0,5 g CaCl ₂ .2H ₂ O: 0,5 g Agar: 11g Tobramycin: 5 µg/ml Distile su: 1000 ml pH: 7.2	TRYPTONE YEAST EXTRACT FETAL BOVINE SERUM (TYFBS) AGAR Tryptone: 0,5 g Yeast Extract: 0,2 g Agar: 20 g FBS:50 ml Distile su: 1000 ml pH: 7,2

2.1.4. *Flavobacterium psychrophilum* 'un identifikasyonunda kullanılan besiyerleri

2.1.4.1. Cytophaga Broth

Cytophaga broth (sıvı besiyeri) hazırlanmasında; 0,5 g tripton, 0,5 g yeast extract, 0,2 g beef (sığır eti) extract, 0,2 g sodyum asetat ve 1000 ml distile su (pH 7,2–7,4) kullanıldı. Karışım hazırlandıktan sonra tüplere 4'er ml aktarıldı ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Kusuda, 1982; Wiklund ve ark., 1994; Soltani ve ark., 1995; Daskalov ve ark., 1999; Dalsgaard ve Madsen, 2000; Nematollahi ve ark., 2003; Cipriano ve Holt, 2005).

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

Tryptone yeast extract salts sıvı besiyerinin hazırlanmasında; 4 g tryptone, 0,4 g yeast extract, 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ve 1000 ml distile su (pH 7.2) kullanıldı. Karışım içerisindeki maddeler eriyene kadar 45–50 °C'ye ayarlı benmariye (Çalkalamalı su banyosuna) bırakıldı. Kapalı deney tüplerine 5 ml miktarında paylaştırıldı ve 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Holt ve ark., 1993).

2.1.4.3. Nitrat Broth

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

2.1.4.4. Oksidasyon- Fermentasyon Besiyeri (O/F)

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

2.1.4.5. Jelatin Hidrolizi

TYES agar hazırlanırken % 4 oranında jelatin ilave edilerek, 45–50 °C'ye ayarlı benmariden karışım homojen hale gelene kadar bekletildi ve pH'sı 7,2-7,4'e ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (Bilgehan 1995; İnce, 2010).

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

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

2.1.4.7. Kongo Kırmızısı (Galaktozamin Glikan)

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

2.1.4.8. Simmons Sitrat Yatık Agar

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

2.1.4.9. Tryptic Soy Agar (TSA)

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

2.1.4.10. Tryptic Soy Broth (TSB)

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

2.1.4.11. Plate Count Agar (PCA)

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

2.1.4.12. Mueller-Hinton Agar (MHA)

Mueller-Hinton Agar karışımından 34 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

2.1.4.13. Kanlı Agar

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

2.1.4.14. MacConkey Agar (MCA)

Macconkey Agar karışımından 51,5 g tartılarak 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda

sterilize edildi. Yaklaşık 45–50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Arda, 2000).

2.1.4.15. NaCl içeren TYES

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

2.1.4.16. Triple Sugar İron Agar (TSIA)

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

2.1.4.17. İndol Besiyeri

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

2.1.4.18. Eskülin Besiyeri

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

2.1.4.19. Nişastalı Agar

Nişastalı agar hazırlanmasında; 10 g beef extract, 10 g pepton, 5 g NaCl, nişasta 10 g, 20 g agar 1000 ml distile su ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Daha sonra 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi ve steril petri kaplarına dökülerek hazırlandı (Cowan, 1974; URL–1).

2.1.4.20. Jelatin Broth

Jelatin broth hazırlanmasında; 10 g sığır ekstraktı, 10 g pepton, 5 g NaCl 1000 ml distile su, % 10 oranında jelatin ilave edilerek eriyene kadar benmaride bekletildi. Kapaklı deney tüplerine 5 ml miktarında paylaştırıldı ve 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edildi (URL–1).

2.1.4.21. Kazein hidrolizi

TYES agara % 2 süt tozu ilave edilerek hazırlandı.

2.1.4.22. Tween 20 ve 80 Hidrolizi

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

2.1.4.23. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

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

2.1.4.24. Biolog Dehydrated Growth Agar

Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) Biolog Dehydrated Growth Agar hazır olarak alındı ve kullanıldı.

2.1.5. Kimyasallar ve Ayıraçlar

2.1.5.1. % 20 Potasyum Hidroksit

Potasyum Hidroksit (KOH) 20 g,

Distile su 100 ml ilave edilerek hazırlanır.

2.1.5.2. Hidrojen Peroksit (% 3'lk)

H₂O₂ 3 ml,

Distile su 100 ml ilave edilerek hazırlanır.

2.1.5.3. Gram Boyama Ayıraçları

a) Kristal viole eriği

b) Lugol eriği

c) % 96'lık etil alkol

d) Sulu fuksin eriği

2.1.5.4. Kovaks İndol Ayıracı

İsoamylalkol 15 ml,

p-dimethylaminobenzaldehit 1 g,

konsantre HCl 5 ml,

p-dimethylaminobenzaldehit isoamylalkol içinde 50–55 °C'lik su banyosunda eritildi ve soğutuldu. Asit ilave edildi (Cowan, 1974).

2.1.5.5. Oksidaz Ayıracı

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1 g,

Distile Su 100 ml,

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

2.1.5.6. Lugol Solusyonu (1/5)

Lugol (stok) solusyonu:

İyot 5 g,

K-iyodür 10 g,

Distile su 100 ml,

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

Stok lugol solusyonu 1 ml,

Distile su 5 ml,

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

2.1.5.7. 400 ppm Povidin/iodin Solüsyonu

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

2.1.5.8. Metil Kırmızısı Ayıracı

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

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

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

2.1.5.10. Nitrat A Ayıracı

1 g sülfanilik asit,

100 ml N asetik asit ilave edilerek hazırlandı.

2.1.5.11. Nitrat B Ayıracı

0,6 ml alfa-naftilamin,

100 ml N asetik asit ilave edilerek hazırlandı.

2.1.5.12. 1/80 Normal’lik Amonyum Oksalat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$)

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

2.1.5.13. 1/80 Normal’lik Potasyum Permanganat (KMnO_4)

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

2.1.5.14. 1/3 Seyreltilmiş Sülfirik Asit (H_2SO_4)

Bir hacim H_2SO_4 3 hacim safsu eklenerek hazırlandı.

2.1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İşleminde Kullanılan Ayraçlar

2.1.6.1. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Ayraçlar

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

Mililitresinde 100 µg olacak şekilde hazırlandı.

2.1.6.1.2. TNES buffer tampon solüsyonu

20 mM Tris, pH 8,0,

150 mM NaCl,

10 mM EDTA,

% 0,2 SDS,

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

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

Phenol equilibrated, stabilized 500 ml/l

Chloroform 480 ml/l

Isoamyl alcohol 20 ml/l

pH (20 °C) 7,6–8,0

Bu karışımdan her bir örnek için 600 µl miktarında kullanıldı.

2.1.6.1.4. Natriumacetat Kristalle

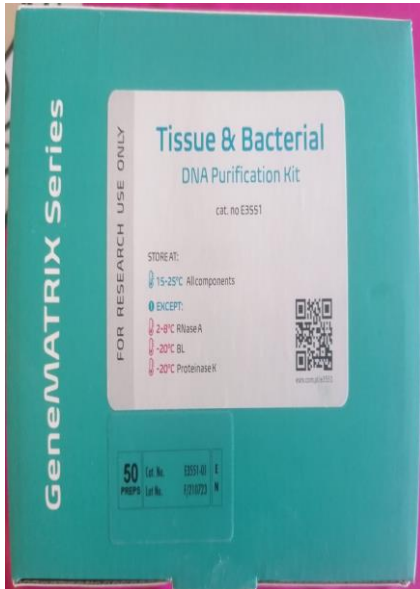
DNA'nın presipitasyonu amacı ile süspansiyona 0,1 volüm (3M) miktarında ilave edildi.

2.1.6.1.5. Absolute Ethanol

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

2.1.6.2. DNA izolasyon kit kimyasalları

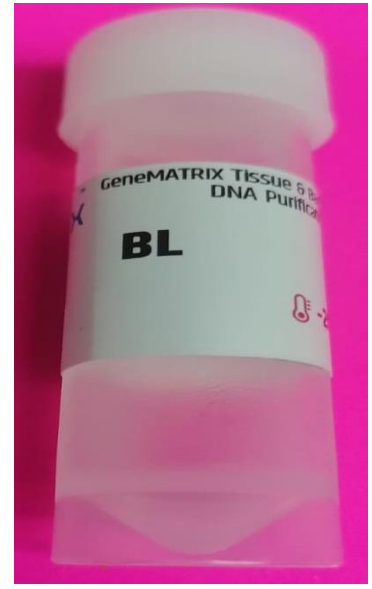
Kromozomal DNA, klonlanacak genlerin çoğaltılmasında kullanılmak için Tissue and Bacterial DNA purification kiti (GeneMATRIX) kullanılarak yapıldı (Şekil 2.2). Bu kit lyse BG buffer (Şekil 2.3), lysozyme (BL) (Şekil 2.4), RNase A (Şekil 2.5), Proteinase K (Şekil 2.6), Sol T (Şekil 2.7), Wash TX1 (Şekil 2.8), Wash TX2 (Şekil 2.9) ve Elution (Şekil 2.10) den oluşmaktadır.



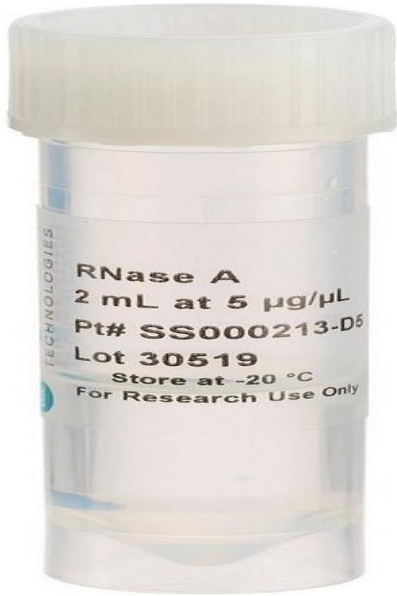
Şekil 2.2. DNA izolasyon kiti



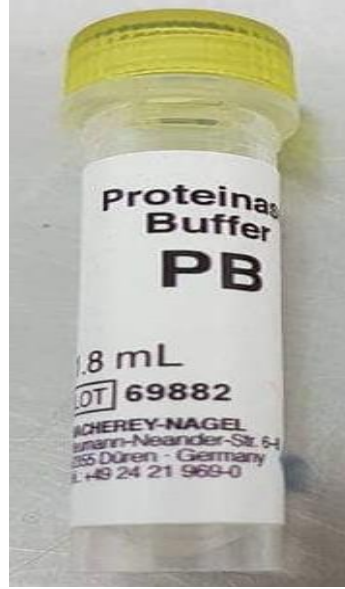
Şekil 2.3. Lyse BG buffer



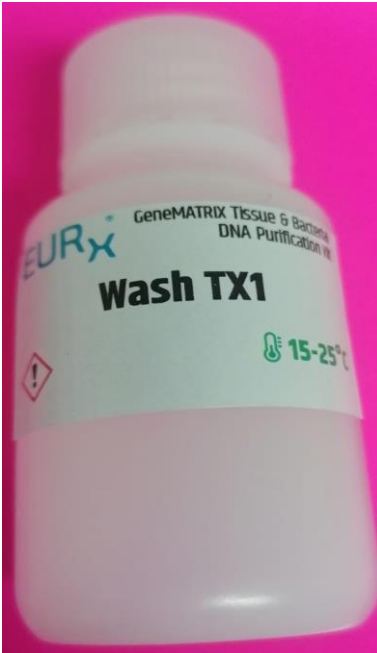
Şekil 2.4. Lysozyme (BL)



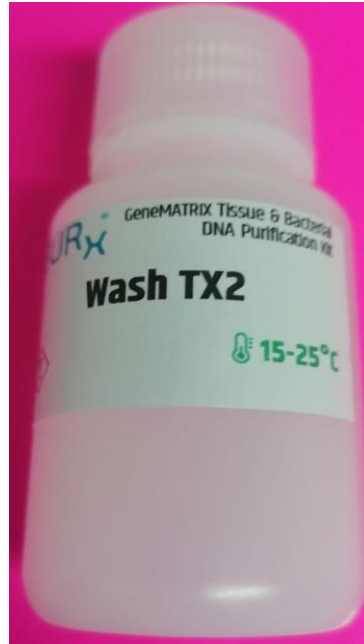
Şekil 2.5. RNase A



Şekil 2.6. Proteinase K Şekil 2.7. Sol T
buffer



Şekil 2.8. Wash TX1



Şekil 2.9. Wash TX2

2.1.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Analizinde Kullanılan Ayırıcılar

2.1.6.3.1. 10x PZR Buffer (MBI Fermentas)

750 mM Tris-HCl (pH 8,8; 25 °C),

200 mM (NH₄)₂SO₄,

% 0,1 Tween 20,

Her PZR numunesi için 5 µl kullanıldı.

2.1.6.3.2. MgCl₂ (MBI Fermentas)

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

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

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

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

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

2.1.6.3.5. Primerler

Çalışmada kullanılan tüm primerler Integrated DNA Technologies (IDT) firmasından temin edildi (Çizelge 2.2). Primerler her PZR numunesi için ortalama 25–50 pmol olacak şekilde sulandırıldı.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primerler

Bakteri türü	Primerler
Flavobacterium	PSY1 190–206 (GTT GGC ATC AAC ACA CT) PSY2 1278–1262 (CGA TCC TAC TTG CGT AG)
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	GYRA-FP1F (5'-GAAACCGGTGCACAGAAGG-3') GYRA-FP1R (5'-CCTGTGGCTCCGTTTATTAA-3')

2.1.7. Elektroforez İşleminde Kullanılan Ayıraçlar

2.1.7. 1. 5x Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tampon Solüsyonu

Tris 54,4 g,

Borik Asit 27,2 g,

EDTA 4,6 g,

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

2.1.7.2. Agarose LE, (Promega, Madison)

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

2.1.7.3. 100 bp DNA Ladder (50µg/100µl; MBI Fermentas)

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

2.1.7.4. 6x Loading Dye (Yükleme Boyası) Solüsyonu (1 ml; MBI Fermentas)

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

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

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

2.1.8. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışma kapsamında kullanılan antibiyotik tanı disklerinin isimleri ve miktarları aşağıdaki çizelge 2.3'de verildi.

Çizelge 2.3 Antibiyotik disklerin isimleri, miktarları ve standart zon çapları (Anonim, 2000; Anonim, 2001)

Antibakteriyel ilaçlar ve disk içerikleri (µg /Ü)	Dirençli mm (R)	≤ Orta duyarlı mm (I)	derece Duyarlı mm (S)	≥
Gentamisin (CN) (10 µg)	12	13–14	15	
Amoxicillin (AX) (25 µg)	8	9–10	11	
Amoksisilin/Klavulanik asit (AMC) (30 µg)	14	15–19	20	
Amikasin (AK) (30 µg)	14	15–16	17	
Ampisilin (AMP) (10 µg)	13	14–16	17	
Kloramfenikol (C)(30 µg)	12	13–17	18	
Ceftriaxone (CAZ) (30 µg)	2	3	4	
Cefazolin (CZ)(30 µg)	14	15–17	18	
Cefoperazone (CEP)(75 µg)	15	16–20	21	
İmipenem (İPM) (10 units)	13	14–15	16	

Eritromisin (E) (15 µg)	13	14–22	23
Enoxacin (EN) (10 µg)	14	15–17	18
Clarithromycin (CLR) (15 µg)	13	14–17	18
Ciprofloxacin (CIP) (5 µg)	15	16–20	21
Nitrofurantoin (F/M) (300 µg)	14	15–16	17
Sülphamethoxazole (SMZ) (100 µg)	10	11–15	16
Penisilin (P) (10 Ünite)	14	-	15
Oksitetrasiklin (OT) (30 µg)	14	15–18	19
Piperacillin (PIL) (100 µg)	17	18–20	21
Furazolidone (FP) (100 µg)	10	11–12	13
Bacitracin (B) (30 µg)	8	9–12	13
Optochin (OP) (30 µg)	5	6–14	15
Bactrim (BC) (1,25µg+23,7 µg)	19	20–28	29
Enrofloksasin (ENR) (5 µg)	15	16–20	21
Florfenikol (FFC) (30 µg)	14	15–18	19
Streptomisin (S) (10 µg)	11	12–14	15
Neomisin (N) (30 µg)	12	13–16	17
Klindamisin (CC) (2 µg)	15	16–18	19
Ofloksasin (OFX) (5 µg)	12	13–15	16
Vankomisin (VA) (30 µg)	14	15–16	17
Tobramisin (NN) (10 µg)	12	13–14	15
Cefoxitin (FOX) (30µg)	14	15–17	18
Nalidixic Acid (NA) (30µg)	13	14–18	19
Netilmicin (NET) (30 µg)	12	13–14	15
Aztreonam (ATM) (30 µg)	15	16–21	22
Linkomisin (LC) (10 µg)	9	10–11	12
Trimetoprim (TMP) (5µg)	20	21–28	29

2.1.9. Referans Kültür

İşletmelerden izole edilen *Flavobacterium psychrophilum* şüpheli izolatların fenotipik özelliklerinin belirlenmesi; Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) tekniğinin

herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek ve uygun DNA ekstraksiyon amacıyla *Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947^T referans suşu İspanya’da bulunan Centro de Biotecnología Animal laboratuvarından, *Esherichia coli* ise Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim dalından temin edildi.

2.1.10. Kullanılan Diğer Malzemeler

Yavru üretimi yapan 68 farklı işletmede Besin keseli yavru ve yavruların kuluçka dolabında, kuluçka teknesinde ve havuzlardan alınması için 10–40 cm yarıçaplı kepçeler; yavruların taşınmasında kullanılan 10–20 litre’lik plastik poşetlerden yararlanıldı. Besin keseli yavru ve 5 g’dan küçük yavruların ezilmesi için kullanılan steril örnek poşeti ve Stomacher homojenizatörden (Bagmixer) (Şekil 2.10) faydalanıldı.



Şekil 2.10. Stomacher homojenizatör

Otopsi işleminde kullanılan malzemeler; eldiven, büyük ve küçük düz diseksiyon makasları, bistüri, pensler, büyüteç oluşmaktadır.

Laboratuvarıda; spor, bek alevi, öze değişik ebatlarda petri kutuları, pipet, beher glass, balon, mezür, lam ve lamel, piset, spin kolon tüpü (Şekil 2.11), zirkonyum boncukları, gibi cam metal ve plastik malzemelerden yararlanıldı. PZR siklusları için gerekli sıcaklık ve zamanın programlanabildiği ısıtma bloklarına sahip DNA Thermocycler

(termal çevirici-PZR- cihazı) (Thermo scientific) (Şekil 2.12), agaroz jel hazırlamada kullanılan mikrodalga fırın (Arçelik MD574) (Şekil 2.13) elektroforez ve güç kaynağı (Thermo scientific) (Şekil 2.14), ultraviyole transillüminatör (Thermo scientific) (Şekil 2.15), dijital bakteriyolojik su banyosu (NÜVE ST30) (Şekil 2.16), -26 derin dondurucu (Siemens GS33VW30N) (Şekil 2.17), Soğutmalı etüv (Lovibond) (Şekil 2.18), Otoklav (Nüve OTO12) (Şekil 2.19), Laminer flow kabin (Nüve LN120) (Şekil 2.20), Ultralow temperature-86 freezer (BXC-86) (Şekil 2.21), soğutmalı santrifüj (Elektromag M 4808 P) (Şekil 2.22), Otomatik buz makinası (LAB312) (Şekil 2.23), Spektrofotometre (RAY LER GH UV-1601) (Şekil 2.24), trinoküler biyolojik laboratuvar araştırma mikroskobu (9 mp kamera +yazılım) (SOIF) (Şekil 2.25), Eppendorf Santrifüj (Allsheng Mini- 15K) (Şekil 2.26), Binoküler Mikroskop (NİKON E100), Stereo Mikroskop (Olympus SZ51), Öğrenci mikroskobu (XDS-1B), Buzdolabı (Vestel) Kuru Hava Sterilizatörü (Binder FD 115), Hassa terazi (Shinko Denshi HJ-1200CE), Distile su cihazı (Nüve-NS 108), Vortex cihazı (Dragon LAB MX F), Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı (SCI FİNETECH), Mcfarland Densitometre (DEN 1 MOD BS101040), Bakteri koloni sayım makinası (JK-CC 90407) Elektrikli pipet (JOANLAB), Masa Tipi pH Metre (WTW 3210 SET) ve Otomatik mikropipet seti (Thermo Scientific) kullanıldı.



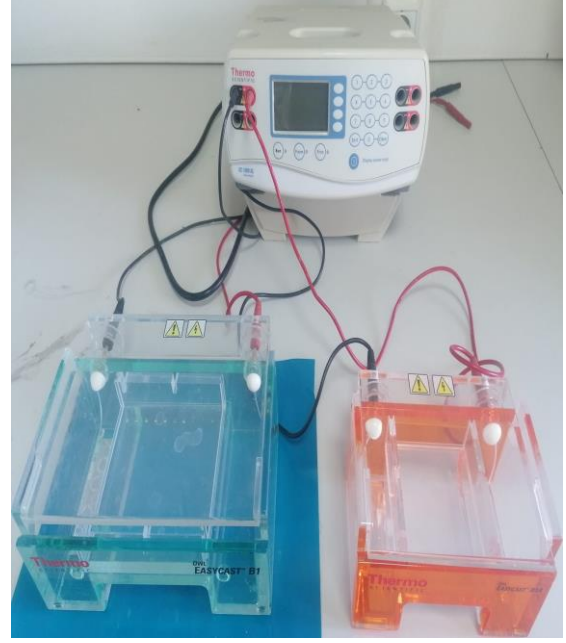
Şekil 2.11. Spin kolon tüpü



Şekil 2.12. Thermocycler (PZR cihazı)



Şekil 2.13. Mikrodalga fırın



Şekil 2.14. Elektroförez ve güç kaynağı



Şekil 2.15. Ultraviyole transillüminatör



Şekil 2.16. Dijital bakteriyojik su banyosu



Şekil 2.17. -26 derin dondurucu



Şekil 2.18. Soğutmalı etüv



Şekil 2.19. Otoklav



Şekil 2.20. Laminer flow kabin



Şekil 2.21. Ultralow temperature-86 freezer



Şekil 2.22. Soğutmalı santrifüj



Şekil 2.23. Otomatik buz makinası



Şekil 2.24. Spektrofotometre



Şekil 2.25. Trinoküler biyolojik laboratuvar araştırma mikroskobu



Şekil 2.26. Eppendorf Santrifüj

2.2. Metot

2.2.1. Balıkların toplanması ve taşınması

Kahramanmaraş ilinde bulunan 68 adet Gökkuşığı alabalığı işletmelerine 30 günlük periyotlar halinde 8 ay boyunca devamı gidildi. Her gidişte işletmelerdeki balıklar hastalıklar yönünden canlı muayeneleri yapıldı. İşletme sahibinden gerekli hastalık bilgileri (anamnez) alındı. Hastalık belirtisi olan balıklar örnekleme için seçildi ve balıklar havuzlardan kepçe yardımıyla alındı. İşletmelerden alınan hastalık şüphesi olan balıklar içerisinde hava bulunan balık taşıma poşetleriyle canlı olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarına getirildi.

2.2.2. Balıklarda otopsi

Hastalık şüphesiyle labaratuvara getirilen balıklar dış muayeneden geçirildi. Balıkların vücut yüzeyi % 70'lik etil alkolle dezenfekte edildi. Laboratuvar ortamında steril kabinde bünzen bek alevi önünde steril makas, pens, bistüri kullanılarak otopsi tekniğine (Frerichs ve Millar, 1993; Çolak, 1982; Timur ve Timur, 2003; Arda ve ark., 2005) göre yapıldı.

2.2.3. *Flavobacterium psychrophilum*'un izolasyonu

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

2.2.4. *Flavobacterium psychrophilum*'un kültür ile identifikasyonu

CA, TYES-A, MAOA, EAO+FBS+A, TYES + TOBRAMYCİN+A besiyerlerinde üreyen sarı renkteki kolonilerden alt kültür elde etmek için TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerlerine ekimler yapıldı. Bu kolonilerden gram boyanma yapılarak etkenin boyama özelliği ve kültürün saflığı kontrol edildi. Gram negatif ve çomak şekilli bakterilerden öncelikle katalaz ve fleksirubin pigment testleri yapıldı. Bu testlerden katalaz yarı pozitif ve fleksirubin pigment oranj (portakal renginde) renk gösteren bakterilere; sitokrom oksidaz, metil red (MR), voges proskauer (VP), oksidasyon-fermentasyon (O/F), nitrat, kongo kırmızısı, sitrat, indol, ortho-nitrophenyl-beta-d-galactosidase (ONPG), dekarboksilase (OD), üreaz, hidrojen sülfür (H₂S) testleri ile karbonhidratların fermentasyonu, jelatin, hemoliz, nişasta, eskülün, kazein, tween 20 ve tween 80 hidrolizi

gibi biyokimyasal testleri uygulandı ve hareket muayenesi yapıldı (Bilgehan 1995; Lorenzen, 1994; Lorenzen ve ark., 1997).

2.2.4.1. Gram boyama

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyeri üzerinde üreyen sarı renkteki her bir koloniden preparatlar hazırlanarak gram boyama yapıldı ve mikroskop altında bakterilerin gram boyama özelliklerine bakıldı (Cowan, 1974; Bilgehan, 1995).

2.2.4.2. Katalaz testi

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

2.2.4.3. Fleksirubin pigment testi

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

2.2.4.4. Oksidaz (Sitokrom Oksidaz) testi

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

2.2.4.5. Kongo kırmızısı (Galaktozamin Glikan) testi

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

2.2.4.6. İndol testi ve hareket muayenesi

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

2.2.4.7. Metil red (MR) - Voges proskauer (VP) testleri

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

2.2.4.8. Nitrat redüksiyon testi

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

2.2.4.9. Oksidasyon/Fermentasyon (O/F) testleri

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kolonilerinden steril iğne uçlu bir öze yardımıyla bol miktarda alınarak, 2 tüpte bulunan Hugh ve Leifson besiyerine dik bir şekilde ekim yapıldı. Tüplerden birisine 1cm kalınlıkta olacak biçiminde sıvı steril parafin ilave edildi. Diğer tüpe ise herhangi bir işlem uygulanmadı. Tüplerin ağzı iyice kapatılarak 15 °C’de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Parafinli tüpte sarı renk oluşumu fermentasyon pozitif, parafinsiz tüpte sarı renk oluşumu

ise oksidasyon pozitif, her iki tüpte de sarı renk oluşması oksidasyon/fermentasyon pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995; Arda, 2000).

2.2.4.10. Ortho-Nitrophenyl-Beta-D-Galactosidase (ONPG) testi

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

2.2.4.11. Dekarboksilase testi

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

2.2.4.12. Jelatin hidrolizasyon testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, % 4 jelatin içeren TYES besiyerine ekim yapılarak 15 °C'de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Bu besiyerinde üreyen kolonilerin üzerine amonyum sülfat çözeltisi döküldü. Jelatini hidrolize eden kolonilerin etrafında açık-şeffaf bir zon oluşumu, pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995; İnce 2010).

2.2.4.13. Simmons sitrat testi

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

2.2.4.14. Üreaz testi

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

2.2.4.15. Hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu

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

2.2.4.16. Glukoz ve laktoz testleri

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

2.2.4.17. Hemoliz testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde % 5 koyun kanı bulunan TYES agara ekim yapılarak 15 °C’de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyerinde üreyen kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon beta hemoliz, yeşil zon ise alfa hemoliz olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

2.2.4.18. Nişasta hidrolizasyon testi

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, nişastalı agara ekim yapılarak 15 °C’de 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyeri üzerinde üreyen kolonilere 1/5’lik lugol solusyonundan bir damla damlatıldı ve 5 dakika sonra bu solüsyon

döküldü. Koloni etrafında şeffaf zon oluşumu pozitif, koloni etrafında zon oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (URL-1).

2.2.4.19. Eskülin hidrolizasyon testi

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

2.2.4.20. Kazein hidrolizasyon testi

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

2.2.4.21. Tween 20 ve tween 80 hidrolizasyon testi

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

2.2.4.22. Karbonhidrat fermantasyon testleri

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, içerisinde farklı karbonhidratlar (arabinoz, mannitol, rafinoz, ramnoz, salisin, sorbitol, sakkaroz, trehaloz, ksiloz) ve asitlik indikatörü bulunan besiyerlerine ekim yapılarak 15 °C'de 5-7 gün süreyle inkube edildi. Pembe rengin kırmızıya dönüştüğü tüpler pozitif olarak değerlendirildi (Austin ve Austin 1987; Bilgehan, 1995) .

2.2.4.23. Çesitli sıcaklıklarda (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 °C) üreme

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, TYES-A ve

TYES-B besiyerlerine ekimler yapıldı ve 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 37 °C’lerde 5–7 gün süreyle inkübe edildi. Besiyerlerinde üremenin varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.4.24. Çeşitli tuzluluk oranlarında (% 0.0, 0.5, 1.0, 2.0) üreme

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

2.2.4.25. Tryptic soy agar, tryptic soy broth, plate count, mueller-hinton kanlı ve macconkey agarlarda üreme

TYES-A ve EAO+FBS+A besiyerinde üreyen şüpheli *Flavobacterium psychrophilum* kültürlerinden steril bir öze yardımıyla bol miktarda alınıp, Tryptic Soy Broth, Tryptic Soy, Plate Count, Mueller-Hinton, Kanlı ve Macconkey agarlara ekimler yapılarak 15 °C’de 5–7 gün süreyle etüvde edildi. Besiyerlerinde üremenin oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

2.2.5. Biolog sistemi ile identifikasyon

Biolog Sistemi (The Biolog GEN III MicroPlate), bir mikroorganizmayı 94 fenotipik test yönünden analiz etmektedir (Çizelge 2.4). Bunlar 71 farklı karbon kaynağının kullanımı ve 23 kimyasala karşı hassasiyet (engelleyici kimyasallara dayanıklılık) testinden oluşmaktadır. Bu çalışmada kullanılan The Biolog GEN III MicroPlate plakaları (BIOLOG 21124 Cabot Blvd. Hayward, CA 94545), Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin tür seviyesinde tanımlanması için 94 biyokimyasal testin kullanıldığı, standart bir mikrometod sistemidir (Bochner, 1989a ve 1989b).

Metabolik profillerin belirlenip tanımlanmada kullanma metoduna göre; tanısı yapılacak isolatlar Triptik Soy Agar (TSA)’ a 24°C’de 48 saat inkübe edildi. Biolog IF-A tampon çözeltisinde süspansiyon hazırlandı. Standart turbidity tüpünde, bakteri konsantrasyonu turbidimetre ile % 92-98 olarak ayarlandı. Yoğunlukları ayarlandı ve bakteriyel süspansiyonları mikrolakalardaki her bir çukura 100 µl konuldu ve 26 °C’de 4-24 saat inkübasyona bırakıldı (Anonim, 2008). Sonrasında mikrolaka okuyucuda okutulmuş sistemin veri bankası ile karşılaştırıldı ve bakteri teşhisi gerçekleştirildi.

Çizelge 2.4. Mikroplakalarda kodlanan 94 adet karbon kaynağı ve kimyasal listesi (Anonim, 2008)

A1 Negative Control	A2 Dextrin	A3 D- Maltose	A4 DTrehalo se	A5 DCellobio se	A6 Gentiobiose	A7 Sucrose	A8 D-Turanose	A9 Stachyose	A10 Positive Control	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D- Raffinose	B2 α -D- Lactose	B3 DMelibio se	B4 β -Methyl- DGlucosi de	B5 D-Salicin	B6 N-Acetyl- DGlucosami ne	B7 N-Acetyl- β - DMannosami ne	B8 N-Acetyl- DGalactosami ne	B9 N-Acetyl Neuramin ic acid.	B10 1% NaCl	B11 4% NaCl	B12 8% NaCl
C1 α - DGlucose	C2 D- Mannose	C3 D- Fructose	C4 DGalacto se	C5 3-Methyl Glucose	C6 D-Fucose	C7 L-Fucose	C8 L-Rhamnose	C9 Inosine	C10 1% Sodium Lactate	C11 Fusidic Acid	C12 D-Serine
D1 D-Sorbitol	D2 D- Mannitol	D3 D- Arabitol	D4 Myo Inositol	D5 Glycerol	D6 D-Glucose- 6-PO4	D7 D-Fructose- 6-PO4	D8 D-Aspartic Acid	D9 D-Serine	D10 Troleandomy cin	D11 Rifamycin SV	D12 Minocycli ne
E1 Gelatin	E2 Glycyl-L- Proline	E3 L- Alanine	E4 L- Arginine	E5 L-Aspartic Acid	E6 L-Glutamic Acid	E7 L-Histidine	E8 L- Pyroglutamic Acid	E9 L-Serine	E10 Lincomycin	E11 Guanidine HCl	E12 Niaproof 4
F1 Pectin	F2 D- Galacturon ic Acid	F3 L- Galactoni c Acid Lactone	F4 D- Gluconic Acid	F5 D Glucuroni c Acid	F6 Glucuronami de	F7 Mucic Acid	F8 Quinic Acid	F9 DSacchar ic Acid	F10 Vancomycin	F11 Tetrazoliu m Violet	F12 Tetrazoliu m Blue
G1 p- Hydroxy- Phenylacet ic Acid	G2 Methyl Pyruvate	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester	G4 L-Lactic Acid	G5 Citric Acid	G6 α -Keto Glutaric Acid	G7 D-Malic Acid	G8 L-Malic Acid	G9 Bromo- Succinic Acid	G10 Nalidixic Acid	G11 Lithium Chloride	G12 Potassium Tellurite
H1 Tween 40	H2 γ -Amino- Butyric Acid	H3 α - Hydroxy- Butyric Acid	H4 β - Hydroxy- D,LButyri c Acid	H5 α -Keto- Butyric Acid	H6 Acetoacetic Acid	H7 Propionic Acid	H8 Acetic Acid	H9 Formic Acid	H10 Aztreonam	H11 Sodium Butyrate	H12 Sodium Bromate

2.2.6. Moleküler tanılama

2.2.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)'unda *Flavobacterium psychrophilum*'un teyit edilmesi için DNA izolasyonu

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

2.2.6.2. Kit ile kromozomal DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda Tryptone Yeast Extract Salt Agara (TYES-A) besiyeri ortamında 24°C'de 48 saatte büyütülmüş bakterilerin kullanımıyla gerçekleştirildi. Kromozomal DNA izolasyonu için *Flavobacterium psychrophilum* suşundan Tissue and Bacterial DNA purification kiti kullanıldı.

Kiti ile DNA izolasyon için Bakteri kolonisi 24 saat önce ekilmiş besiyerinde alındı. Bu koloni içerisinde 100 µl steril saf su bulunan 1,5 ml ependof tube içerine

karıştırıldı ve üzerine 300 µl lyse BG buffer eklendi. Bu süspansiyona 50 µl tampon BL ve 2 µl RNase A eklendi ve vortex yapıldı. Bu karışım 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 20 ul Proteinaz K eklendi ve 3 saniye vortekslendikten sonra çalkalamalı su banyosunda 56°C'de 30 dakika inkübe edildi. Su banyosundan alınan örneklerle 350 ul tampon Sol T eklendi ve 3 saniye vortex yapıldı ve tekrar çalkalamalı su banyosunda 56°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyondan sonra örnekler 15 saniye boyunca vortekslendi ve 12 000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra bu karışım toplama tüpünün içinden bulunan DNA bağlama spin (arıtma) kolon tüpüne aktarıldı ve 11 000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Sıvının tamamı spin (arıtma) kolonundan geçene kadar santrifüjlenme devam etti. Sıvı içeren alttaki tüp boşaltıldı ve boşaltılan tüp tekrar spin kolonun altına yerleştirildi. Spin (arıtma) kolonuna 500 ul Wash TX1 tamponu eklendi ve 11 000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Spin (arıtma) kolonun altındaki tüpte toplanan sıvı boşaltıldı ve boşaltılan tüp tekrar spin kolonun altına yerleştirildi. Spin (arıtma) kolonuna 500 ul Wash TX2 tamponu eklendi ve 11 000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. DNA bağlama spin (arıtma) kolonun altındaki toplanan sıvı tüp atıldı ve yeni eppendorf tüp takıldı. Spin (arıtma) kolonuna 150 µl elüsyon tamponu eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 11 000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Spin (arıtma) kolonuna atıldı ve alttaki eppendorf tüp -20 °C depolandı.

2.2.6.3. DNA'nın çoğaltılması için PZR karışımının hazırlanması ve uygulanması

Toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımında; 5 µl 10x PZR buffer (750 mM Tris-HCL, pH 8.8, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Tween - 20), 5 µl 25 mM MgCl₂, deoksiniükleotitlerin her birinden 250 µM, 1.25 U Taq DNA Polymerase enzimi (MBI, Fermentas) ve *Flavobacterium* cinsi ve *Flavobacterium psychrophilum* türüne ait spesifik iki tane primer çifti kullanıldı. *Flavobacterium* cinsi için; PSY1 190–206 (GTT GGC ATC AAC ACA CT) ve PSY2 1278–1262 (CGA TCC TAC TTG CGT AG) primer çiftinin (Cepeda ve Santos, 2000; Wiklund ve ark., 2000; İzumi ve ark., 2005; İzumi ve ark., 2007) her birinden 50 pmol ve 5 µl template (kalıp) DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları PZR-Sprint thermalcycler cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94 °C'de 15 dakikada ön denaturasyon aşaması, PZR siklüsü 56 °C 'de 20 saniyede denaturasyon ve 72 °C'de 1 dakikada ise hibridizasyon gerçekleşti. *Flavobacterium psychrophilum* türü için; GYRA-FP1F (5'-GAAACCGGTGCACAGAAGG-3') ve GYRA-FP1R (5'-CCTGTGGCTCCGTTTATTAA-3') primer çiftinin (İzumi ve ark., 2005; Suzuki ve ark.,

2008) her birinden 50 pmol ve 5 µl template DNA ilave edildi. PZR reaksiyonları PZR-Sprint thermalcycler cihazında gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda 94 °C’de 30 saniye ön denaturasyon aşaması, PZR siklüsü 51 °C ’de 90 saniye denaturasyon, 72 °C’de 2 dakika hibridizasyon gerçekleştirildi.

2.2.6.4. DNA’nın jel elektroforezi

PZR’unda amplifiye edilen DNA ürünlerinden (Baliarda ve ark., 2002), 7 µl alınıp, 3 µl blue orange yükleme solüsyonu ile karıştırılarak daha önce hazırlanan %1,5’luk agaroz jel üzerindeki kuyucuklara yerleştirildi. Son kuyucuğa da PZR markeri bırakıldı. Jel, Tris-borik asit-EDTA (TBE) buffer’ı kullanılarak % 1,5 ’luk agaroz jelde 80 V ’da 1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dakika süreyle boyandı. Bu süre sonunda jel, ethidium bromide (0.5 µg / ml) ile oda sıcaklığında 30 dakika süre ile boyandı. Karanlık odada ultraviyole transillüminatörde *Flavobacterium psychrophilum*’a özgü DNA bant uzunluklarına (bp-base pair) bakılarak polaroid kamera sistemi ile fotoğrafı çekildi (Baliarda ve ark., 2002). Metodun herhangi bir aşamasında meydana gelebilecek muhtemel bir kontaminasyonu tespit etmek amacıyla; gerek DNA ekstraksiyonu aşamasında gerekse PZR’unda pozitif *Flavobacterium psychrophilum* ve negatif kontrol olarak da *Escherichia coli* bakterileri kullanıldı.

2.2.6.5. Kapiller elektroforez DNA sekanslama

Çalışmada DNA gen dizi analizi için AB3130XL16 kapiller cihazı (Hitachi, Japonya) kullanıldı. Dizi analizinde sekans işlemi bir dizi basamaklardan oluşmaktadır. Jel elektroforezinde uygun bant gösteren örnekler sekans işlemi için seçilerek Exso-SAP pürifikasyonu aşağıda Çizelge 2.5. ve 2.6.’de belirtildiği şekliyle reaksiyon karışımı ve PCR protokolü uygulandı (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.5. ExoSAP Pürifikasyonu için reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
PCR ürünü	2,5
Exosap	1
Toplam miktar	3,5

Çizelge 2.6. ExoSAP PCR protokolü

Basamak I	Basamak II	Basamak III
37°C	80°C	4°C
30 dk	15 dk	∞

ExoSAP pürifikasyonundan sonra sekans PCR metodu uygulanarak nükleotidlerin BigDye 3.1. ile florasan işaretlemesi yapıldı.

Çizelge 2.7. Cycle Sequencing PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı Miktar (µl)	Miktar (µl)
PCR ürünü	3,5
Big Dye	2
Buffer(5x)	2
Steril distile su	0,5
Primer (F veya R,2 ng/ul)	2
Total Hacim	10

Yukarıdaki malzemeler uygun eppendorf tüpünde homojen şekilde karıştırılarak karışım çözeltisi hazırlandı. Ardından PCR protokolünü gerçekleştirmek için eppendorf marka PCR cihazında Çizelge 2.8.'da belirtilen döngülere bırakıldı.

Çizelge 2.8. Cycle Sequencing PCR protokolü

Basamak I		Basamak II		Basamak III
(1 defa)		(25 defa)		(1 defa)
96.0 °C	96.0 °C	50.0 °C	60.0 °C	4.0 °C
1:00dk	0:10dk	0:05dk	4:00dk	∞

Sekans öncesi tüm örnekler Sephadex pürifikasyonu yapılarak AB3130xl Genetic Analyzer cihazına yüklendi. Sephadex pürifikasyonu için aşağıdaki yöntem izlendi. 1 gr sephadex 14 ml deiyonize ultra saf su içerisinde çözülerek 700 µl alıcı sütun içerisine aktarıldı. 4600 rpm 2.5 dk santrifüj edilerek sephadex karışımının sıvı kısmı uzaklaştırıldı. Elde edilen kolona Sekans PCR ürünleri eklenerek 4600 rpm 2.5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta kalan kısım sekans cihazına yüklendi.

2.2.7. Antibiyogram testler

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

2.2.8. Bakteri suşlarının stoklanması

Bakteriler -20 °C de %15’lik gliserol içerisine alınarak kısa süreli kullanımlar için saklandı. Uzun süreli saklama ise, besiyerinde 16 saat büyütülen bakterilerden 200 µl alınarak 12000 rpm (14515 g)’de 3 dakika çöktürülerek peletlerin %30 gliserol içeren LB veya GM17 besi yerinde çözündürüp, şok soğutma ile -80°C’de saklanması şeklinde oldu.

2.2.9. Verilerin analizi

Elde edilen sekans sonuçları Clone Manager 9’da düzenlenip sıraya konulduktan sonra elektronik veri tabanında NCBI GenBank’a giriş yapılarak BLAST üzerinden diğer *Flavobacterium psychrophilum* türlerinin sekansları ile karşılaştırılarak tür teşhisi doğrulandı.

3. BULGULAR

3.1. Çalışma alanı

Kahramanmaraş ilinde örnek alınan işletmelerden 65'i besi işletmesi, 3'ü kombine (Yavru ve porsiyonluk) üretim yaptığı tespit edildi. İşletmelerin büyük çoğunluğunun besi işletmesi olması, yavru balık ihtiyacı Türkiye'nin farklı illerinde temin edildir.

3.2. Balık

Bakteriyolojik muayenede, 1.088 adet 5 gramdan küçük yavru ve 5 gramdan büyük yavru Gökkuşuğu alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) toplam 2.720 adet örnek besiyerlerine ekimler yapıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Örneklerin alındığı işletme, balık türü, alındığı ili, balık ve örnek sayısı

İşletme No	Balık Türü	Balık Sayısı	Örnek Sayısı
1.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
2.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
3.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
4.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
5.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
6.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
7.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
8.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
9.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
10.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
11.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
12.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
13.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
14.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
15.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
16.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
17.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
18.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
19.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
20.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
21.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
22.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
23.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
24.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
25.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
26.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
27.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
28.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
29.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
30.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
31.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
32.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40

33.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
34.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
35.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
36.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
37.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
38.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
39.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
40.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
41.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
42.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
43.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
44.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
45.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
46.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
47.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
48.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
49.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
50.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
51.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
52.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
53.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
54.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
55.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
56.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
57.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
58.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
59.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
60.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
61.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
62.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
63.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
64.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
65.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
66.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
67.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
68.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16	40
TOPLAM		1.088	2.720

3.3. Su

Balıkların bulunduğu suyun 8-16 °C 7.01 – 7.5 pH ve 7.5 – 9 mg L-1 O₂ düzeyinde olduğu tespit edildi.

3.4. Morfolojik bulgular

Kahramanmaraş ilindeki balıkçılık işletmelerinden alınan anamnezde; özellikle 5 gramdan küçük yavru ve 5 gramdan büyük yavru balıklar durgun, iştahsız veya yem almadığı belirlendi. Ayrıca yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra büyük kayıplara yol açan Bakteriyel soğuk su hastalığı semptomlarına benzer bulgular tespit edildi. Yapılan

incelemelerde işletmede günde 100–200 yavru alabalığın öldüğü (Şekil 3.1) saptandı. Yaklaşık 2 hafta kadar süren bu salgından dolayı yavru balıklarda % 20’lik bir kayıp meydana geldi.



Şekil 3.1. İşletmede görülen toplu alabalık ölümleri

Yavruların bulundukları havuzlarda yapılan incelemelerde hastalıklı gökkuşağı alabalıklarının iştahsız, durgun ve su yüzeyinde yüzdükleri, ayrıca bazı balıkların spiral yüzme hareketleri yaptıkları ve denge problemi yaşadıkları görüldü. Öte yandan bazı balıklarda asitese bağlı olarak karın boşluğunda şişkinlik (Şekil 3.2), ekzoftalmus (Şekil 3.3), derinin renginde kararma (Şekil 3.4) ve birkaç balığın sırt ve kaval yüzgecinde beyaz renkte lezyonların şekillendiği (Şekil 3.5) ve hastalığın ilerlemiş olduğu balıklarda kaval yüzgecin tamamen tahrip olduğu ve radiusların (Şekil 3.6) ortaya çıktığı gözlemlendi.



Şekil 3.2. Hasta alabalıkda görülen asites



Şekil 3.3. Hasta alabalıkda görülen ekzoftalmus



Şekil 3.4. Hastalıklı alabalıklarda derinin renginden kararma



Şekil 3.5. Hastalıklı alabalığın sırt ve kavdal yüzgecinde oluşan beyaz renkteki lezyonlar



Şekil 3.6. Hastalıklı alabalıkta kavdal yüzgecin tahrip olması ve radiusların ortaya çıkması

Enfekte gökkuşağı alabalık yavrularının abdominal ensizyonla iç organları açığa çıkarıldı (Şekil 3.7). Karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi (Şekil 3.8). Hastalıklı yavru alabalıkların karın boşluklarında sarı renkli bir sıvı birikiminin ve bağırsaklarda iltihapların olduğu gözlemlendi.



Şekil 3.7. Hastalıklı yavru alabalığın iç organlarının çıkarılması

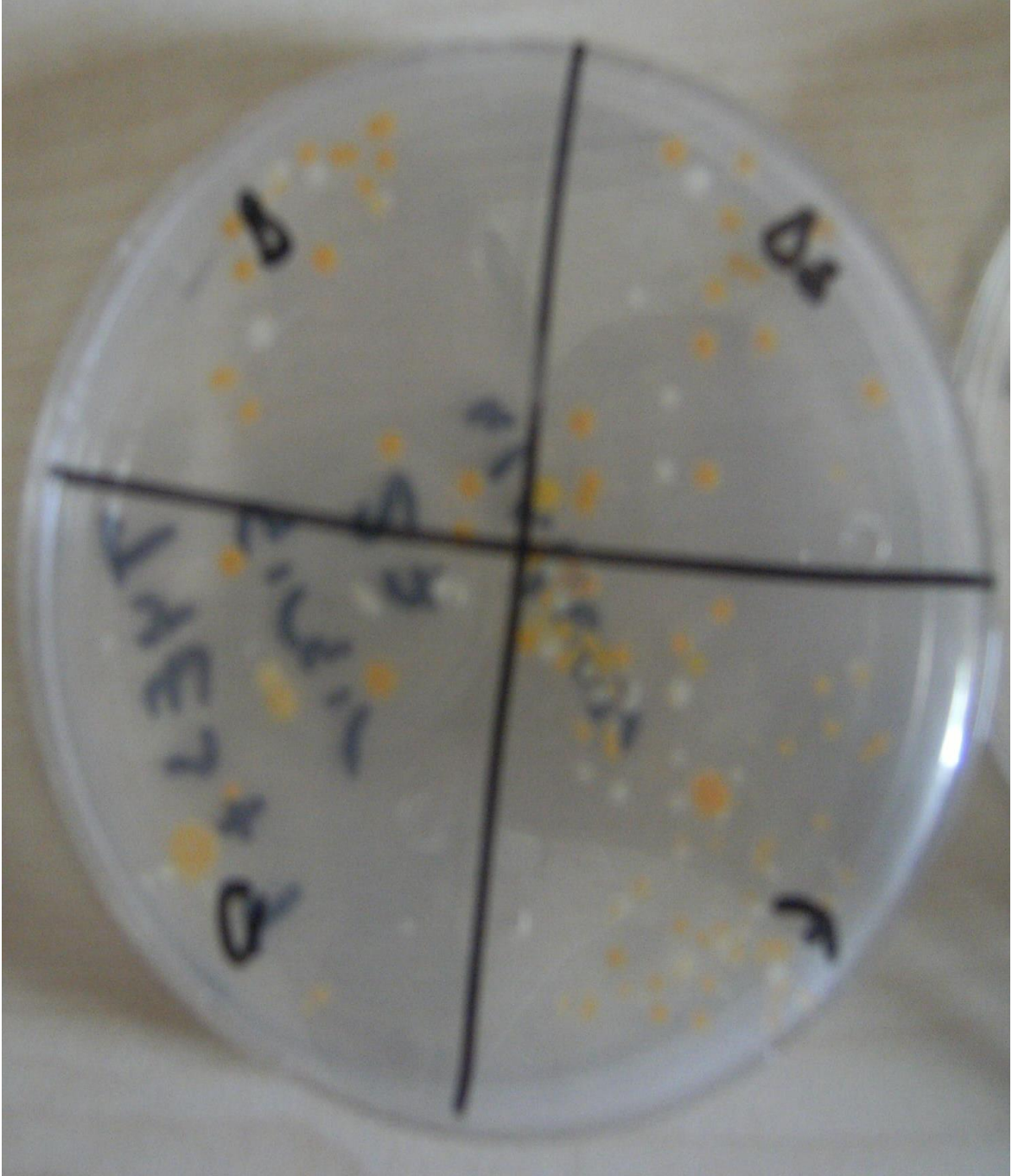


Şekil 3.8. Hastalıklı yavru alabalığın karaciğer ile böbreğin solgun olduğu ve dalağın büyüdüğü tespit edildi

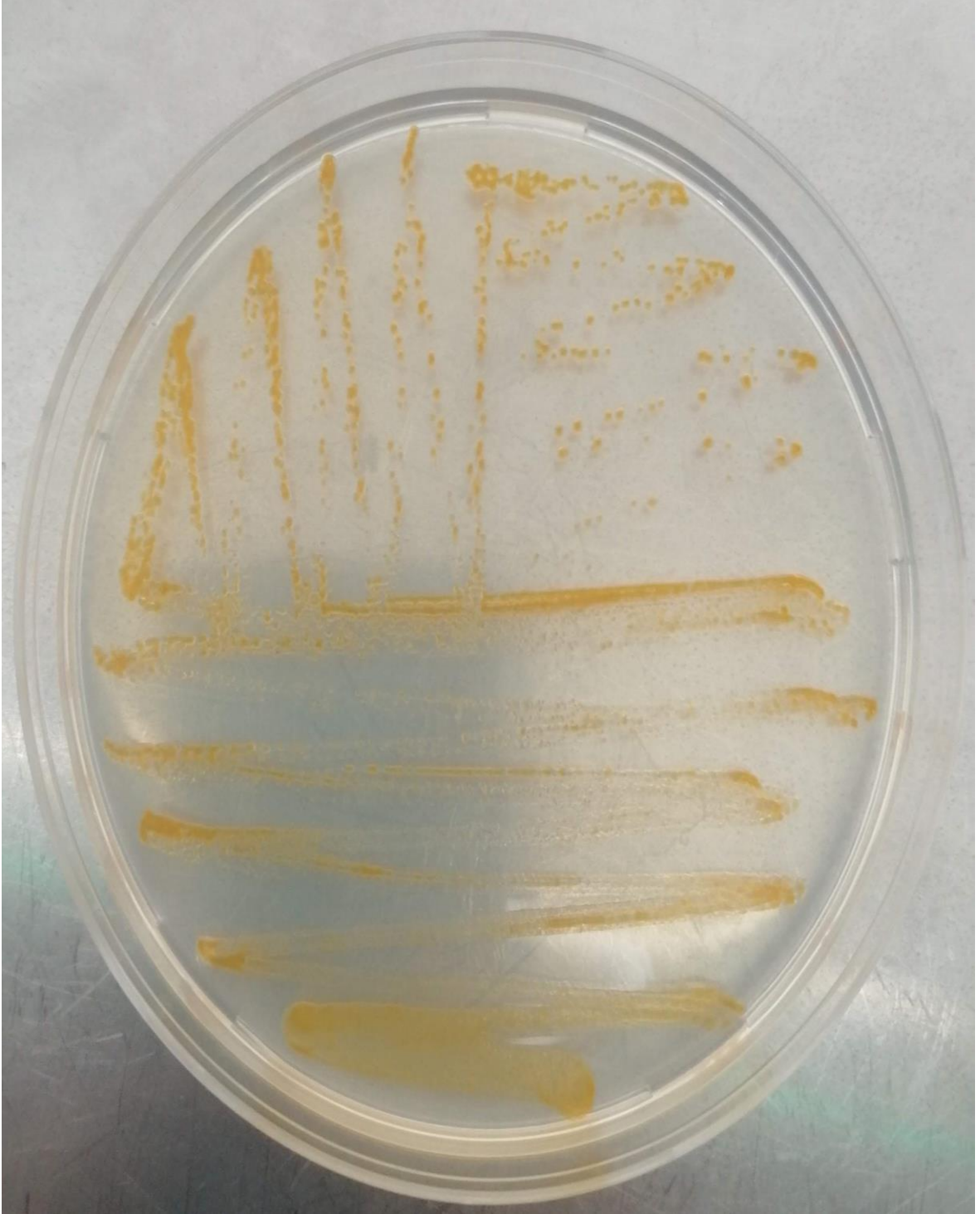
3.5. Fenotipik ve biyokimyasal bulgular

3.5.1. Klasik test bulgular

TYES-A, agara yapılan ekimler 15°C’de 5–7 gün süreyle etüvde bekletildikten sonra çoğunluğu sarı renkte olmak üzere değişik koloniler (Şekil 3.9) saptandı. Bu sarı renkli kolonilerden TYES-A’ya ekimler yapılarak sarı pigmentli saf kolonilerin (Şekil 3.10) oluştuğu görülmüştür.



Şekil 3.9. TYES-A agarda ilk ekimden sonra çoğunluğu sarı renkte olan karışık koloniler



Şekil 3.10. TYES –A agarda üreyen saf koloniler

İzole edilen gram negatif çomak şekilli 12 adet suşun saf kültürlerinden fenotipik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi (Çizelge 3.2.). *Flavobacterium psychrophilum* izole edildikten sonra antibiyotiğe karşı duyarlılığını ölçebilmek için Antibiyogram duyarlılık testi uygulandı (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik ve biyokimyasal özellikleri

Fenotipik ve Biyokimyasal Özellikler	İzole Edilen 12 adet <i>Flavobacterium psychrophilum</i> Suşları											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Koloni rengi	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf	Zayıf
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fleksirubin pigment	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kongo red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İndol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jelatin hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simmons sitrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Üreaz testi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemoliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eskülin hidrolizi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20 hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80 hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lizin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fruktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meliboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigolalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sukroz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TYE agarda üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TYES-A'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSA'da üreme	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TSB'da üreme	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Kanlı agar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MCA'da üreme	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
PCA'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MHA'da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0°C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5°C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20°C'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25°C'de üreme	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

30°C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
% 0,0 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 0,5 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 1,0 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
% 2,0 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

Çizelge 3.3. İzole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un antibakteriyel duyarlılık

Antibiyotikler		5 gramdan küçük Yavru			Dalak			Karaciğer			Böbrek			Bağırsak		
		R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Gentamisin (10 µg)	(CN)	10	0	4	21	0	6	13	0	4	10	0	2	6	0	3
Amoksisilin (25 µg)	(AX)	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8	0	0
Ampisilin (10 µg)	(AMP)	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8	0	0
Eritromisin (15 µg)	(E)	6	9	0	16	5	5	10	3	4	9	4	1	6	1	
Streptomisin (10 µg)	(S)	1	0	12	2	0	25	3	0	14	2	0	10	3	0	6
Enrofloksasin (5 µg)	(ENR)	0	0	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8
Florfenikol (30 µg)	(FFC)	0	0	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8
Basitrasin (30 µg)	(B)	0	4	11	0	4	21	0	1	15	0	3	12		1	7
Nalidiksik Asit (30µg)	(NA)	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8	0	0
Oksitetrasiklin (30 µg)	(OT)	0	0	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8
Neomisin (30 µg)	(N)	14	0	0	26	0	0	16	0	0	13	0	0	8	0	0
Batrim - Trimetoprim + Sulfametoksazol (1,25µg+23,7 µg)		0	4	14	0	4	21	0	1	15	0	3	12	0	1	7

durumları

3.5.2. Biolog (The biolog GENIII micro plate) bulgular

Biyokimyasal testlerin doğrulamak ve diğer fenotipik özellikleri belirlemek amacıyla Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) cihazı kullanıldı (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Gökkuşağı alabalığından izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'nın Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) cihazı ile diğer fenotipik özellikleri

Biyokimyasal Kriter	İzolat reaksiyonu	Biyokimyasal Kriter	İzolat reaksiyonu
pH 5	+/-	%8 NaCl	-
pH 6	+/-	%4 NaCl	-
Positif Kontrol	+	%1 NaCl	+/-

Stachyose	Zayıf +	N-Acetyl Neuraminic Acid	+/-
D- Turanose	+/-	N-Acetyl-D-Galactosamine	-
Sucrose	-	N-Acetyl- β -D-Mannosa-mine	+/-
Gentiobiose	+/-	N-Acetyl-D-Glucosamine	+/-
D-Cellobiose	+/-	D-Salicin	+/-
D-Trehalose	+/-	β - Methyl-D-Glucoside	+/-
D-Maltose	+/-	D-Melibiose	+/-
Dextrin	+/-	α -D-Lactose	-
Negatif Kontrol	-	D-Raffinose	-
D-Serine	+/-	Minocycline	+/-
Fusidic Acid	-	Rifamycin SV	+/-
%1 Sodium Lactate	+/-	Troleando-mycin	+/-
I Nosine	+/-	D-Serine	+/-
L-Rhamnose	+/-	D-Aspartic Acid	-
L-Fucose	-	D-Fructose-6- Phosphate	+/-
D-Fucose	-	D-Glucose-6- Phosphate	Zayıf +
3-Methyl Glucose	-	Glycerol	-
D-Galactose	+/-	myo-Inositol	-
D-Fructose	+/-	D-Arabitol	-
D-Mannose	+/-	D-Mannitol	+/-
α -D-Glucose	+/-	D-Sorbitol	-
Niaproof 4	+/-	Tetrazolium Blue	+
Guanidine HCl	+/-	Tetrazolium Violet	+
Lincomycin	+/-	Vanco-mycin	+/-
L-Serine	+/-	D-Saccharic Acid	+/-
L-Pyroglutamic Acid	-	Quinic Acid	+/-
L-Histidine	-	Mucic Acid	+/-
L-Glutamic Acid	+/-	Glucoronamide	+/-
L-Aspartic Acid	+/-	D-Glucuronic Acid	-
L-Arginine	-	D-Gluconic Acid	-
L-Alanine	-	L-Galactonic Acid Lactone	-
Glycyl-L-Proline	+/-	D-Galacturonic Acid	-
Gelatin	+	Pectin	-
Potassium Tellurite	-	Sodium Bromate	-
Lithium Chloride	-	Sodium Butyrate	-
Nalidixic Acid	-	Aztreonam	+/-
Bromo-Succinic Acid	-	Formic Acid	-
L-Malic Acid	-	Acetic Acid	+/-
D-Malic Acid	-	Propionic Acid	-
α -Keto-Glutaric Acid	+/-	Acetoacetic Acid	+/-
Citric Acid	+/-	α -Keto- Butyric Acid	-
L-Lactic Acid	-	β - Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-
D-Lactic Acid Methyl Ester	-	α -Hydroxybutyric Acid	-
Methyl Pyruvate	-	γ -Amino-Butyric Acid	-
p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	Tween 40	+/-

Biolog's Microbial Identification System software programı kullanılarak bakterilerin metabolik reaksiyon profilleri elde edildi. Sistemin kütüphanesinde bulunan metabolik profilleri bilinen izolatlarla, hasta balıkta izole edilen izolatlarımızla karşılaştırıldı ve 3 bakteri türüyle (*Flavobacterium resinovorum*, *Chryseobacterium scophthalmum*, *Flavobacterium tirrenicum*, *Obesum bacteria proteus* biogroup 2) farklı oranlarda benzer olduğu ve 1 bakteri türü ile (*Flavobacterium psychrophilum*) % benzer bulunmuştur (Şekil 3.11).

Şekil 3.11. Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'nın biolog tanılama sisteminin çıktıları

Program	MicroLog 3/5.2.01 33
Project	ML5
File Name	05.01.2022.D5E
User	biolog
Instrument	MicroStation 2 Reader
Instrument S/N	0
Incubation Hours	20.00
Plate Number	1
Plate Type	GEN III
Protocol	A
İzolat No	Kahramanmaraş
İzole Edildiği Yer	Alabalık
İzole Eden	Mikail ÖZCAN
Tanımlayan	Seyfettin Çelik
Tarih	05. 01.2022
Date & Time of Read	January 05 2022 9:58 AM
Biolog ID DB	Biolog GEN III 2_6_1_08.I5G

Result	Species ID: <i>Flavobacterium psychrophilum</i>
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.142	0.142	8.215	GN-Nent	<i>Flavobacterium resinovorum</i>
2	0.122	0.122	8.400	GN-Nent	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>
3	0.091	0.091	8.766	GN-Nent	<i>Flavobacterium tirrenicum</i>
4	0.088	0.088	8.812	GN-Nent	<i>Obesum bacteria proteus</i> biogroup 2

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 wellWell

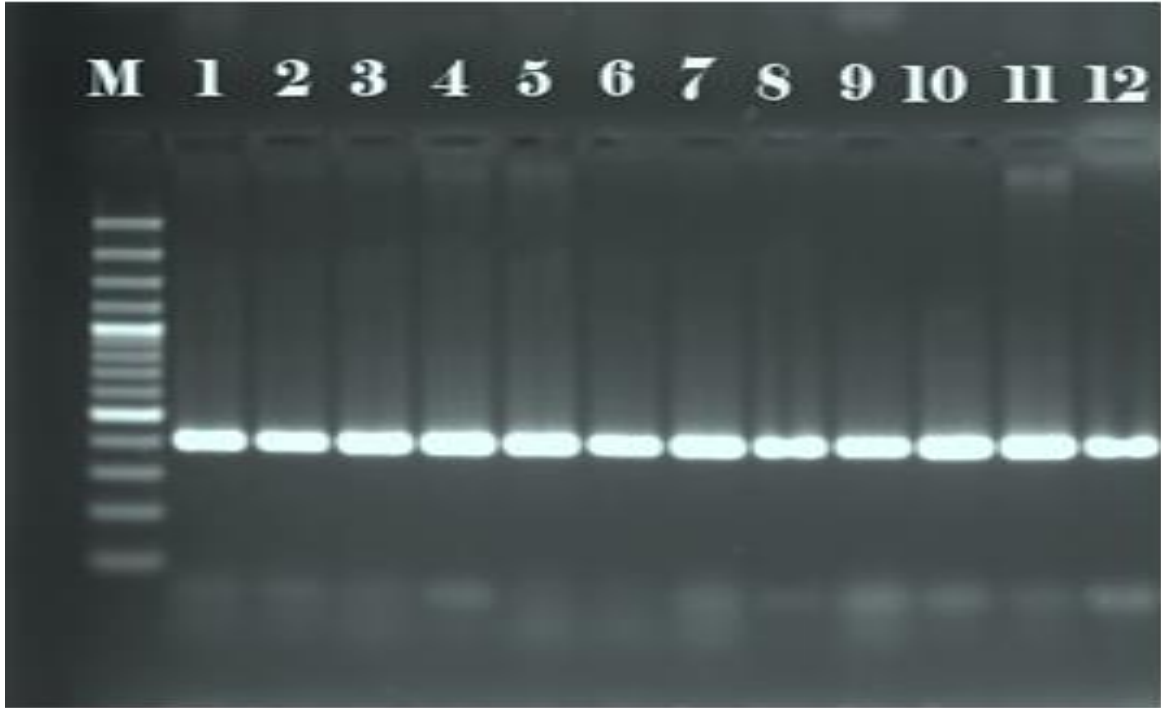
Color Values	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	118	{144	{140	{124	{ 149	{ 158	86	{123	<164	{197	{195	{117
B	114	91	{ 135	{137	{ 145	{ 153-	{ 131	84	{154-	{178	46	41
C	{ 125+	{157	{ 143	{141	76	91	101	{129	{141	{190	71	{172
D	77	{142	100	70	99	<167-	{143	78	{148-	{171	{203-	{127
E	{ 178	{ 126+	95	111	{ 127	{143	99	108	{147	{195	{148	{148
F	78	96	91	83	85	{116	{140	{117	{131	{127	<375	<374
G	94	100	107	78	{139	{130	84	97	26	43	35	46
H	{ 138	86	96	101	68	{141	65	{142	61	{198	40	42

Report Date January 05 2022 10:10 AM

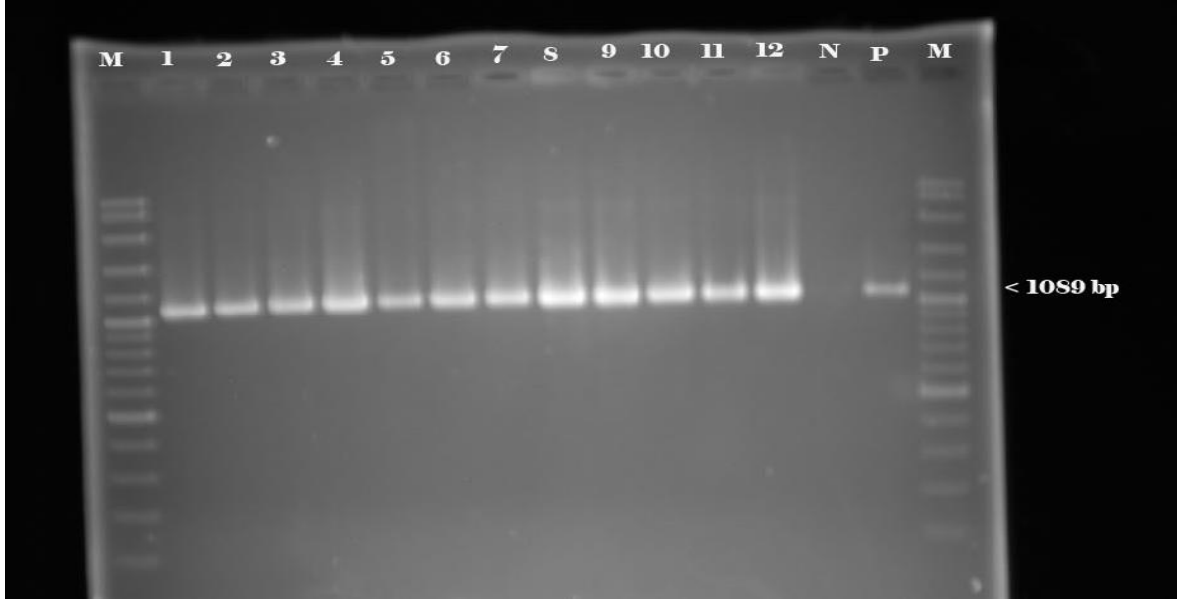
3.6. Moleküler bulgular

3.6.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu bulguları

Kahramanmaraş balıkçılık işletmelerinden izole ve identifikasyonu yapılan 12 adet *Flavobacterium psychrophilum* suş'un DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu DNA'ların PZR ile amplifikasyonu yapıldı. Daha sonra bu PZR ürünler içerisinde 19 tane *Flavobacterium psychrophilum*, 1 tane pozitif kontrol, 1 tane negatif kontrol ve 1 tane 100 bp'lik moleküler marker (M) % 1,5'luk agaroz jele yerleştirilip elektroforezden geçirildi. Bu agaroz jel etidium bromide ile boyanıp, ultraviyole transilluminatörde bakıldı. Yüz atmış adet suşun hepsinde *Flavobacterium* cinsine ait PSY1 190–206, PSY2 1278–1262 primere çiftine göre 396 bp uzunluğunda bantlar görüldü (Şekil 3.12). *Flavobacterium psychrophilum* türüne ait GYRA-FP1F, GYRA-FP1R primer çiftinde ise 1089 bp uzunluğunda bantlar görüldü (Şekil 3.13) ve bunların da pozitif kontrolle aynı uzunluktaki bantları oluşturduğu tespit edildi. Dolayısıyla izole edilen 12 şüpheli suşun *Flavobacterium psychrophilum*'un olduğu kanıtlandı.



Şekil 3.12. *Flavobacterium psychrophilum* DNA'larının, PZR'nunda analizi sonucu oluşan 396 bp'lik bantları gösteren agaroz jel; 1–19: *Flavobacterium psychrophilum* şüpheli örnekler; M: 100 bp'lik moleküler marker; N: Negatif kontrol (*E. coli*) (MBI, Fermentas); P: Pozitif kontrol referans suş (*Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947^T)



Şekil 3.13. *Flavobacterium psychrophilum* DNA'larının, PZR'nda analizi sonucu oluşan 1089 bp'lik bantları gösteren agaroz jel; 1–12: *Flavobacterium psychrophilum* şüpheli örnekler; M: 100 bp'lik moleküler marker; N: Negatif kontrol (*E. coli*) (MBI, Fermentas); P: Pozitif kontrol referans suş (*Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947^T)

3.6.2. Sekans analizi bulgular

Flavobacterium psychrophilum suşlarından ileri okuma ile sekans analizi yapıldı. Sekan sonucu elde edilen nükleotid dizisi Şekil 3.14.'de, *Flavobacterium psychrophilum* 16S ribosomal RNA (Sequence ID: KU212250.1)'ın NCBI'dan alınan consensüs dizisi Şekil 3.15.'de verildi.

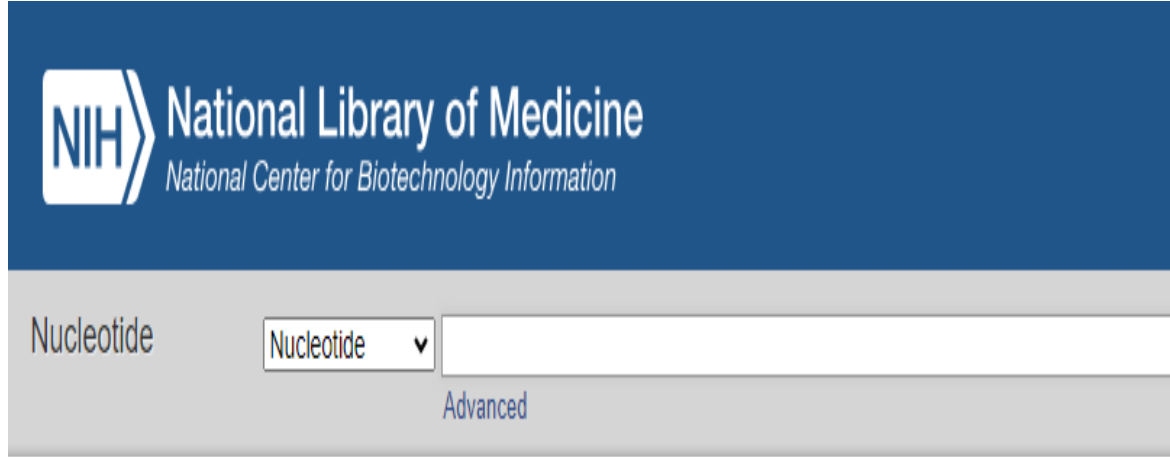
```

ACTCGATGAGGCCTTCGKWCCCTCAGCGTCATCATTTGTAAGKRACCTGCC
TTCGCAATTGGTRTTCAAGTAATCTCTAWGCATTTACCGCTACACTACA
TATTCYAGTYACTTCYAMWTWAYTCAAGMCMWRCAGTATCAATGGCCGTT
CCATMGTTTRAGCKATGRGMTTTCACCACTGACTTATCTGKCCGCCTACGG
ACCCTTTAAACCCAATRAWTCGGGATAACGCTTGSATCCTCCGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGATSCTTATTCTCACAGTACCGTCAA
GYTCGGTCACGACCRARKGTTTCTTCCTGTGCAAAAGMAGTTTACAATCC
ATAGGACCGTCATCCTGCACGCGGSATGGCTGGWTCAGGCTYKCGCCCAT
TGACCAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCKGGTCCGTGTCTC
AGTACCAGGGGGGGGGATCTCCCTCTCAGGACCCCTACCCATCGTKGCCT
TGGKAAGCCGTTACCTTACCCAATAKCTAATGGKGCSCATGCTCATCTT
TTACCGYKGWGAYTTTAATAKTGWGGTKGATGCCAACTCACTATACTATG

```

AGGTATTAATCCAWATTTMTCTGGKMTATCCCTCTGWAAAAGGWAKATTG
CATACGYKTYACGCACCCGYGCCCCGGTCTCAAWMATKGMTATTCTACCC
CTCC

Şekil 3.14. *Flavobacterium psychrophilum* suşlarından ileri okuma ile 16S sekans hizalaması



FASTA ▾

Flavobacterium psychrophilum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

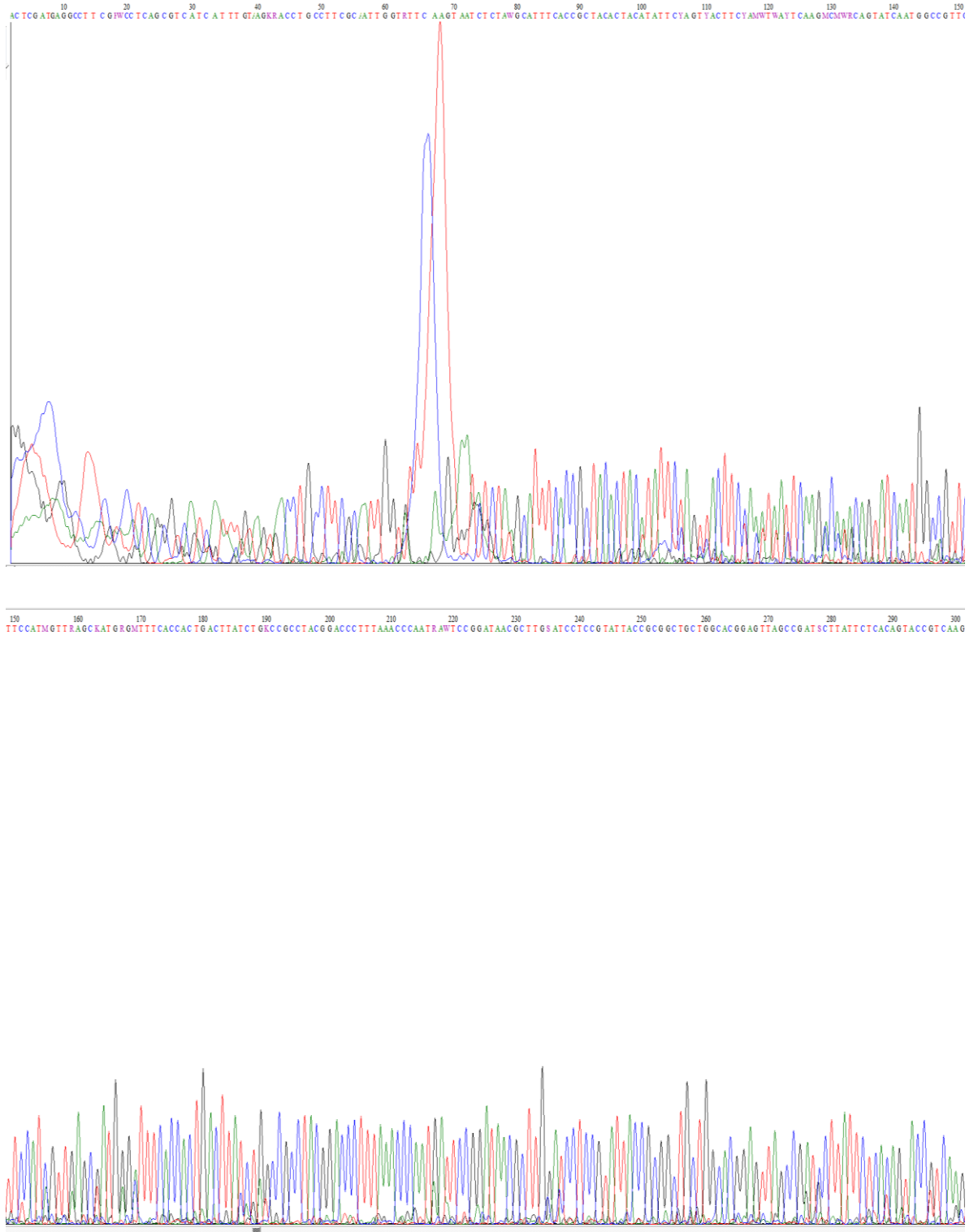
GenBank: KU212250.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

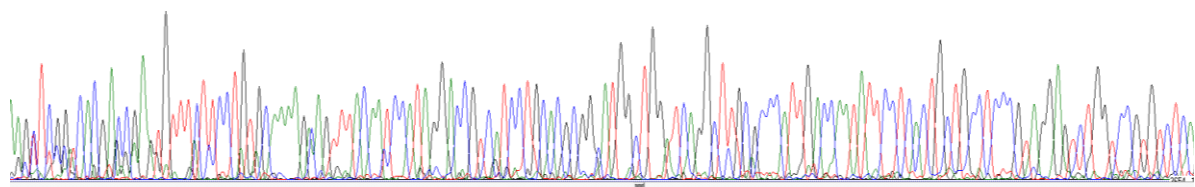
```
>KU212250.1 Flavobacterium psychrophilum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AGTCGAGGGGTAGAATAGCAATATTTGAGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAATCTACCTTTT
ACAGAGGGATAGCCAGAGAAATTTGGATTAATACCTCATAGTATAGTGAGTTGGCATCAACACACTATT
AAAGTCACAACGGTAAAAGATGAGCATGCGTCCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCA
ACGATGGGTAGGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAAGGATGACGGT
CCTATGGATTGTAACCTGCTTTTGCACAGGAAGAACTCGGTCGTGACCGAGCTTGACGGTACTGTGA
GAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGAATCA
TTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGCCAGATAAGTCAGTGGTGAAAGCCATCGCTCAACGATGGAACGG
CCATTGATACTGTTTGGCTTGAATTTTGGAAAGTAAGTAAGTATGATGTAGCGGTGAAATGCTTAG
AGATTACATGGAATACCAATTGCGAAGGCAGGTTACTACAAATTGATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTG
GGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGATACTAGCTGTTGGGAGCAAT
CTCAGTGGCTAAGCGAAAGTGATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAACTCAA
```

Şekil 3.15. *Flavobacterium psychrophilum* 16S ribosomal RNA (Sequence ID: KU212250.1)'in NCBI'dan alınan consensüs dizisi

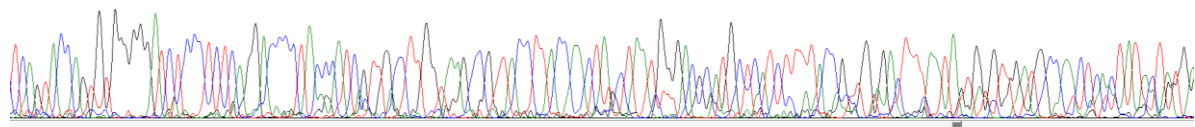
Flavobacterium psychrophilum'un sekans piklerinin Bioedit Sequence Alignment Editor programı kullanılarak kromatogramları görüntülendi ve tek tek kontrolleri yapıldı (Şekil 3.16.).

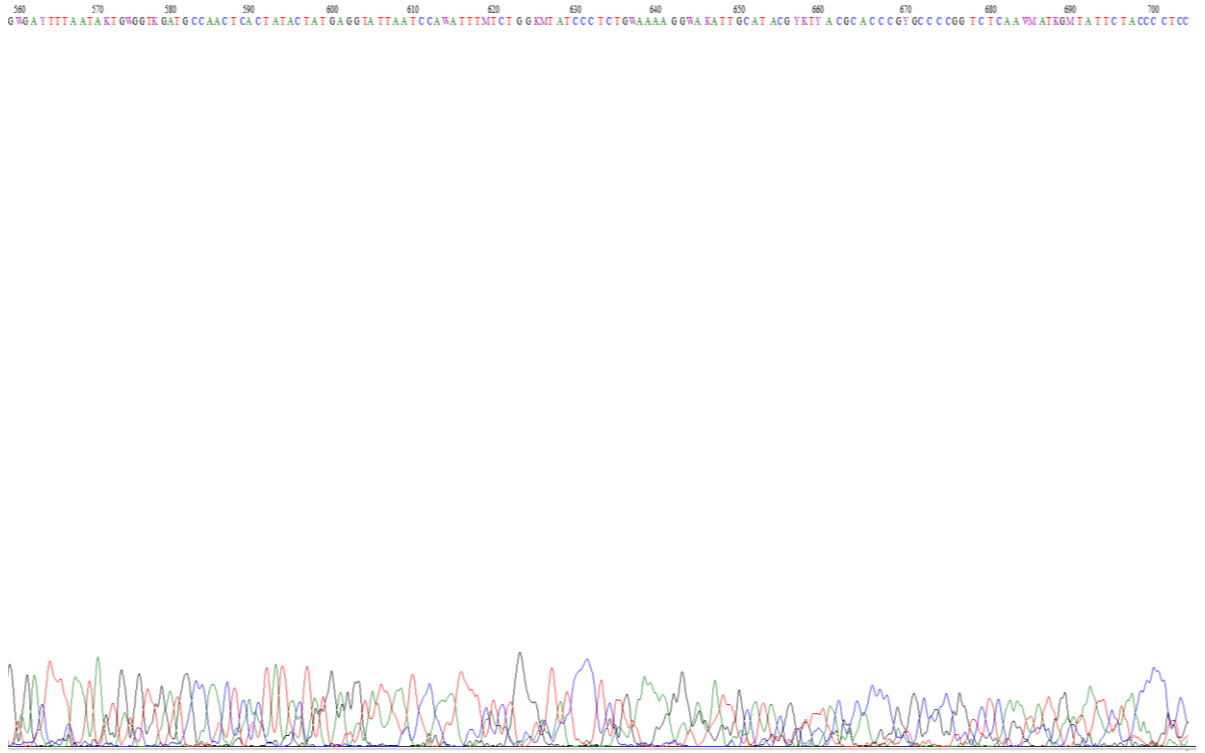


300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 LAGTTGGGTACGACRARKGTTTTCTCTGTGCAAAAGMAGTTTACAAATCCATAGGACCGTCATCCTGCACGCGGSATGGCTGWTCAAGCCTTKCGCCATTGACCATAATTCCTCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCKGGTCCTGTCTCA



420 480 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 TCAGTACCAAGGGGGGGGATCTCCCTCTCAAGACCCCTACCACTCGTKGCCCTTGGAAGCGTTACCTTACCCAACTAKCTAAATGGGCGSCATGCTCATCTTTTACCGYKGGAYTTTAAATAKTGGGKGATGCCAACTCACTATCTATGA





Şekil 3.16. *Flavobacterium psychrophilum* sekans kromatogramı

Sekans sonuçları NCBI'daki referans *Flavobacterium psychrophilum* suşlarıyla benzerlik açısından karşılaştırılmıştır (Şekil 3.17). Yapılan karşılaştırmada *Flavobacterium psychrophilum* 16S ribosomal RNA (Sequence ID: KU212250.1) ile en yakın benzerlik gösterdiği belirlendi. Karşılaştırmada en yüksek benzerlik *Flavobacterium psychrophilum* 16S ribosomal RNA ile gözlemlenmiş ve benzerlik yüzdesi 700/700(100%), oluşan gap sayısı 0/700(0%) ve toplam puan 1293 bits (700) olarak hesaplandı. Benzerlik değerleri ve hizalama karşılaştırması verildi (Şekil 3.18).

[Edit Search](#)

[Save Search](#)

[Search Summary](#)

[How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title Nucleotide Sequence

RID [0WPVB2VG013](#) Search expires on 04-05 15:48 pm [Download All](#)

Program BLASTN [Citation](#)

Database nt [See details](#)

Query ID lc|Query_7329493

Description None

Molecule type dna

Query Length 704

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear

☐ exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[Add organism](#)

Percent Identity

E value

Query Coverage

to

to

to

Filter

Reset

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show 100

☐ select all 1 sequences selected

[GenBank](#)

[Graphics](#)

[Distance tree of results](#)

[MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Flavobacterium psychrophilum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Flavobacterium psychrop...	966	966	96%	0.0	89.34%	837	KU212250.1
☐	Flavobacterium psychrophilum strain 5 genome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2848408	CP010274.2
☐	Flavobacterium psychrophilum strain MH1 genome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2847905	CP010275.2
☐	Flavobacterium psychrophilum strain PG2, complete genome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2850726	CP010276.2
☐	Flavobacterium psychrophilum strain VQ50 chromosome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2806870	CP010277.2
☐	Flavobacterium psychrophilum strain 3 chromosome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2805502	CP010278.2
☐	Flavobacterium psychrophilum strain 950106-1/1, complete genome	Flavobacterium psychrop...	966	966	96%	0.0	89.34%	2736292	CP008902.1
☐	Flavobacterium psychrophilum strain FPS-S6-R18 chromosome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2860537	CP095721.1
☐	Flavobacterium psychrophilum strain FPS-S6-R14 chromosome	Flavobacterium psychrop...	966	5790	96%	0.0	89.34%	2860588	CP095709.1

Şekil 3.17. Bir adet *Flavobacterium psychrophilum* sekans sonuçlarının NCBI'daki referans *Flavobacterium psychrophilum* suşlarıyla benzerlik açısından karşılaştırılması

Flavobacterium psychrophilum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KU212250.1](#) Length: 837 Number of Matches: 1

Range 1: 5 to 686 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
966 bits(523)	0.0	612/685(89%)	6/685(0%)	Plus/Minus
Query 22	TCAGCGTC-ATC-ATTTGTAAGKRACCTGCCTTCGCAATTGGTRTTC-AAGTAATCTCTA	78		
Sbjct 686	TCAGCGTCAATCAATTTGT-AGTAACCTGCCTTCGCAATTGGTATTCCATGTAATCTCTA	628		
Query 79	WGCATTTACCGCTACACTACATATTCYAGTYACTTCYAMWTWAYTCAAGMCMWRCAGTA	138		
Sbjct 627	AGCATTTACCGCTACACTACATATTCAGTTACTTCCAAATAATTCAAGCCAAACAGTA	568		
Query 139	TCAATGGCCGTTCCATMGTTTRAGCKATGRGTTTTCACTGACTTATCTGKCCGCCTAC	198		
Sbjct 567	TCAATGGCCGTTCCATCGTTGAGCGATGGGCTTTCACTGACTTATCTGGCCGCCTAC	508		
Query 199	GGACCCCTTTAAACCCAATRAWTCGGATAACGCTTGSATCCTCCGTATTACCGCGGCTGC	258		
Sbjct 507	GGACCCCTTTAAACCCAATGATTCCGGATAACGCTTGGATCCTCCGTATTACCGCGGCTGC	448		
Query 259	TGGCACGGAGTTAGCCGATSCCTATTCTCACAGTACCGTCAAGYTCGGTCACGACCRARK	318		
Sbjct 447	TGGCACGGAGTTAGCCGATCCTTATTCTCACAGTACCGTCAAGCTCGGTACGACCGAGT	388		
Query 319	GTTTCTTCCTGTGCAAAAGMAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCACGCGGSATG	378		
Sbjct 387	GTTTCTTCCTGTGCAAAAGCAGTTTACAATCCATAGGACCGTCATCCTGCACGCGGCATG	328		
Query 379	GCTGGWTCAGGCTYKCGCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCK	438		
Sbjct 327	GCTGGTTCAGGCTTGCGCCATTGACCAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT	268		
Query 439	GGTCCGTGTCTCAGTACCAgggggggggATCTCCCTCTCAGGACCCCTACCCATCGTKGC	498		
Sbjct 267	GGTCCGTGTCTCAGTACCAAGTGTGGGGGATCTCCCTCTCAGGACCCCTACCCATCGTTGC	208		
Query 499	CTTGGKAAGCCGTTACCTTACCCAATAKCTAATGGKGCSCATGCTCATCTTTTACCGYK	558		
Sbjct 207	CTTGGTAAGCCGTTACCTTACC-AACTAGCTAATGGGACGCATGCTCATCTTTTACCGTT	149		
Query 559	GWGAYTTTAATAKTGWGGTKGATGCCAACTCACTATACTATGAGGTATTAATCCAAWATTT	618		
Sbjct 148	GTGACTTTAATAGTGTGT-GATGCCAACTCACTATACTATGAGGTATTAATCCAAATTT	90		
Query 619	MTCTGGKMTATCCCTCTGWAAAAGGWAKATTGCATACGYKTYACGCACCCGYGCCCGGT	678		
Sbjct 89	CTCTGGGCTATCCCTCTGTAAAAGGTAGATTGCATACGCGTTACGCACCCGTGCGCCGT	30		
Query 679	CTCAAWMATKGMTATTCTACCCCTC	703		
Sbjct 29	CTCAATATTGCTATTCTACCCCTC	5		

Şekil 3.18. *Flavobacterium psychrophilum* taksonunun hizalama (alignment) sonucu (Query: *Flavobacterium psychrophilum*, Sbjct: *Flavobacterium psychrophilum* 16S ribosomal RNA (Sequence ID: KU212250.1))

4. TARTIŞMA

Bu araştırmada; Kılavuzlu baraj gölünde Aralık 2022 ve Temmuz 2023 tarihleri arasında 68 farklı alabalık işletmelerinden 1.088 adet Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hastalık belirtisi gösteren 5 gramdan küçük yavru ezilerek vücut sıvısından ve 5 gramdan büyük yavru canlı balıkların göz, karaciğer, dalak, böbrek, bağırsak ve deri dokularında patojenlerin bilinen klasik kültür yöntemiyle izolasyonu ve Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) ile fenotipik özelliklerine göre identifikasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca PCR (Polymerase Chain Reaction) ve sekans analizi yardımıyla moleküler tanımlamasının yapıldı. BIOLOG GEN III otomatik tanılama sistemi, PCR (Polymerase Chain Reaction) ve sekans analizi sonuçlarına göre *Flavobacterium psychrophilum* olduğu belirlendi.

Schmidt ve ark., (2000); çalışmalarında balık örneklerini stomacher'da homojenize ederek bakteriyolojik ekim için hazırladıkları bildirmişlerdir. Yine diğer bir araştırmada (Yıldırım, 2007) ise balık materyali porselen havanda ezilerek bakteriyolojik ekimde kullanılmıştır. Daha steril olması ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı bu araştırmada da stomacher homojenizatörü tercih edildi. Buna göre Araştırmanın yapıldığı 4 işletmeden 8 ay boyunca alınan toplam 1835 adet yumurta, povidin/iodin solüsyonuyla yıkanmış yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru, 5 gramdan küçük yavru ve yem örnekleri stomacher'da başarılı bir şekilde homojen edilerek bakteriyolojik ekimde kullanıldı.

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

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

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

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

Yapılan bazı çalışmalarda (Diler ve ark., 2003; Korun ve Timur 2001; Didinen ve ark., 2005) oksidaz testinin negatif ve bazılarında (Bernardet ve Kerouault 1989; Ostland

ve ark., 1997; Elsayed ve ark., 2006) da bu testin pozitif sonuç verdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada izole edilen bütün suşların oksidaz negatif olduğu belirlenmiştir. Bu durum *F. psychophilum* suşları arasında fenotipik farklılıkların görülebileceği görüşünü desteklemektedir. *F. psychophilum*'un identifikasyonunda Cipriano ve Holt (2005) ile Didinen ve ark., (2005) O/F testinin negatif olduğunu, İspir ve ark., (2004) ise oksidasyon testinin negatif ve fermantasyon testinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da bazı suşlarda fermantasyon testi pozitif, bazılarında da negatif olduğu saptandı. *Flavobacterium psychrophilum* referans bakteri suşunun ise O/F testinin negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

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

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

Çevre koşullarındaki olumsuz değişimlerle balıkların hastalanmalarına yol açan bu

etken, su ve balıkların ovaryum sıvısı ve sindirim sisteminin doğal florasında da bulunmaktadır (Sarıeyyüpoğlu, 1984; Austin ve Austin, 1987; Holt ve ark., 1993; Gonzalez ve ark., 1999; Cengizler, 2000; Gonzalez ve ark., 2001; Nematollahi ve ark., 2003; Hatha ve ark., 2005; Arda ve ark., 2005; Skrodenyte-Arbaciauskiene ve ark., 2006; Kubilay ve ark., 2009a; Kubilay ve ark., 2009b). Etkenlerin hem su ve hem de balık örneklerinde izole edilmiş olması bu konuda çalışan araştırmacıların (Sarıeyyüpoğlu, 1984; Austin ve Austin, 1987; Holt ve ark., 1993; Gonzalez ve ark., 1999; Cengizler, 2000; Gonzalez ve ark., 2001; Nematollahi ve ark., 2003; Hatha ve ark., 2005; Arda ve ark., 2005; Skrodenyte-Arbaciauskiene ve ark., 2006; Kubilay ve ark., 2009a; Kubilay ve ark., 2009b) sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Flavobacterium psychrophilum'un neden olduğu hastalık, balık türlerine göre farklı mortalite oranları ile seyretmektedir. Coho Salmon (*Oncorhynchus kisuch*) balıklarında bu etkenden dolayı % 50 oranında mortalite görüldümütür (Holt, 1987). Hastalığın gökkuşağı alabalık yavrularında yem almaya başladıktan iki ay sonra meydana geldiği ve mortalitenin % 75 civarında olduğu bildirilmiştir (Lorenzen ve ark., 1991; Bruno, 1992). Bu araştırmada da işletmede yavru balıklar yem almaya başladıktan 20–50 gün sonra ölümlerin görülmesi, hastalığın yavru alabalıkların ilk aylarında ortaya çıkabileceğini doğruladı. Ancak işletmelerdeki mortalite oranlarının işletmede % 20 diğer araştırmacıların (Holt, 1987; Lorenzen ve ark., 1991; Bruno, 1992) bildirdiği oranlardan daha düşük olduğu görüldü. Bu durum, işletmelerin su kaliteleri arasındaki farklılıklarla hastalığın mortalitesi arasında bir ilişki olduğu ve su kalitesi iyi olan işletmelerde mortalitenin düşük seyrettiği şeklinde yorumlandı.

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

Korun ve Timur (2001), Diler ve ark., (2003), İspir ve ark., (2004), Timur ve Korun, (2004), Didinen ve ark., (2005) araştırmacılar izole ettikleri etkenlerin Amoksisillin/klavulanik asit, Ampisilin, Eritromisin ve Gentamisine ise duyarlı olduklarını

bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise *Flavobacterium psychrophilum* suşlarının Amoksisilin/Klavulanik asit, Ampisilin, Eritromisin ve Gentamisine karşı direnç gösterdiği görüldü. Bu durum ülkemizde coğrafik bölgelere göre izole edilen *Flavobacterium psychrophilum* suşlarının antibakteriyellere karşı duyarlılıklarının farklılık gösterebileceğini ya da izole edilen suşların antibakteriyellere direnç kazanmış olabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada, yurdumuzda ve dünyanın birçok ülkesinde gökkuşağ alabalıklarında hastalık oluşturan ve büyük ekonomik kayıplara yol açan, Psikrofilozis (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkul hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS)'in etkenlerinden *Flavobacterium psychrophilum*'un klasik kültür yöntemi ile izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. Ayrıca Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate) yöntemi ile bu etkenlerin 71 farklı karbon kaynağının kullanımı ve 23 kimyasala karşı hassasiyet (engelleyici kimyasallara dayanıklılık) testinden oluşan 94 fenotipik test yönünden analiz edildi. Bakteriyel hastalıkların teşhisinde hızlı sonuç veren moleküler bir teknik olan PCR (Polymerase Chain Reaction) kullanılarak, moleküler olarak *Flavobacterium psychrophilum*'un identifikasyonu gerçekleştirildi. İnsanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların identifikasyonunda kullanılan önemli bir teknik olan 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemi *Flavobacterium psychrophilum*'un tanımlanmasında kullanıldı. Böylece kültürden üretilmiş *Flavobacterium psychrophilum*'un PZR tekniği ile tanısı kısa bir sürede yapılması sonucu, zamanında uygulanacak tedavi ile balıkçılık işletmelerinde büyük ekonomik kayıpların önüne geçilecektir.

Hastalıktan şüpheli balıkların morfolojik özelliklerine bakılarak kesin ve doğru teşhisi mümkün değildir. Bu nedenle klasik kültür yöntem, Biolog Sistemi (The biolog GENIII micro plate), PCR (Polymerase Chain Reaction) ve sekans analizleri yapılması gerekmektedir.

Kültür balıkları yetiştiriciliğinde balıkların birbirleriyle yakın temasta bulunmaları, suların çabuk kirlenmesi ve su kalitesinin (fiziksel, kimyasal, ve mikrobiyolojik parametrelerinin) optimal değerlerin dışına çıkması gibi nedenlerle balıklar arasında Psikrofilozis (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkul hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS) enfeksiyonları kolayca ortaya çıkmakta, yayılmaktadır. Bu nedenle zamanında gerekli koruyucu önlemler alınmalı ve değişen yaşam koşulları düzeltilmelidir.

Balıklarda Stres immune (bağışıklık) sisteminin devre dışı kalmasına ve balığın *Flavobacterium psychrophilum*'a karşı korumasız hale gelmesine neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı balıkları stresten uzak tutabilmek için kültür koşullarının (sıcaklık, ışık, oksijen, stok yoğunluğu vb) optimum olarak sağlanması, su kalitesinin yüksek tutulması, uygun yemlerin kullanılması, gereksiz ilaç ve kimyasal kullanımının terk edilmesi ve gürültünün minimuma indirilmesi gibi koşullara azami bir şekilde özen gösterilmelidir.

Psikrofilozis (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkul hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS) Enfeksiyonları ile mücadelede antibiyotiklerin kullanımı oldukça yaygın kullanılan bir yöntemdir. Antibiyotikler zamanla suda kirliliğe balıkta da kalıntılara ve antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların gelişmesine, sucul çevreye ve insan sağlığına zararlı sonuçlar ortaya çıkarması nedeniyle balıklarda kullanımı tercih edilmemelidir.

Hastalıklardan korunmada en geçerli yol, başladıktan sonra durdurmak yerine, başlamaması için önlem almaktır. Bu nedenle salgın balık hastalıkları ile mücadelede de en etkin yöntem aşı kullanmaktır.

Kılavuzlu baraj gölünde bulunda gökkuşağı alabalık yetiştiricilik tesislerinde *Flavobacterium psychrophilum* tespit edildi. Bölgede porsiyonluk balık alışverişi olduğundan dolayı bulunan tüm tesislere Psikrofilozis (Bakteriyel soğuk su hastalığı, Pedinkul hastalığı, Rainbow Trout Fry Syndrome -RTFS) bulaşma riski de vardır. Bu nedenle, işletmeler sterilizasyona gerekli önemi vermeli mutlaka karantina havuzları kullanılmalıdır.

İşletmeler, koruyucu olarak ve balıkların bağışıklık sistemini artırması için özellikle ilkbahar dönemlerinde yemlere katılmak üzere Vitamin C ve Vitamin E kullanımı konusunda bilinçlendirilmelidir.

Çalışma sonucunda hastalığın bölgede ekonomik anlamda büyük zararlar meydana getirmediği görüldü. Üreticilerin hastalıklara karşı ilaç uygulamaları konusunda tam ve yeterli bilgiye sahip olmamalarının yanında bakteriyel patojenlerin zaman içinde antibakteriyellere karşı farklı duyarlılık düzeyleri geliştirdikleri göz önünde bulundurularak üreticilerin bilinçsiz ilaç uygulamalarından kaçınmaları sağlanmalıdır. Balık hastalık ve zararlılarına karşı kullanılan her türlü aşı, ilaç, hormon, dezenfektan ve kimyasalların satışı kontrol altına alınmalı, bilgisiz ve yetkisiz kişilerin çiftliklerde satış yapmaları engellenmelidir. Hastalık etkeni ve suşları tam olarak tespit edilmeli, rastgele ilaç kullanmaktan kaçınılmalıdır.

Günümüz kültür balıkçılığında zorunlu manipulasyonlar, yoğun stoklama, azalan çözünmüş oksijen miktarı, suda biriken balık atıkları ve stres oluşturacak tüm koşullardan kaçınılmalıdır. İşletmelerdeki yetiştirme şartları uygun değil ise mutlaka düzeltilmelidir.

Balık işletmeleri, hastalıklardan korunmada en geçerli yol; hastalık başladıktan sonra ilaçlarla durdurmak yerine, hastalık çıkmadan önce gerekli koruyucu önlemler

almaktır. Bu nedenle salgın balık hastalıkları ile mücadelede de en etkin yöntem aşı kullanmaktır.

İşletme sahipleri ve çalışanları; kültürel önlemler, dezenfekten tedbirleri, hastalık belirtileri, numune seçme, numune taşıma, müracaat edeceği yerler hakkında bilgilendirilmeli ve eğitilmelidir.

İşletmelerde; önce kültürel önlemler alınmalı, aşı uygulamaları yapılmalı, hastalık bulaşmasını önleyecek dezenfekten tedbirleri alınmalıdır. Bunlara rağmen hastalık görülmüş ise önce hastalık tam olarak tespit edilmeli, antibiyotik duyarlılık testi yapılmalı ve hastalığa karşı ilaçlı mücadele başlatılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alp, A., Büyükçapar, H.M., (2006). Kahramanmaraş'ta su ürünleri sektörünün gelişimi ve balıkçılığa uygun su kaynakları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9, (1): 104-109.
- Anderson, D.P. (1974). *Fish Immunology*. T.F.H. Publications Inc. Ltd., ISBN: 0876660367 239 p
- Anonim, (2008). Biolog Gen III Microplate Instruction for Use.
- Anonim, (2000). Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 5th Informational Supplement, M100-S5, Volume 14, No:16, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- Anonim, (2001). Performance Standards for Antimicrobial disk susceptibility tests, 5th Edition, Approved Standard, M2-A5, Volume 13, No:24, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
- Arda, M. (1995). *Biyoteknoloji, (Bazı Temel İlkeler)*. Kükem Derneği Bilimsel Yayınlar No:3, Armoni Ltd. Şti., Ankara.
- Arda, M. (2000). *Temel Mikrobiyoloji; "Genişletilmiş İkinci Baskı.. Medisan Yayın Serisi no 46. Ankara"*.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, S. (2005). *Balık Hastalıkları*. Medisan Yayın Serisi:61 Ankara. 230s.
- Arı, Ş. (1999). *DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, ed.: Temizkan, G, Arda, M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEİM); Yayın No: 1, İstanbul, 57-68.
- Austin, B., Austin, D.A. (1987). *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. Ellis Horwood Ltd. Chichester, 363pp.
- Austin, B. (1992). The recovery of *Cytophaga psychrophila* from Two Cases of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Fry Syndrome in the U.K. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 12: 207–208.
- Austin, B., Austin, D.A. (1999). *Characteristics of The Pathogens: Gram-negative Bacteria*. In: *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. (Eds.: B.

- Austin, D.A. (1990). Third (revised) edition. Praxis Publishing Ltd., New York. s. 102–118.
- Avcı, H., Aydoğan, A., Tanrikul, T.T., 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: 313-318.
- Aydoğan, A. (2005). *Aeromonas salmonicida* ile enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) patolojik bulguların incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Baliarda, A., Faure, D., Urdaci, M.C. (2002). Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 510–516.
- Balta, F. (1997). Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. *IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*. 17–19 Eylül 1997, Eğirdir/Isparta. 641- 648.
- Bauer, AU., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Track M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Journal Clinical Pathology*, 45: 493-494.
- Bej, A.K., Mahbubani M.H., Atlas, R.M. (1991). Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PZR) and Other Method and Their Amplications. *Critical Reviews in Biochemistry and molecular Biology*, 26: 301–334.
- Bernardet, J., Grimont, P.A.D. (1989). Deoxiribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. Nov., Nom., Rew., *Flexibacter psychrophilus* sp. Nov., Nom., rew., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida and Masumaru 1986. *International Journal of Sistematic Bacteriology*, 39:346-354.
- Bernardet, J.F., Keroualt, B. (1989). Phenotypic and Genomic Studies of “*Cytophaga psychrophila*”, Isolated from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbial.* Vol. 55, No: 7, 1796–1800.
- Bernardet, J.F. (1997). Immunization with bacterial antigens *Flavobacterium* and *Flexibacter* infection. *Developments in Biological Standardization* 90: 179 – 188.

- Bernardet, J.F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P. (1996). Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family Flavobacteriaceae, and Proposal of *Flavobacterium hydatidis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 128–148.
- Bilgehan, H. (1995). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 2. Baskı, Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları, Ankara, 641–705.
- Bochner, B.R. (1989a). Sleuthing out Bacterial Identities. *Nature*, 339: 157-158.
- Bochner, B.R. (1989b). “Breathprints” at the Microbial Level. *ASM News* 55: 536-539.
- Bowser, P.R. (1999). “*Diseases of Fish*”, PhD, *Aquatic Animal Health Program, Department of Microbiology and Immunology*, College of Veterinary Medicine Cornell University, Ithaca, New York, 26 p.
- Bruno, D.W. (1992). “*Cytophaga psychrophila*, (*Flexibacter psychrophilus*)(Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) in the UK ”. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12 (6): 215-216.
- Buckley, R., Clough, E., Warken, W., Wild, C. (1998). Coliform Bacteria in Streambed Sediments in a Subtropical Rainforest Conservation Reserve. *Wat.Res.*, 32(6), 1852-1856.
- Bustos, P., Calbuyahue, A., Maontaña, J., Opazo, B., Entrala, P., Solervicens, R. (1995). First isolation of *Flavobacterium psychrophilum* as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) in Chile. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15: 162–164.
- Carlos, V.S., Oscar, R.S., Irma, Q.R.E. (2001). Occurrence of *Listeria* Species in Raw Milk in Farms on the Outskirts of Mexico city. *Food Microbiol*, 18: 177–181.
- Cengizler, İ. (2000). *Balık Hastalıkları Ders Kitabı*. Çukurova Ünivesitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 7, 136s.
- Cepeda, C., Santos, Y. (2000). Rapid and low-level toxic PCR-based method for routine identification of *Flavobacterium psychrophilum*. *Internatl. Microbiol.*, 3: 235–238

- Chai, H., Archambault, M., Prescott, J.F. (2003). 16S Ribosomal RNA Sequence-based Identification of Veterinary Clinical Bacteria. *J. Vet Diagn Invest*, 15: 465-469.
- Cipriano, R.C., Holt R.A. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, Cause of Bacterial Cold- Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No:86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV. 44s.
- Coote, U.G. (1990). Amplification of Nucleic Acids by the Polymerase Chain Reaction. *Article*, 57-59.
- Cowan, S.T. (1974). Manual for The Identification of Medical Bacteria, University Printing House, Cambridge, 238p.
- Crump, E.M., Perry, M.B., Clouthier, S.C., Kay, W.W. (2001). Antigenic Characterization of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 750-759.
- Çolak, A. (1982). *Balık Hastalıkları Elkitabı*. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları, No:1, Esnaf matbaası, Sivas, 138s.
- Dalsgaard, I., Madsen, L. (2000). Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at danish freshwater farms. *J. Fish Dis.*, 23: 199-209.
- Dalsgaard, I. (2001). Seletion of media for antimicrobial susceptibility testing of fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 196: 267-275.
- Daskalov, H., Austin, D.A., Austin B. (1999). An improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Letters in Applied Microbiology*, 28: 297-299.
- Delen, D. (2007). *Deneyisel olarak enfekte edilen gökkuşağı Alabalığı (Oncorhynchus mykiss)' nda Flavobacterium psychrophilum' un floresan antikör teknikleri ile saptanması üzerine bir araştırma*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi. 56s.
- Didinen, B.I., Diler, Ö., Ekici, S., Altun, S. (2005). *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının teşhisinde API ZYM kullanımı ve ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1 (2): 64-70.

- Diler, Ö., Altun, S., Çalikuşu, F., Diler, A. (2000). Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin yaşadığı ortam ile ilişkili kalitatif ve kantitatif bakteriyel florası üzerine bir araştırma. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 24: 251–259.
- Diler, Ö., Altun, S., Işıklı, B.I. (2003). Kültürü yapılan gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7.1, 1–8.
- Donnelly, C.W. (1986). Listeriosis and dairy products: Why now and why milk? *Hoard's Dairyman*, 131, 663-687.
- Egidius, E. (1987). Vibriosis: pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture*, 67, 15-28.
- Ekman, E. (2003). *Natural and experimental Infections with Flavobacterium psychrophilum in salmonid fish*. Swedish University of agricultural sciences, Doctoral thesis, 47s.
- Eldar, A., Gorla, M., Ghittino, C., Zlotkin, A., Bercovier, H. (1999). Biodiversity of *Lactococcus garviae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1005–1008.
- Elsayed, E.E., Eissa, A.E., Faisal, M. (2006). Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from sea lamprey, *Petromyzon marinus* L., with skin lesion in Lake Ontario. *Journal of Fish Diseases*, 29: 629-632.
- Esteban, J.I., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R.A., Hurtado, A. (2009). Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 5, 1-10.
- Evensen, Ø., Lorenzen, E. (1996). An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Diseases of Aquatic Organisms* 25, 53–61.
- Faruk, R.A. (2000). *Characterisation of Flavobacterium psychrophilum, the causative agent of rainbow trout fry syndrome*. PhD Thesis, University of Stirling, Stirling.
- Frerichs, G.N., Millar, S.D. (1993). *Manual for The Isolation and Identification of Fish bacterial Pathogens*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Pisces Pres, Stirling. 60s.

- Gonzalez, C.J., Lopez-Diaz, T.M., Garcia-Lopez, M.L. Prieto, M., Otero, M. (1999). Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Food Protection*, 62(11): 1270-1277.
- Gonzalez, C.J., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.L., Gonzalez, N., Otero, A. (2001). *Mesophilic aeromonads* in wild and aquacultured freshwater fish. *Journal of Food Protection*, 64(5): 687-691.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J., Christol, J.J. (2005). Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2):131-134.
- Holt, R.A. (1987). *Cytophag, Psychrophil, the Causative Agent of Bacterial Cold-Water Disease in Salmonid Fish*. Oregon State University A Thesis 182 p.
- Holt, R.A., Rohovec, J.S., Fryer, J.L. (1993). “*Bacterial cold-water disease*”, In: “*Bacterial Diseases of Fish*”, Inglis, V., Roberts, R. and Bromage, N. R. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford., 312p.
- Inglis, V., Roberts, J.R., Bromage, R.N. (1993). Bacterial cold water disease. *Bacterial Disease of Fish*, 1-22.
- Izumi, S., Fujii, H., Aranishi, F. (2005). Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *Journal of Fish Diseases*, 28, 9: 559–564,
- Izumi, S., Ouchi, S., Kuge, T., Arai, H., Mito, T., Fujii, H., Aranishi, F., Shimizu, A. (2007). PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish. Dis. Mar.*, 30(3):141–7.
- İnce, H. (2010). Balık hastalıklarında teşhis yöntemleri, Erişim: [<http://www.ziraatci.com/editor/yazigoster.asp?katid=30&editid=427&yaziid=1260&manual=off&kategori=Su%20%C3%83%C5%93r%C3%83%C2%BCnleri>], Erişim tarihi: 30.09.2010.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., Dörücü, M. (2004). Doğu Anadolu Bölgesinde Bazı Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* Enfeksiyonunun Araştırılması. *Fırat Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(4): 718–724.

- Kandil, M. (1976). *Balık hastalıkları*. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları: 5. Ankara, 995s.
- Korun, J., Timur, G. (2001). Gökkuşığı Alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 12:15-30.
- Kubilay A., Altun, S., Savaş S. (2009b). A study on aerobic bacterial flora during incubation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) eggs in hatchery. *Journal of Fisheries Sciences*. 3(1) 5–9.
- Kubilay, A., Altun, S., Didinen, B.I., Ekici, S., Diler, Ö. (2009a). Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* İzolasyonu. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 15 (5): 709–715.
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırcan, S., Sekin, S. (2004). Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* İzolasyonu ve Etkili Antibakteriyel Sağaltım Seçeneğinin Belirlenmesi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*. 75, 3, 47-53.
- Kumagai A., Nakayasu C., Oseko N. (2004). Effect of Tobramycin Supplementation to Medium on Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Japan Science and Technology Agency*, 39,2: 75-78.
- Kusuda, R. (1982). Development of intensive freshwater fish culture project, the Hungarian People's Republic fish disease research, Erişim: [<http://www.fao.org/docrep/field/003/P6713E/P6713E04.htm>], Erişim Tarihi: 30.09.2010.
- Larsen, J.L., Rasmussen, H.B., Dalsgaard, I. (1988). Study of *Vibrio anguillarum* strains from different sources with emphasis on ecological and pathological properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2264-2267.
- Lehmann, J., Mock, D., Sturenberg, F.J., Bernardet, J.F. (1991). First Isolation of *Cytophaga psychrophila* from a Systemic Disease in Eel and Cyprinids. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10: 217–220.
- Lido, Y., Mizokami, A. (1996). Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, 31, 157 – 164.

- Lorenzen, E., Olesen, N.J. (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 209–220.
- Lorenzen, E. (1994). *Studies on Flexibacter psychrophilus in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS)*. National Veterinary Laboratory, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen. Ph.D. thesis. 174p.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., Bernardet, J.F. (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome I: phenotypic and genomic studies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31: 197-208
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., From, J., Hansen, F. M., Horlyck, V., Korsholm, H., Møllergaard, S., Olesen, N.J. (1991). Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 11: 77–79.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., Ferguson, H.W. (1996). Necrotic Myositis in Cage Cultured Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Caused by *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of fish diseases*, 19; 113–119.
- Madetoja, J., Wiklund, T. (2002). Detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in water from fish farms. *System. Appl. Microbiol.* 25: 259–266.
- Madetoja, J., Hänninen, M-N., Hirvelä-Koski, V., Dalsgaard, I., Wiklund, T. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from Finnish fish farms. *J. Fish Dis.* 24: 469–479.
- Marx, J.L. (1988). Multiplying Genes by Leaps and Bounds. *Science*, 240: 1408–1410.
- Midtlyng, J.P. (2002). Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science*, 69: 4201-4208.
- Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* 262,(4): 56-65.
- Nematollahi, A ., Decostere, A ., Pasmans, F., Haesebrouck, F. (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 26: 563–574.
- no 46. Ankara".

- Olive, D.M., Bean, P. (1999). Principles and Applications of Methods for DNA- Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661-1669.
- Ostland, V.E., McGrogan, D.G., Ferguson, H.W. (1997). Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of Fish Diseases*, 20: 443-451.
- Pacha, R. E. (1968). Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated from outbreaks of bacterial cold-water disease. *Applied Microbiology*, 16(1), 97-101.
- Plumb, J.A. (1999). *Health maintenance and pirincipal microbial disease of cultured Fishcs*. Iowa State University/Amcs, 328p.
- Plumb, J.A., Browser, P.R. (1983). “*Microbial Fish Disease Laboratory Manual*”, Brown Printing Company Montgomery, First printing, Alabama.95 p.
- Quirke, P. (1992). Molecular Biology and Infections of the Gut. *Gut*, 33: 1441–1443.
- Roberts, J.R. (2001). *Fish Pathology*. 3rd ed., W.B. Saunders, USA.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487–491.
- Sander, J.E., Fryer J.L. (1988). *Bacteria of Fish in "Methods in Aquatic Bacteriology"* (Ed by AUSTIN), John wiley & Sons ltd., Cichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Santos, Y., Huntly, P.J., Turnbull, A., Hasting, T.S. (1992). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) in association with rainbow trout mortality in the U.K, *Bull. of The European Ass. of Fish Pathol.*, 12, 209-210.
- Sarıeyyüpoğlu, M. (1984). Gökuşağı Alabalıklarında (*S. gairdneri*) Mide-Bağırsak Bakteriyel Florasının Aerobik Yönden İncelenmesi. *Doğa Bilim Dergisi*, 8, 3: 281-287.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4908–4915.

- Schmidtke, L.M., Carson, J. (1995). Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21:157-161.
- Shotts, E. B., Starliper, C.E. (2003). *Flavobacterial diseases: columnaris disease, cold-water disease and bacterial gill disease*. Pages 559–573 in P. T. K. Woo and D. W. Bruno, editors. *Fish diseases and disorders, Volume 3: viral, bacterial and fungal infections*. CAB International, Wallingford, UK.
- Shotts, E.B., Starliper, C.E. (1999). *Flavobacterial Disease: Columnaris Disease, Cold-water Disease and Bacterial Gill Disease*. In *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3, Eds. Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 559-577.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C. (2001). Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem.* 36:781-785.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Sruoga, A., Butkauskas, D. (2006). Assessment of microbial diversity in the river trout, *Salmo trutta fario* L., intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence Analysis. *Fisheries Science*, 72(3): 597–602.
- Soltani, M., Shanker, S., Munday, B.L. (1995). Chemotherapy of Cytophaga /Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials. *Journal of Fish Diseases*, 18: 555-565.
- Starliper, C., Marcquenski S., Noyes A. (2007). *Development of an improved medium for primary isolation of Flavobacterium psychrophilum, cause of bacterial coldwater disease*. Great Lakes Fishery Commission Research Report.
- Stenholm, A. R., Dalsgaard, I., Middelboe, M. (2008). Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology*, 74(13), 4070-4078.
- Supriyadi, H., Rukyani, A. (1992). The use of chemotherapeutic agents for the treatment of bacterial disease of fish and shrimps in Indonesia. *Disease in Asian Aquaculture I*: 515–517.
- Suzuki, K., Arai, H., Kuge, T., Katagiri, T., Izumi S. (2008). Reliability of PCR Methods for the Detection *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathology*, 43 (3), 124-127.
- Swaminathan, B., Matar, G.M. (1993). *Molecular Typing methods*. “*Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*”. ASM. press Washington DC. 26-50.

- Taylor, G.R. (1993). *Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Automation*. In PZR: A Practical Approach, Eds: McPherson, M.J., Quirke, P. and Taylor, G.R. Oxford University Press, Oxford, 1-14.
- Timur, G., Korun, J. (2004). First Outbreak of Vibriosis in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Istanbul University Journal of Fisheries*, 18, 1-9.
- Timur, M., Timur, G. (2003). *Balık Hastalıkları Kitabı*. TC. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Rektörlük Yayın No: 4426, Su Ürünleri Yayın No: 5, 238, İstanbul. 588 s.
- Toranzo, A.E., Barja, L.J. (1993). "Fry Mortality Syndrome (FMS) In Spain. Isolation of The Causative Bacterium *Flexibacter psychrophilus*". *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 13(1):30-32.
- Toshio N., Yuichi, I., Hajime, A., Takahiro N., Shotaro, I. (2006). A Newly Designed Culture Medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Japan Science and Technology Agency*, 28; 33-37.
- TÜİK. (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. Su ürünleri istatistikleri; <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30697>, Erişim Tarihi: 18.12.2023.
- URL-1 <http://www.mikrobiyoloji.org/> Bazı Önemli Biyokimyasal Testler. 11 Ekim 2009.
- Vastos, I.N., Thompson, K.D., Adams, A. (2003). Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Org.* 56: 115–126.
- Wakabayashi, H., Toyama, T., Lida, T. (1994). A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathology*, 29, 101-104.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönnström, L., Dalsgaard, I. (1994). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14 (2): 44-46.
- Wiklund, T., Madsen, L., Bruun, M. S., Dalsgaard, I. (2000). Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 299–307.

Yıldırım, S. (2007). *Mersin Çağlarca Köyündeki Gökkuşığı Alabalığı (Oncorhynchus mykiss, Walbaum, 1792) Kuluçkahanelerinde Flavobacterium spp.'nin Araştırılması*. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 79s.