

## **Ağ Kafeslerde Yetiştiriciliği Yapılan Çipura (*Sparus aurata* L.) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) Balıklarında Vibriosiz ve Pasteurellosis 'in Araştırılması<sup>1</sup>**

**Fatma Yaman<sup>2</sup>, Selçuk Seçer<sup>3</sup>, A. Kadir Halkman<sup>4</sup>**

### **1. Giriş**

Dünya nüfusuyla paralel olarak artan besin ihtiyacı nedeni ile kültür balıkçılığı da bir gelişme göstermiştir. Önceleri sadece avcılıkla sağlanan su ürünleri üretimi, av miktarının düşmesi ile balık kültürünü giderek zorunlu bir ihtiyaç haline getirmiştir (1).

Ülkemizde çipura ve levrek balığı yetiştiriciliğinin, 1980 'li yıllarda Ege kıyı şeridinde doğadan yakalanan yavru balıkların düzenli bir şekilde beslenmesi ile başladığı bilinmektedir. 1999 yılı itibarı ile, toplam 1.079 adet balık çiftliği içerisinde, ağ kafeslerde çipura ve levrek yetiştiriciliği yapan tesis sayısı 161 adettir. Bu işletmelerin sayıca % 50'si, üretim kapasitesi olarak % 80'i Muğla ilimizde bulunmaktadır (2).

Balıklar içerisinde bulundukları ortam nedeniyle sürekli olarak mikroorganizmalarla temas halindedir. Bu nedenle bakteriyel hastalıklar, yoğun balık yetiştiriciliğinin yapıldığı çiftliklerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli rolü balığın doğal direncini kıran etkenler oynamaktadır (3). Genel olarak kültürü yapılan balıklarda hastalık insidensi, kültürü yapılmayan doğal ortamda bulunan balıklardakine göre daha yüksektir.

Son yıllarda yeni türlerin kültüre alınması, yetiştiricilikte yeni metot ve coğrafik alanların kullanılmasıyla birlikte balık hastalıkları da dikkat çekmeye başlamıştır.

Doğadan yakalanan veya kuluçkahanelerde büyütüldükten sonra yüzer ağ kafeslerde besiyeye alınan çipura ve levrek balıklarında hastalıklardan dolayı % 50 'lere varan ölümler görülmektedir. Bu durum büyük ekonomik kayıplara yol açarken üretim maliyetlerinin de artmasına neden olmaktadır (4).

Akuakültür, dünyada bir endüstri halindedir ve bu alanda yetiştiriciler maliyeti düşürmek için birim m<sup>3</sup> suda maksimum balık yetiştirmenin yollarını aramaktadır. Bu durum doğada yaşamaya alışmış balıklarda stres nedeni olmaktadır (5). Ayrıca balığın hapsedildiği kafes ve havuzdan çıkamaması olumsuz çevre şartlarından

<sup>1</sup> Bu çalışma Ankara Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalında Prof. Dr. Selçuk Seçer ve Prof. Dr. Kadir Halkman 'ın ortak danışmanlığı altında Fatma Yaman tarafından yapılan ve 2002 yılında tamamlanan aynı adlı Yüksek Lisans tezinin tam metnidir.

<sup>2</sup> M. Sc. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi, Dışkapı Ankara.

<sup>3</sup> Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü Dışkapı Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [secer@agri.ankara.edu.tr](mailto:secer@agri.ankara.edu.tr)

<sup>4</sup> Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Dışkapı Ankara.

kaçmasını engellemektedir. Suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki değişikliklerin, balıkların elden geçirilmesinin, beslemenin düzensiz ve dengesiz yapılmasının strese neden olduğu bilinmektedir. Stres altındaki balıkta kan kortizoller seviyesi yükselir ve bunun immunosupresif etkisi nedeni ile vücudun genel savunma mekanizması baskılanarak balık enfeksiyöz ajanlarla mücadele edemeyerek hastalanır (6). Enfeksiyöz hastalıkların ortaya çıkmasında konakçı, patojenin virülensi ve çevre arasında bir ilişki söz konusudur. Çevre şartlarındaki herhangi bir olumsuz değişiklik strese neden olurken hastalık etkeninin virülensi ve miktarı da hastalığın çıkmasında önemli bir faktördür (5).

Çipura ve levrek balıklarının başta gelen bakteriyel hastalıklarından vibriosis ve pasteurellosis tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de üretimi kısıtlayan en önemli faktörler arasındadır (7). Her yaştaki deniz balıklarından izole edilen vibriosis nedeni ile sadece Japonya'nın yıllık kaybı 11 milyon sterlin kadardır (8). *Pasteurella piscicida* da çipura balıklarında ağır kayıplara neden olmaktadır (9). Çipura ve levrek balıklarında görülen diğer bakteriyel hastalıklar daha az düzeyde kayıplara neden olmaktadır.

Bu araştırmada, yüzer ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan çipura ve levrek balıklarında hastalık görülen dönemlerde başta *Vibrio* ve *Pasteurella* aranmış, çalışmalar süresince diğer Gram negatif patojenler de incelenmiştir. Ayrıca enfeksiyon dönemlerinde enfeksiyon üzerine suyun kimyasal ve mikrobiyolojik kriterlerinin olası etkisi de araştırılmıştır.

## 2. Kaynak Özetleri

Doğal ortamlarda yetişen ya da ağ kafeslerde yetiştirilen çipura ve levrek balıklarında pek çok Gram negatif bakteriyel etmen hastalık oluşturmaktadır. Çizelge 2.1 'de bu etmenler balık türü, balık büyüklüğü ve başlıca klinik belirtileri ile birlikte verilmiştir (10).

### 2.1. Vibriosis

Deniz ve acı suda yaşayan balık türlerinin en önemli ve iyi bilinen bakteriyel hastalığı vibriosis'tir. Hastalık birçok literatürde red pest, red disease, pestis rubia anguillarum, erysipelosis anguillarum, cod pest, eye disease, ulcer disease, bakteriyel dermatitis ve tuzlu su furunkulozisi gibi isimlerle ifade edilmiştir. Zaman içinde Listonellozis ismi kabul edilmesine rağmen bir çok araştırmacı vibriosis deyimini tercih etmiştir (11). Farklı vibrio türlerinin her yaştaki çipura ve levrek balıklarında hastalık oluşturduğu belirtilmiştir (12).

Vibriosis etmeni olan *Vibrio* ilk defa 1718 yılında yılan balıklarında görülen bir epizootiden izole edilmiştir. Etkenin identifikasyonu 1893 yılında Canestrini tarafından yapılarak *Bacterium anguillarum* olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra Bergman tarafından 1907 'de İsveç'te kafeslerde yetiştiriciliği yapılan yılan balıklarından aynı etken izole edilmiş ve 1909 yılında da identifikasyonu tamamlanarak bakteriye *Vibrio anguillarum* adı verilmiştir (13).

Çizelge 2.1. Çipura ve levrek balıklarında tanımlanan Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlar (10).

| Bakteri                               | Balık          | Balık büyüklüğü | Başlıca klinik belirtiler |
|---------------------------------------|----------------|-----------------|---------------------------|
| <i>Vibrio anguillarum</i> serotip u.k | Çipura         | Larva           | Larvada ölümler           |
| <i>V. anguillarum</i> serotip 1       | Levrek         | Yavru, yetişkin | Hemorajik sepsisemi       |
| <i>V. anguillarum</i> serotip 3       | Levrek         | Yavru           | Septisemi                 |
| <i>V. ordalii</i>                     | Levrek         | Yavru, yetişkin | Septisemi                 |
| <i>V. damsela</i>                     | Levrek, çipura | Yavru           | Enteritis                 |
| <i>V. alginolyticus</i>               | Levrek, çipura | Yavru, yetişkin | Deri lezyonları           |
| <i>V. harveyi</i>                     | Levrek, çipura | Yavru, yetişkin | Ülseratif lezyonlar       |
| <i>Pasteurella piscicida</i>          | Levrek         | Yavru, yetişkin | Dalakta nodüller          |
| <i>Pasteurella piscicida</i>          | Çipura         | Larva, yavru    | Dalakta nodüller          |
| <i>Pseudomonas anguilliseptica</i>    | Çipura         | Yetişkin        | Hemorajik sepsisemi       |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>           | Çipura         | Yetişkin        | -                         |
| Cytophaga-like bacteria               | Levrek, çipura | Yetişkin, yavru | Deri, ağız lezyonları     |
| <i>Flexibacter maritimus</i>          | Levrek         | Yetişkin, yavru | Deri, solungaç lezyonları |

Balıklardaki patojen vibriolara yönelik ilk taksonomik araştırmalar Nybelin tarafından 1935 yılında yapılmıştır. Patojen vibriolar *V. anguillarum forma typica* (Tip A) ve *V. anguillarum forma anguillcida* (Tip B) olarak iki biyotipe ayrılmış daha sonra Smith tarafından 1961 yılında *V. anguillarum forma ophtalmica* (Tip C) tanımlanmıştır (6). Larsen ve Jensen (14) vibrioların 3 biyokimyasal özelliğini dikkate alarak Tip D ve E 'yi tanımlayıp, Tip A, B ve C 'nin varlıklarını doğrulamıştır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. *Vibrio anguillarum* 'un biyotiplendirilmesi (14)

| Biyotip | Mannitol | Sakkaroz | İndol |
|---------|----------|----------|-------|
| A       | +        | +        | +     |
| B       | –        | –        | –     |
| C       | +        | +        | –     |
| D       | –        | +        | +     |
| E       | –        | –        | +     |

*Vibrio ordalii*, önceleri *V. anguillarum* biyotip II olarak kabul edilmesine rağmen, 1981 yılında ABD ve Japonya 'da bir çok balık türünde görülen enfeksiyonlardan izole edilmesi sonucunda ayrı bir balık vibriosis etkeni olarak kabul edilmiştir (15). *V. ordalii* ile *V. anguillarum* 'un serolojik olarak çapraz reaksiyon verdikleri belirtilmiştir (16).

MacDonnel ve Colwell (17) tarafından yapılan ribozomal RNA analizi sonucunda *V. anguillarum*, *V. damsela* ve *V. ordalii* 'nin filogenetik açıdan diğer türlerden farklı olduğu ve bunların *Listonella* genusunda yer alması gerektiği bildirilmiştir. Ancak dünya literatüründeki eğilim *Vibrio* adının kullanılmasıdır (6).

Wells ve ZoBell tarafından 1934 'de *Fundulus parvipinnis* balıklarından izole edilen *Achromobacter ichthyodermis* 'in ve Hoshina tarafından 1956 'da gökkuşağı alabalıklarının Japon türlerinden izole edilen ve *V. piscium* var. *japonicus* olarak adlandırılan izolatların gerçekte *V. anguillarum* Tip C olduğu, Hodgkiss ve Shewann tarafından 1970 'de *Pseudomonas ichthyodermis* olarak ifade edilen izolatların ise *V. anguillarum* Tip A olduğu bildirilmiştir (14).

Hastein ve Smith (18) 163 izolata uyguladığı 28 test sonucunda *V. anguillarum* 'u arabinozu fermente edenler ve etmeyenler olarak 2 ana gruba ayırmışlardır. Daha sonra spesifik antiserumlar kullanılarak yapılan makroskopik lam aglutinasyon testiyle *V. anguillarum* identifiye edilmiştir (19).

*Vibrio alginolyticus* ilk defa İsrail'de çipura yetiştiriciliği yapılan işletmelerde saptanmıştır. Aynı etkenden kaynaklanan vibriosis, kefal ve yılan balıklarında da görülmüştür. Koch postülatını sağlamak için  $10^9$  adet bakterinin intraperitoneal inokülasyonu ile yapılan enfeksiyondan sonuç alınamamıştır. Bu nedenden dolayı oportunistik patojen olarak yorumlanmıştır (20).

### 2.1.1. Vibriosisin epizootiyolojisi ve patojenitesi

Vibriosis enfeksiyonunun balıkta nasıl başladığı tam olarak aydınlatılmamışsa da, etkenin konakçıda kolonize olduktan sonra penetre olduğu, balığın gastro-intestinal sistemin posterior kısmına ve rektuma kolonizasyonu sonunda vibriosisin başladığı (21), kolonizasyonun barsakların tüm bölümlerinde olduğu ve barsak dokusuna yerleşmenin en çok 100 dakikada tamamlandığı (22), ölmek üzere olan balıklardan izole edilen 16 farklı serotipteki *V. anguillarum* 'un hepsinin balıklar için patojen olmadığı (23) belirtilmiştir.

*V. anguillarum* deniz ortamının normal mikrobiyel florasında bulunur (24). Bakteri sayısı deniz suyu sıcaklığının artmasıyla yazın artar, kışın ise azalır. Bu patojenin deniz suyunda 50 aydan daha uzun süre canlı kaldığı tespit edilmiştir. Deniz balıklarının barsaklarının normal florasında da bulunur (6).

Çipura ve levrek larvalarının barsak mikroflorası, yemleme rejimine bağlı olarak değişiklik gösterir. Larvalar rotiferlerle yemlendiği zaman *V. anguillarum*, *V. tubiashii* ancak, artemia ile yemlendiği zaman *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. harveyi* ve *V. natriegens* izole edilmiştir. Larval gelişim sırasında barsakta herhangi bir bakteri türünün dominant kolonizasyonu saptanmamış olup, larval yaşama siklusunun sonunda rotiferlerle beslenen larvaların barsağında *V. anguillarum* dominant hale gelmiş ve hastalık oluşturmuştur (25).

Balık hastalıklarının çıkışında çevre, patojen ve konakçı önemli rol oynamaktadır. Balık patojeni olan vibrio türlerinin adhezyon yetenekleri ve enfeksiyon meydana getirme oranı, iki önemli çevresel faktör olan sıcaklık ve tuzluluğa bağlı olarak

gelişmektedir (26, 27). Tüm vibrio türleri için minimal adhezyon değerleri en düşük 4 °C sıcaklık ve % 0.10 tuzlulukta, optimum 25 °C 'lik sıcaklıkta gerçekleşir (28). Balığın derisindeki mukusun patojenik vibriolar için inhibitör etkisi vardır (29). *V. anguillarum* 'un 25 °C 'de sarıkuyruk, çipura ve sazan balıkları için virü lent iken, 15 °C'de sarıkuyruk dışındaki balıklarda virü lent olmadığı belirtilmiştir (30).

Vibriosis deniz balıklarında yaz mevsiminde su sıcaklığının 10 °C 'yi geçtiği, sudaki oksijen seviyesinin düştüğü durumlarda veya balıkların aşırı yoğunlukta yetiştirilmesi ve kötü hijyen şartlarında ortaya çıkar. Bununla birlikte hastalığın 1-4 °C sıcaklıktaki sularda yetiştirilen balıklarda da ortaya çıktığı belirtilmiştir (31). Etken deri, solungaçlar ve anüs yoluyla vücuda girdiğinde de hastalık oluşturur (32).

*Vibrio* türlerinin patojenitesi ekzotoksin ve endotoksinlerle ilgilidir (6). Umbreit ve Ordal tarafından 1972 'de yapılan bir çalışmada filtre ile sterilize edilmiş 24 saatlik kültür filtratlarının havuz balığına enjeksiyonunu takiben % 70 'in üzerinde ölüm görülmüştür. Chinook salmon balıklarına endotoksin enjekte edildiğinde enjeksiyon bölgesinde lezyonlar saptanmıştır (6).

Chart tarafından 1983 yılında yılan balıkları için virü lent olan 6 *V. anguillarum* türüyle yapılan ultrastrüktürel incelemeler sonucunda flagella sayısı ile patojenite arasında bir ilişki bulunduğu belirlenmiştir (6).

Iwata ve ark. (33) *Vibrio alginolyticus* 'un virülensi üzerine kırmızı çipurada yaptıkları çalışmada *Vibrio alginolyticus* ile rotiferlerin varlığında mortalitenin arttığı, *Vibrio alginolyticus* ile *Chlorella* 'nın varlığında *Vibrio alginolyticus* 'un tek başına bulunduğu ortama göre daha az mortalite görüldüğünü, bu üç organizmanın hepsinin varlığında ise chlorellanın rotifer tarafından tüketildiği ve *Vibrio alginolyticus* 'un sayısında artış olduğunu göstermişlerdir.

*V. alginolyticus*, deniz balığı yetiştirilen tanklardaki sulardan izole edilmiş, bu nedenle enfeksiyonun ortaya çıkmasında kontamine suyun da büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (34).

### 2.1.2. Vibriosisin klinik belirtileri ve otopsi bulguları

Colorni ve ark. (20) çipuralarda hastalığın tarifini tipik bakteriyel sepsisemi olarak yapmıştır. Enfekte balıkların hareketinde durgunlukla beraber sürüden ayrı dolaşmaları dikkati çeker. Dış bakıda, vücut renginde koyulaşma, pullar arasında ve özellikle ventralde dermal hemoraji gözlemlenir. Pullar dökülür ve yüzgeçlerde yıpranma başlar. Deri lezyonları kısa sürede ülserleşerek kas tabakasının ortaya çıkmasına neden olur. Solungaçlar anemik bir yapı kazanır (35).

Otopside, vücudun iç yüzeyinde peteşi, intestinal kanal, karaciğer, yüzme kesesi ve peritonda konjesyon saptanır, hasta balıklarda anemi, safra kesesinde büyüme, barsakta şişlik ve açık renkli bir sıvı birikimi ile solungaç nekrozları şekillenir (20). *V. anguillarum* 'un neden olduğu hastalık vakalarında deride, yüzgeçlerde ve iç organlarda hemoraji, dalak, böbrek ve karaciğerde hipertrofi saptanmıştır (6).

Enfeksiyonun kronik forma dönüşmesi durumunda deri lezyonları granülomatöz bir yapıya dönüşmüştür. Viseral boşlukta sıvı toplanmıştır. Bu durumdaki balıkların gözlerinin de etkilendiği belirtilmiştir. Korneanın opaklaşmasının ilk belirti olduğu ve hastalığın ileriki dönemlerinde korneal ülser sonucu gözün tamamıyla kaybolduğu bildirilmiştir (35).

### 2.1.3. Vibrioların izolasyonu ve etken özellikleri

Evelyn (36) vibrioları; Gram negatif, sporsuz, hareketli, sitokrom oksidaz pozitif, novobiocin ve vibrostatik ajan O/129'a duyarlı, optimum üreme için % 1-3 tuza ve 20-30 °C'lik inkübasyon sıcaklığına ihtiyaç gösteren bakteriler olarak tanımlamıştır.

*V. anguillarum* 'un enfekte dokulardan % 0.5-3.5 NaCl ilave edilmiş Tryptic Soy Agar (TSA), Nutrient Agar, Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ve Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar besiyerlerine ekilmesiyle 15-25 °C 'de 7 gün içinde koloni verdiği bildirilmiştir (6).

*V. anguillarum* katı besiyerinde üretildiğinde krem renginde, parlak, kenarları düzgün S tipi koloniler verir. Gram negatif, hareketli, katalaz, oksidaz, jelatin,  $\beta$ -galaktosidaz ve arjinin dihidrolaz (ADH) testleri pozitif, H<sub>2</sub>S, lizin dekarboksilaz (LDC), ornitin dekarboksilaz (ODC), üreaz, metil red testleri ise negatiftir. O/129'a duyarlı, arabinoz, maltoz, mannit ve sakkarozdan asit meydana getirir (6, 37). % 0.5-3 tuzlu ortamda üreyemezken % 7 tuz içeren ortamda ürer (38). Hasta yılan balıklarından elde edilen izolatların laktoz pozitif *V. vulnificus* olduğu, bu bakterinin indol, mannitol, sorbitol, ODC, ADH, Voges-Proskauer (VP) malonat, arabinoz testlerinin ve 42 °C 'de üreme yeteneklerinin negatif olmasıyla *V. anguillarum* 'dan ayrıldığı bildirilmiştir (39). Çipuralardan *V. alginolyticus* 'un izolasyonunun % 2 tuz ilave edilmiş TSA'da yapıldığı ve bu besiyerinde yayılıcı tarzda koloniler şekillendiğini belirtilmiştir (20). Etkenin kanı hemolize ettiği, tuzsuz ve % 10 tuz ilave edilmiş ortamda üreyemediği, oksidaz, H<sub>2</sub>S, indol, ODC, LDC testlerinin pozitif, ADH testinin negatif olduğu bildirilmiştir.

Japonya 'da ayu balıklarından elde edilen 52 adet *V. anguillarum* izolatının 27 tanesinin vibriostatik ajan O/129 'a duyarlı olmadığı belirtilmiştir (40). Lee ve ark. (41) *Aeromonas* spp. ve *V. anguillarum* arasında ara karakter gösteren bir bakteriyi izole etmişlerdir. *Aeromonas* grubu bakterilerin de vibriostatik ajan O/129'a duyarlı olmasının identifikasyonu güçleştirdiğini ancak *V. anguillarum* 'da O/129 için minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MIC) 1-5 µg/mL olduğunu belirtmişlerdir.

*Vibrio alginolyticus* 'un TSA besiyerinde de yayılıcı (swarming) tarzda koloniler vermesi ile diğer vibriolardan kolayca ayrılabilirdi ancak, bu tarz kolonilerin bakterilerin sahip olduğu peritrik flagella ile ilgili olduğu ve bunun bakterinin üretildiği kültür şartları ile de ilgisinin bulunduğu bildirilmiştir (6, 37).

Vibrioların özellikleri Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Çipura ve levrek balıklarında patojen vibrioların fenotipik karakterleri (6)

| Testler               | <i>V. alginolyticus</i> | <i>V. anguillarum</i> | <i>V. damsela</i> | <i>V. ordalii</i> | Testler               | <i>V. alginolyticus</i> | <i>V. anguillarum</i> | <i>V. damsela</i> | <i>V. ordalii</i> |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Hareket               | +                       | +                     | +                 | +                 | Nitrat redüksiyonu    | +                       | +                     | +                 | V                 |
| Yaygın koloni         | +                       | -                     | -                 | -                 | VP                    | +                       | +                     | +                 | -                 |
| Ferm. metabolizma     | +                       | +                     | +                 | +                 | O/129 duyarlılık      | +                       | +                     | +                 | +                 |
| Katalaz               | +                       | +                     | +                 | +                 | 37 °C'de üreme        | +                       | +                     | ?                 | -                 |
| Oksidaz               | +                       | +                     | +                 | +                 | % 0 NaCl'de üreme     | -                       | -                     | -                 | -                 |
| ADH                   | -                       | +                     | +                 | -                 | % 7 NaCl'de üreme     | -                       | -                     | -                 | -                 |
| β-galaktosidaz        | -                       | +                     | -                 | -                 | Sitrat kullanımı      | ?                       | +                     | -                 | -                 |
| H <sub>2</sub> S      | +                       | -                     | -                 | -                 | Malonat kullanımı     | ?                       | +                     | -                 | ?                 |
| İndol                 | +                       | +                     | -                 | -                 | Şekerden asit üretimi |                         |                       |                   |                   |
| LDC                   | +                       | -                     | -                 | -                 | Arabinoz              | -                       | +                     | -                 | -                 |
| ODC                   | +                       | -                     | -                 | -                 | İnositol              | -                       | -                     | -                 | -                 |
| Fenil alanin deaminaz | ?                       | -                     | -                 | -                 | Laktoz                | -                       | -                     | -                 | -                 |
| Eskulin hidrolizi     | -                       | -                     | ?                 | -                 | Maltoz                | +                       | +                     | +                 | +                 |
| Kitin hidrolizi       | +                       | +                     | +                 | V                 | Mannitol              | +                       | +                     | -                 | +                 |
| Jelatin erime         | +                       | +                     | -                 | +                 | Mannoz                | +                       | ?                     | +                 | ?                 |
| Lipit hidrolizi       | +                       | +                     | -                 | -                 | Salisin               | +                       | -                     | -                 | -                 |
| Nişasta hidrolizi     | +                       | +                     | +                 | -                 | Sakkaroz              | +                       | +                     | +                 | +                 |
| Üreaz                 | +                       | -                     | +                 | -                 | DNA'da G+C (% mol)    | 45-47                   | 46.3                  | 43.0              | 43-44             |
| Metil red             | +                       | -                     | +                 | -                 |                       |                         |                       |                   |                   |

(+): pozitif, (-): negatif, (V): değişken, (?): bilinmiyor

#### 2.1.4. Vibriosisin kontrolü

Balıklarda sağaltım amacıyla kullanılan antimikrobiyel maddeler, kemoterapötikler ve dezenfektanlar olarak gruplandırılabilir. Balıklarda kemoterapi uygulaması oral, banyo ve enjeksiyon yöntemiyle yapılır. Bu metotlar içinde en uygun olanı oral yoldur. Banyo yoluyla emilen kemoterapötikler kanda etkili yoğunluğa ulaşmamaktadır. Oral yolla verildiğinde ise iştahsız balıkların tedavi şansı azalmaktadır. Bu nedenle balıkta hastalık başlar başlamaz yüksek dozda ve semptomlar kaybolduktan 3-5 gün sonrasına kadar tedavi gereklidir (42).

Vibriosisin tedavisinde sulfamerazin 200 mg/kg canlı balık ağırlığı dozunda, oxytetracylin 50-75 mg/kg canlı balık ağırlığı dozunda 10 gün süreyle kullanılmıştır. Trimethoprim 'in 30 mg/kg, piromidic asidin 10-40 mg/kg, furanace 'ın 25 mg/L konsantrasyonlarda kullanılabileceği belirtilmiştir (43).

Aoki ve ark. (44) 132 *V. anguillarum* izolatıyla yaptığı çalışmada, bu izolatların O/129 ve trimethoprim 'e dirençli oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlar R plazmitlerinin türler arasında taşınmış olabileceği şüphesini doğurmuş fakat, kesin bir sonuca

ulaşılamamıştır. Hastalık etmenlerinin antibiyotiklere direnç kazanabildiği Austin ve Austin (13) ile Jun ve ark. (45) tarafından da belirtilmiştir.

Potasyum dikromatın banyo yöntemiyle 1/10.000 doz ve 1 saat süre ile uygulanmasında bakteriyel ve bazı paraziter enfeksiyonların elimine edildiği, böylece yaraların kapanmasını hızlandırdığı için yararlı olacağı bildirilmiştir (46).

Çipura ve levrek yetiştiriciliği yapılan işletmelerde formalin, malahit yeşili kombinasyonu veya bakır sülfat banyoları yaygın olarak kullanılmaktadır. Formalin iritan bir maddedir ve solungaçlarında tahribat bulunan balıklar için kontrendikedir. Malahit yeşili ise bakterilere etkisizdir, ayrıca balıkta birikim yapması nedeniyle her iki maddenin antibakteriyel olarak kullanımı uygun değildir (47). Bakır sülfat ise alabalık ve yılan balıklarında vibriosisin patlak vermesine neden olmaktadır (48).

Balıkların kendilerine özgü bağışıklık sistemleri vardır. Su koşullarının uygun olduğu ortamlarda balık, doğal çevrede bulunan patojen mikroorganizmaları kendi bağışıklık sistemiyle yok edebilir. Ancak hastalığın fazla ilerlediği veya su koşullarının uygun olmadığı durumlarda balığa çeşitli yollarla müdahale gerekir. Bu da kimyasal ilaçlarla birlikte su koşullarının öncelikle düzeltilmesi ile sağlanabilir. Ayrıca balığın hastalıklara karşı direnci, enjeksiyon, banyo veya yemle birlikte verilen aşılar ile de artırılabilir.

Ticari aşılarda uygulanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta aşı suşunun universal olmasıdır. Bu nedenle yurtdışında balığı vibriosis'e karşı immünize etmede kullanılan bir aşı, başka bir ülkedeki hastalık etkeni olan *Vibrio* türünün antijenik yapıları farklı olabileceği için başarılı olmayabilir. Sonuç olarak, yurtdışında kullanılan inaktif aşılarda test edilmeden kullanılması sakıncalı olabilir (5).

Aşılama yöntemleriyle de vibriosis enfeksiyonlarının kontrol edildiği bildirilmiştir. Vibriosis'e karşı *V. anguillarum* ve *V. ordalii* ile monovalan ve bivalan aşılar başarıyla kullanılmıştır (13).

Balıklarda aşılar banyo, enjeksiyon, sprey, oral veya anal yolla uygulanmaktadır. Bu metotlar içerisinde oral yolla uygulama en pratik ve stressiz metottur. Bununla beraber, meydana gelen spesifik koruyuculuk kısa sürelidir. Enjeksiyon ile aşılama en etkin korumayı sağlasa da uygulaması zor ve masraflı olup, balıkta strese neden olmaktadır. Günümüzde balıklarda uygulanan ticari aşılarda büyük çoğunluğu banyo yoluyla yapılmaktadır (49).

Oral aşının uzun süre yedirilmesinin bağışıklık süresine etkisini incelemek için yapılan denemelerde, 2 mg/kg yem dozunda kurutulmuş aşının 15 gün süreyle 3.9 °C'deki suda beslenen balıklara verilerek elde edilen bağışıklığın, aşılama süresinin artırılmasıyla artmadığı ifade edilmiştir (50).

Horne ve ark. (51) *V. anguillarum* 'a karşı yapmış olduğu aşılama kontrol grubunda % 0, oral olarak aşı grubunda % 6, immersiyon metodu ile aşılanmış grupta % 47, enjeksiyonla aşılanan grupta % 93 yaşama oranı belirlemiştir.

Hastalığı tedavi ederken kemoterapötiklerle birlikte balığın direncini artırmak için vitamin komplekslerinin verilmesi gerekmektedir. Alabalıklara gelişme için gerekli

vitamin C miktarının 5 - 10 misli rasyona katılarak *V. anguillarum* ile yapılan enfeksiyon denemesinde, C vitamininin 28 gün boyunca alabalıkları vibriosisden koruduğu, humoral immüneyi artırdığı belirlenmiştir (52).

Pridoksinin de (vitamin B6) immün sistem üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (5). Benzer şekilde Vitamin C, B6, E, A ve diğer mikro besin maddelerinin balıklarda spesifik olmayan savunma mekanizmaları üzerine etki ederek hastalıklardan korunmada rol oynadığı kabul edilmiştir (53).

Heterotrofik olarak gelişen tek hücreli alg *Tetraselmis suecica* 'nın püskürtme yöntemi ile kurutulmuş preparatlarının antimikrobiyal aktivite gösterdiği, yem katkısı olarak kullanıldığında immünostimülant etkisi olduğu gözlenmiştir (13).

Esansiyel yağ asitleri (EFA) noksanlığında yüzgeçlerde erozyonlar meydana gelmiştir. EFA noksanlığında *Flexibacter* spp. enfeksiyonları görülmüş, diyetlerine EFA katılanlarda ise enfeksiyon belirtileri gözlenmemiştir (42).

## 2.2. Pasteurellosis

Pasteurellosis, ilk defa 1963 yılında Amerika Bileşik Devletleri'ndeki Chesapeake Körfezi'nin doğu kıyılarında beyaz (*Roccus americanus*) ve çizgili (*R. saxatilis*) levrek balıklarında yoğun ölümlere neden olmuştur. Beyaz levreğin kan ve iç organlarından hazırlanan preparatlarda bipolar boyanan, Gram negatif bakteriler gözlemlenmiş olup bu bakteriler *Pasteurella* cinsine dahil edilmişlerdir. Levrek balıklarından izole edilen bu bakteriler 1968 yılında morfolojik, fizyolojik ve serolojik olarak incelenerek *Pasteurella piscicida* olarak isimlendirilmiştir (13).

Hastalık 1969 yılında Japonya 'nın güneybatı bölgesinde kültürü yapılan genç sarıkuyruk balıklarında ağır bir mortaliteyle seyretmiştir (54). Sarıkuyruk balıklarının haricinde siyah çipura ve kırmızı çipura balıklarında da ölümlere yol açmıştır. Pasteurellosis 'e yakalanmış sarıkuyruk balıklarının iç organlarında çok sayıda tüberkül benzeri oluşumların görülmesi, Japonya 'da hastalığın *Pseudotuberculosis* olarak adlandırılmasına neden olmuştur (55).

Kuzeybatı İspanya'da yetiştiriciliği yapılan çipura balığının fingerlinglerinde epizootiklerin oluştuğu, (9). 1990 yılında Güneybatı İspanya'da yavru levrek balıklarında (56), Portekiz'de fingerling boydaki çipura balıklarında hastalığın görüldüğü bildirilmiştir (57). Yunanistan'da çipura, levrek ve kefal balıklarında her yıl mayıstan ekime kadar epizootik görülmektedir. Fransa ve İtalya'daki çipura ve levrek balıklarında da yoğun ölümlere neden olmaktadır (58).

Pasteurellosis 'in deniz balıkları dışında İsrail 'de tatlı suda yetiştiriciliği yapılan tilapia hibritlerinde de görüldüğü bildirilmiş olmakla beraber, etkenin *Pasteurella piscicida* değil *Pasteurella multocida* olduğu anlaşılmıştır (59).

Pasteurellosis, Türkiye 'de ilk defa 1993 yılında, yetiştiriciliği yapılan çipura balıklarında teşhis edilmiştir (60). Bu tarihten itibaren İzmir Körfezi de dahil olmak üzere Güney Ege kıyılarındaki bir çok balık çiftliğinde pasteurellosis nedeniyle önemli ekonomik kayıplar olmuştur. 1994 yılında Eceabat 'ta havuzda kültürü yapılan levrek

balıklarında da etkenin izole edildiği bildirilmiştir (61). Bununla beraber, daha sonraki çalışmalarda *Pasteurellosis* 'e rastlanmamıştır.

### 2.2.1. Pasteurellosis 'in epizootiyolojisi ve patojenitesi

Her yıl su sıcaklığı 25 °C 'nin üzerine çıktığında ya da bol ve uzun süreli yağmurlar nedeni ile tuz oranı düştüğünde Japonya'daki balık çiftliklerinde *P. piscicida* enfeksiyonları görülmekte, su sıcaklığının 25 °C 'nin altında kaldığı durumlarda ise yoğun ölümler olmamaktadır (55). *Pasteurellosis* hem doğa balıklarında hem de yoğun yetiştiriciliğin yapıldığı balık çiftliklerinde ortaya çıkmıştır. Özellikle yaz aylarında balık çiftliklerinde % 40-50 oranında ağır balık kayıplarına neden olmuştur (13).

*P. piscicida* enfeksiyonları yaz aylarında deniz suyu sıcaklığının 25 °C 'ye çıktığı dönemlerde oluşur (62). Ancak suyun fizikokimyasal yapısı ile tanklardaki balık yoğunluğu ve mortalite arasında belirgin korelasyon saptanamamıştır (9).

Kuzeybatı İspanya'daki bir işletmede yetiştirilen yavru çipura balıklarında görülen epizootik sırasında su sıcaklığının 17.8-21 °C arasında, tuzluluğun % 0.32-34.5 arasında olduğu, suda çözünmüş oksijen miktarının doymuşluk düzeyinde bulunduğu ve buna rağmen ölümlerin görüldüğü bildirilmiştir. Güneybatı İspanya 'da pasteurellosis görülen bir işletmede su sıcaklığı 18-20 °C arasında, tuzluluk değeri 35 ppt ve oksijen değeri 6 ppm olarak saptanmıştır (56).

1995 yılında Malta 'daki açık deniz kafeslerinde (offshore) yetiştirilen çipura balıklarında epizootikler görülmüştür. 800 m<sup>3</sup> 'lük kafeslerde ortalama 10 g 'lık çipura balıkları 5 kg/m<sup>3</sup> oranında stoklanmıştır. Epizootikler 19-20 °C su sıcaklığında % 0.38 tuzluluk ve optimum oksijen konsantrasyonunda meydana gelmiştir (58).

*P. piscicida* tatlı sularda 20 °C'de 48 saatten, estuarin sularda (% 0.12) 4-5 günden fazla yaşayamamaktadır (13). Bu bakteriler balık dışında canlı kalmadığı için portör balıklar enfeksiyon kaynağı olabilir. Bulaşma balıktan balığa deri yoluyla gerçekleşmektedir (55).

*P. piscicida* 'da fosfolipaz ve hemolizinler (63) siderophor (64) ve kapsüler polisakkaritlerin (6) virülens faktörü oldukları bildirilmiştir.

### 2.2.2. Klinik belirtiler ve otopsi bulguları

Kronik pasteurellosis olgularında; iç organlarda, içerisi bakteri ile dolu, etrafı makrofajlarla ve dışta fibröz bir dokuyla çevrili tüberkül benzeri lezyonlar saptanmış, terapötik maddelerin fibröz dokudan geçip bakterilere ulaşamadığı belirlenmiştir. Bu durum sağaltımda başarıyı düşürmüş ve enfeksiyonun artmasına neden olmuştur. Bu nedenle hastalık kronikleşmeden sağaltıma başlanması gerektiği bildirilmiştir (65).

Balıklarda intramuskuler enjeksiyon, oral ve immersiyon yöntemiyle deneysel enfeksiyon oluşturulan bir çalışmada intramuskuler enjeksiyonda patojen önce böbrek ve dalağa yerleşmiş daha sonra solungaçlara, kalp, barsak ve pilorik sekaya

yayılmıştır. Oral aşılama önce midede, immersiye yönteminde ise solungaçlarda etken saptanmıştır *P. piscicida* 'nın balık dokularında makrofajlar içinde bulunduğu belirlenmiştir (13).

Pasteurellosis, septisemi ile seyreden bir hastalıktır (13). Hastalığın patolojik bulguları akut veya kronik formuna göre değişiklik göstermektedir. Akut vakalarda eksternal olarak sadece vücut renginin koyulaştığı, internal olarak böbrek ve dalakta hastalığa "pseudotuberculosis" adının verilmesine neden olan granülomatoz lezyonlar gelişebileceğı, hafifçe şişkin ve solgun görülen karaciğer ile böbrek ve dalağın her tarafına dağılmış olarak 0.5-0.1 mm çapında, sınırları belirgin grimsi beyaz bölgeler görüldüğü bildirilmiştir (66). Enfekte balıkların abdominal boşluğunda purulent madde birikimi olabileceğı belirtilmiştir (6). Pasteurellosis akut ve kronik formlarda görülebilir ve akut epizootikler kısa sürede ağır kayıplara neden olur (55).

Pasteurellosis 'e yakalanmış çipura balıklarında ölümlerden başka belirgin klinik bulgular saptanmamış olup, balıkların bazılarında anormal deri pigmentasyonu, kafa ve solungaçlarda hafif hemorajik alanların bulunduğu, iç organların nekropsisinde dalağın büyüdüğü ve kronik dönemde beyazımtırak tüberkül benzeri oluşumların geliştiğı belirtilmiştir (9). Hastalığın hiperakut formunda internal lezyonlar ile septiseminin oluştuğı bildirilmiştir (56). Hastalığın subakut ve kronik formunda, internal olarak ölmek üzere olan balıkların dalağında beyazımsı nodüller saptanmıştır (67).

Güneybatı İspanya 'da hasta levrek balıklarında karında şişkinlik dışında anormal bir eksternal bulguya rastlanmamış, internal olarak karaciğer ve böbrek renginde solgunluk gözlenmiş fakat dalakta tipik tüberküllere rastlanmamıştır (56). Portekiz'deki hasta fingerling çipura balıklarında eksternal olarak sadece başta hemorajik bölgeler, internal olarak soluk karaciğer ve dalakta beyaz nodüller görülmüştür (57).

Kuzey Ege kıyılarında saptanan pasteurellosis olgusunda hasta balıklarda bariz bir patolojik belirti görülmediğı, internal olarak bazı balıklarda beyaz tüberküllü büyümüş bir dalağa rastlandığı belirtilmiştir (68).

Deneyisel olarak çipura ve alabalıklarda oluşturulan *Pasteurella* spp. enfeksiyonlarında ölmek üzere olan balıklarda hiç bir klinik belirti saptanmamış ancak, iç organlardan saf kültürler izole edilmiştir. Laboratuvar koşullarında *P. piscicida* 'nın alabalıklar için çipuralardan daha fazla patojenik olduğu bildirilmiştir. Bu balık türleri için LD<sub>50</sub> değerinin 10<sup>3</sup> ile 10<sup>6</sup> hücre arasında değiştii ifade edilmiştir (62).

### **2.2.3. *Pasteurella piscicida* 'nın izolasyonu ve etken özellikleri**

Bakteri, Nutrient Agar 'da 25 °C sıcaklıkta inkübe edildikten 48-72 saat sonra yaklaşık 1-2 mm çapında parlak, şeffaf, gri-sarı renkte, kenarları düzgün, konveks koloniler oluşturur (13). MacConkey agar ve TCBS agarda üreme testleri ile koyun kanını hemoliz testleri negatiftir (69). *P. piscicida* 17-31 °C arasındaki sıcaklıklarda, optimum % 1.5 NaCl içeren kültür ortamında üretilmiştir (70).

*P. piscicida* karakteristik olarak bipolar boyanma özelliği gösterir. Gram negatif, hareketsiz, kapsülsüz, fermentatif ve sporsuzdur. O/129 vibriostatik ajana karşı duyarlı, fruktoz, galaktoz, glikoz ve mannoz haricindeki şekerlerden asit üretimi negatiftir. Oksidaz, katalaz, metil red, tween 80'in parçalanması pozitifdir. LDH testi negatif, ADH testi değişkendir. Kısa çomaklar şeklinde olmakla birlikte, % 1-2.5 NaCl içeren BHIA ve kanlı agarda koktan uzun çubuklara kadar değişen şekillerde pleomorfizm gösterir (13). De Kinkelin ve ark. (71) *P. piscicida*' da LDH testinin negatif olduğunu, ADH testinin ise bazı suşlarda pozitif olabileceğini bildirmişlerdir.

Balıklardan izole edilen *Pasteurella piscicida* 'ların karşılaştırılması Çizelge 2.4.'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Çipura ve levrek balıklarındaki *P. piscicida* 'nın fenotipik karakterleri

| Biyokimyasal ve Morfolojik Testler | K a y n a k l a r |     |     |     |     |     |
|------------------------------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                    | (A)               | (B) | (C) | (D) | (E) | (F) |
| Basil                              | +                 | +   | +   | +   | +   | +   |
| Gram                               | –                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| Hareket                            | –                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| Bipolar boyanma                    | +                 | +   | +   | +   | +   | +   |
| Oksidaz                            | +                 | +   | +   | +   | +   | +   |
| Katalaz                            | +                 | +   | +   | +   | +   | ?   |
| O/129'a duyarlılık                 | +                 | +   | +   | +   | ?   | ?   |
| H <sub>2</sub> S                   | –                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| O/F metabolizma                    | ?                 | F   | ?   | F   | F   | –/+ |
| Metil red                          | +                 | +   | +   | +   | d   | ?   |
| VP                                 | ?                 | –   | +   | +   | d   | –   |
| İndol                              | –                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| Nitrat redüksiyonu                 | –                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| Ürenin parçalanması                | –                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| Malonat kullanımı                  | –                 | ?   | ?   | ?   | –   | ?   |
| Jelatin hidrolizasyonu             | ?                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| Kazein hidrolizi                   | ?                 | ?   | –   | –   | –   | –   |
| Nişasta                            | ?                 | ?   | –   | –   | –   | ?   |
| ADH                                | ?                 | +   | –   | ?   | d   | +   |
| ODC                                | ?                 | –   | –   | +   | d   | +   |
| LDC                                | ?                 | –   | –   | –   | –   | –   |
| β-galaktozidaz                     | ?                 | –   | –   | –   | ?   | –   |
| Triptofan deaminaz                 | ?                 | –   | ?   | –   | ?   | –   |
| Glikoz                             | ?                 | +   | +   | –   | +   | –   |
| Arabinoz                           | ?                 | –   | –   | +   | –   | –   |
| Laktoz                             | ?                 | –   | –   | ?   | –   | ?   |
| Sakkaroz                           | ?                 | –   | –   | –   | d   | –   |
| İnositol                           | ?                 | –   | –   | –   | ?   | –   |
| Sorbitol                           | ?                 | –   | –   | –   | ?   | –   |
| Mannitol                           | ?                 | –   | –   | –   | ?   | –   |
| Sakkaroz                           | ?                 | ?   | –   | ?   | ?   | –   |
| Maltoz                             | ?                 | +   | –   | –   | d   | ?   |

Kaynaklar ; (A): (69) ; (B): (67) ; (C): (13) ; (D): (9) ; (E): (55) ; (F): (58). ? : Bilgi yok d: ABD izolatlarından farklı

#### 2.2.4. Pasteurellosis 'in kontrolü

Antibiyotikler ve kemoterapötik maddelerin pasteurellosis hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Son yıllarda deniz balığı çiftliklerinde kullanılan kemoterapötiklere karşı *P. piscicida* 'nın direnç kazandığı şüphesi doğmuş, kültürü yapılan balıklarda kullanılan ilaçların bazen etkili olmadığı bildirilmiştir. Aoki ve Kitao (72) ilaca dayanıklı *P. piscicida* suşlarının bulunduğunu, bu nedenle deniz balıklarında pasteurellosis 'in tedavisinin gelecekte daha güç olacağını bildirmişlerdir. Bu nedenle hastalık etkeninin, antibiyotiklere duyarlılık testinin yapılarak en etkili ilacın tedavi amacıyla kullanılması tavsiye edilmektedir (73).

Balebona ve ark. (66) Kuzeybatı İspanya'da saptadıkları *P. piscicida* izolatını kanamisin ve eritromisine dirençli bulduklarını, hasta balıklara 40 mg/kg oksitetrasiklin uygulamasıyla mortalitede düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Çolak (83) levrek balıklarından elde ettikleri izolatın chloramphenicol dışında sulfamerazin, oksitetrasiklin ve furazolidona hassas olduğunu saptamıştır.

Yunanistan 'daki *Pasteurella piscicida* izolatları için sulfametaoksazol / trimetoprim'e karşı farklı değerler elde edilmiş, bunların kanamisin, eritromisin ve streptomisine dirençli oldukları, bazı suşlarının oksolinik asit, oksitetrasiklin, doksisisiklin-HCl, chloramphenicol, nitrofurantoin ve furazolidona hassasken, penisilin ve sefolaridine de direnç gösterdikleri bildirilmiştir (58).

Bir alg türü olan *Ulva pertusa* 'dan % 5 ilave edilmiş diyetlerle yemlenen çipura balıklarında *P. piscicida* 'ya karşı granülositlerin fagositik aktiviteleri artış göstermiştir. Ayrıca *P. piscicida* ve *E. coli* 'ye karşı bakterisidal ve hemolitik aktiviteleri gibi complement aktiviteleri de artış göstermiştir (74).

*P. piscicida* enfeksiyonuna karşı sarıkuyruk balıklarında aşılama çalışmaları yapılmış, özellikle lipopolisakkarit ile hazırlanmış aşılarından başarılı sonuçlar elde edilmiş ancak, ticari olarak kullanılan bir aşı üretilmemiştir (75).

#### 2.3. *Pseudomonas* Enfeksiyonları

*P. anguillaceptica*, ilk defa Japonya 'daki Japon balıklarında görülen hemorajik sepsisemilerden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda Japonya 'daki balıkların en önemli hastalıklarından birisi haline gelmiştir (13). Hastalık doğadaki yılan balığı popülasyonlarının doğal göçleri sırasında hızla yayılmış ve 1970 'li yılların ortalarında intensif yılan balığı kültürlerinde hızla artış göstermiştir.

*P. anguillaceptica* Japonya ve Avrupa 'daki yılan balıklarında görülen "red spot" hastalığının etkeni olarak bildirilmiştir. Hastalık salmonid ve siyah çipura (*Acanthopagrus schlegeli*) gibi balıklarda da görülmüştür (76). En son yapılan araştırmalarda "winter disease" sendromunun etkenlerinden birinin bu bakteri olduğu kanıtlanmıştır, levrek balığının da bu hastalığa karşı hassas olduğu bildirilmiştir (77).

Hastalığın çıkışında en önemli faktörün sıcaklık olduğu ve 20-27 °C arasındaki sıcaklıktaki sularda etkenin yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir. Etken levrek balıklarında su sıcaklığı 10 °C 'den 14 °C 'ye çıktığı kış sonu ve ilkbahar

başlangıcında yüksek oranda ölümlere neden olmaktadır. Genellikle bu sıcaklığın üzerinde ölümlerin azalmaya başladığı ve sıcaklık 16 °C 'ye ulaştığında ölümlerin durduğu gösterilmiştir (78).

*P. anguillaceptica* 'nın yaşama süresinin tuzluluğun artmasıyla doğru orantılı olduğu, sıcaklığın artmasıyla mortalite kaybı şekillendiği bildirilmiştir. Yılan balıklarına 3 günlük sıvı kültürler intraperitoneal olarak enjekte edildiğinde balıklar inaktif hale gelmiş, peteşiyal hemorajiler gelişmiş 6-10 gün içinde ölüm görülmüştür (13).

Etkenin proteaz ve lipazları içeren patojenite mekanizmasına sahip olduğu belirtilmiştir (13). *P. anguillaceptica* 'nın aşıyla profilaksisinde bütün aşılama yöntemlerinde başarı elde edilmiştir. Günümüzde ticari olarak uygulanan bir aşı bulunmamaktadır.

Çipura ve levrek balığında bu hastalığın başlıca belirtileri pektoral yüzgeçlerde ve anal bölgede kızarıklık, karaciğerde ve bazen de intestinal kanalda hemorajiler ve beyinde konjeksiyondur. Karında şişkinlik sonucu "belly-up" adı verilen sendrom saptanmış, bu klinik semptomun beslenme bozukluğunda da ortaya çıktığı bildirilmiştir (10).

*P. anguillaceptica* kan, karaciğer, böbrek ve dalaktan % 10 at kanı ya da % 0.5 NaCl içeren NA'da 20-25 °C'de 7.4 pH'da 7 günde koloni verir. Gram negatif, hareketli, sporsuz, katalaz ve oksidaz pozitif, glikozdan asit üretmez (13).

## 2.4. *Aeromonas* Enfeksiyonları

*Aeromonas* genusuna ait balık patojeni bakteriler hareketli ve hareketsiz olmak üzere ikiye ayrılır. *A. salmonicida* hareketsiz olup, önemli balık patojenlerinden biridir. Bu cinse ait hareketli bakteriler *A. hydrophila*, *A. punctata* ve *A. sobria* 'dır. Bu türler içerisinde en çok karşılaşılan *A. hydrophila* 'nın neden olduğu enfeksiyonlardır (79).

*A. hydrophila* deniz ve tatlı su balıkları dışında, sürüngenler, amfibialar, invertebratlar ve insanların da dahil olduğu bir çok memelide hastalık etkeni olarak bildirilmiştir (3). Larsen ve Jensen (14) tarafından morina balıklarındaki ülserlerden ve tatlı su balıklarının çeşitli bölgelerinden *A. hydrophila* izole edilmiştir. *A. hydrophila* toprak havuzlarda yetiştiriciliği yapılan bir ve iki yıllık çipuralardan da izole edilmiştir (10).

*A. hydrophila* sağlıklı balıkların solungaç ve barsaklarından izole edilmiştir. Etken portör ve hasta balıklar ile diğer duyarlı vertebralılar tarafından suya saçılır. Hasta ve hastalığı atlatan balıkların bu etkenin kaynağı olduğu düşünülmektedir. Balık paraziti copepodların ve yuvarlak kurtların hastalığı yaydığı, ayrıca yoğun balık stokları, elleme, yüksek su sıcaklığı, düşük oksijen ve yetersiz beslemenin hastalığın çıkışını kolaylaştırdığı belirtilmiştir. Akvaryum balıklarıyla yapılan deneysel bir enfeksiyonda mL'de 1000 bakteri bulunan sudaki balıkların hastalandığı görülmüş ve bu miktarın doğal akuatik çevrede de bulunabileceğine dikkat çekilmiştir (13).

*A. hydrophila* ile yapılan intraperitoneal enjeksiyon denemelerinde 9.4 °C üzerindeki su sıcaklığında balıklarda ölüm saptanmış, su sıcaklığına ilaveten kirliliğin de hastalık

çıkışında rol oynadığı, 6 mg/L nitrit düzeyinde kedi balığı popülasyonlarında enfeksiyonun artış gösterdiği bildirilmiştir (13).

Hastalık hemorajik sepsisemik karakterde olup, kuyruk ve yüzgeçlerde erozyon, ekzoftalmus, asites, deri üzerinde hemoraji ve ülser şekillenir. Otopside iç organlarda hemoraji, dalak ve böbrekte büyüme, karın boşluğunda kanla karışık asidik bir sıvının biriktiği görülmüştür (80).

Hastalıktan ölen balıkların böbreklerinden steril bir pamuklu çubukla alınan örneğin NA, TSA, Rimler-Shotts medium, Peptone beef-extract glycogen agar üzerine ekilerek 20-25 °C'de 24-48 saat inkübe edilmesiyle etken izole edilmiştir (89).

*A. hydrophila* Gam negatif, hareketli, katalaz, indol ve ADH testleri pozitif, ODC testi negatif, % 0-4 tuz ilave edilmiş ortamda 37 °C'de üreyen bir basildir (6).

## 2.5. *Myxobacteri* Enfeksiyonları

Myxobacteriosis, deniz ortamında yaşayan balıklarda "tuzlu su kolumnarisi" veya "tuzlu su Myxobacteriosis" adı ile anılmaktadır. Tuzlu su Myxobacteriosis 'nin ilk olarak Rucker ve ark. tarafından 1953 yılında Amerika'nın güneybatı Pasifik kıyılarında yetiştirilen *O. tshawytscha* balıklarında görüldüğü belirtilmiştir. Etken 1960 yılında Borg tarafından *O. gorbuscha* 'larda, 1973 yılında denizde yetiştirilen Pasifik salmonu ve alabalıklarda, 1976 yılında Coho salomonlarında hastalık oluşturmuştur (13).

Japonya'daki kırmızı (*Pagrus major*) ve siyah (*Acanthopagrus schlegeli*) çipura balığı kuluçkahanelerinde 1.5-6 cm boydaki yavru balıklarda *Myxobacteri* enfeksiyonu gelişmiştir. Enfeksiyon, balıkların kuluçkahaneden deniz kafeslerine naklinden 1-2 hafta sonra meydana gelmiş olup, % 20-30 mortaliteye neden olmuştur. Bu epizootilerden izole edilen etken *Flexibacter* türü içerisinde değerlendirilmiştir. Daha sonra etken Hikida ve ark. (82) tarafından *Flexibacter marinus* olarak yeniden isimlendirilmiş, bu isim Wakabayashi ve ark. tarafından 1976 yılında *Flexibacter maritimus* olarak değiştirilmiş, Holmes 1992 yılında *Flexibacter maritimus* adını *Cytophaga marina* olarak değiştirmiştir (13).

Çipura balıklarındaki bakteriyel solungaç ve bakteriyel yüzgeç hastalığının etkenlerinin *Myxobacteri* türleri olduğu belirtilmiştir. *Flexibacter maritimus*, çipura ve levrek balığı yetiştiriciliğinde yaygın bir problem haline gelmiştir (10).

Çipura balıklarında bakteriyel solungaç hastalığı, herhangi bir stres faktörü olmadan spontan bir şekilde görülebilir. Bunun yanı sıra bazen de monogenean bir parazit olan *Furnestia echeneis* 'in solungaçlardaki primer tahribatı ile ilişkili olarak ortaya çıkar (83). Yoğun stoklama sonucu balıkların yüzgeçlerinde meydana gelen yaralanmalar enfeksiyonun başlaması için primer bir etken olabilir.

*Myxobacteri* 'lerin suda, toprakta ve hatta balığın derisi üzerinde her zaman bulunduğu saptanmıştır. Etkenin solungaçlarda patolojik bir etki yarattıktan sonra balıktan balığa geçme özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (13). Toprak havuzlarda

veya kafeslerdeki ipura balıklarında lezyonların görölmeye başlamasından bir hafta sonra ölümler başlar (20).

Hastalıkta ilk semptom yüzgeçlerde beliren beyaz mat bir çizgidir. Daha sonra yumuşak yüzgeç dokusunun erimesi sonunda bu dejenerasyon süreci, tüm yüzgeçlerin erimesi ile sonuçlanır (61).

Myxobakteriyel enfeksiyonların sonucunda mortalite genellikle solungaçlardaki mukus akümüasyonu, nekroz sonucu asfeksi nedeni ile veya solungaç epiteli aracılığıyla ya da yüzgeç dokusunun nekroze olarak erimesi sonucu gelişen ülser aracılığıyla kana karışan bakterilerin septisemi meydana getirmesi sonucu oluşur (71).

İsrail Eliat'ta yetiştirilen ipuralarda görölen solungaç nekrozlarından *Myxobacterium* 'lar izole edilmiştir (20). Araştırmacılar etkenin izolasyonunda büyük güçlükler olduğunu ve bakteriyoskopide etkeni görerek teşhis etmenin yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

### **3. Materyal ve Yöntem**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Araştırmanın yapıldığı yer**

Araştırma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü ve Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarında yürütölmüştür.

##### **3.1.2. Balık materyali**

Bu araştırmada Muğla Bodrum'da bulunan HATBA A.Ş. 'ne ait deniz balığı işletmesinden temin edilen değişik yaş ve büyüklüklerde 13 adet hasta, 2 adet sağlıklı görönen ipura balığı ve 82 adet hasta, 3 adette sağlıklı görönen levrek balığı olmak üzere, toplam 100 adet balık kullanılmıştır.

##### **3.1.3. Primer izolasyonda kullanılan besiyerleri**

Araştırmada, besiyeri olarak Tryptic Soy Agar (TSA ; Merck) Nutrient Agar (NA ; Merck) Brain Heart Infusion Agar (BHIA ; Merck) Nutrient Broth (NB ; Merck) Tryptic Soy Broth (TSB ; Merck) kullanılmıştır.

##### **3.1.4. İdentifikasyonda kullanılan besiyerleri**

MR/VP Broth (Merck), Kligler Iron Agar (Merck), Tryptone Water (Merck), Urea Agar (Merck), Decarboxylate Broth (84), Nitrat Broth (74), Hareket-sorbitol besiyeri (85), Modifiye Leifson Glikoz besiyeri (84), % 1 tryptone besiyeri (84), Falkow Besiyeri (84) kullanılmıştır.

### **3.1.5. Suyun mikrobiyolojik analizinde kullanılan cihaz ve malzemeler**

Fluorocult LMX Broth Besiyeri (Merck), Chromocult Enterococci Broth (Merck), UV el lambası (Merck ; 4 watt, 366 nm dalga boyunda) ve Kovacs ayırıcı kullanılmıştır.

### **3.1.6. Suyun kimyasal ve fiziksel analizinde kullanılan cihazlar**

Su sıcaklığı, balık örnekleri alındığı anda termometre kullanılarak ölçülmüştür. Hasta balıkların bulunduğu kafeslerdeki suyun nitrit, nitrat, amonyak, fosfat ve demir miktarları standart yöntem kullanılarak HANNA C 103 cihazı ile ölçülmüştür (86).

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Hasta balıkların otopsis**

Hasta balıklar laboratuvara getirildikten sonra Amlacher (87) tarafından belirtilen metoda göre otopsi yapılmıştır. Organlardaki değişiklikler gözle belirlenmiştir.

### **3.2.2. Primer izolasyon**

Hasta balıklarda yapılan otopsi sonrasında böbrek, karaciğer, dalak ve solungaçlar steril koşullarda çıkartılıp tartılmıştır. Organların ağırlıkları dikkate alınarak 1/10 oranında fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seyreltilmiştir. Daha sonra  $10^{-5}$  dilüsyona kadar seyreltme yapılmıştır. Tipik semptom göstermeyen balıklarda  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  seyreltilerden, hasta balıklarda ise  $10^{-4}$  ve  $10^{-5}$  seyreltilerden ikişer adet % 2.5 NaCl içeren TSA besiyerine 0.1 mL aktararak alkolde sterilize edilmiş Drigalski spatülü ile yayma yapılmıştır. İnoküle edilmiş Petri kutuları 28 °C 'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında Petri kutularındaki koloniler sayılıp izolasyon aşamasına geçilmiştir. Her Petri kutusundan ortalama 3 koloni alınarak % 2.5 NaCl içeren Tryptic Soy Broth besiyerine aşılama yapılmıştır. 28 °C 'de 24 saat inkübasyon sonunda gelişme olan tüplerde identifikasyon testlerine geçilmiştir (4, 13).

### **3.2.3. Bakterilerin identifikasyonu**

Koloni morfolojisi genç kolonilerin çıplak gözle incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. İnceleme sırasında koloninin şekli, hifler verip vermediği, rengi ve koloni tipi belirlenmiştir (13).

Gram boyama izolatin TSB besiyerindeki 24 saatlik genç kültürlerinden Austin ve Austin (13) tarafından bildirilen metot kullanılarak yapılmıştır.

Myxobacteri 'lerin belirlenmesi için hareket testi ortası çukur olan lam üzerindeki asılı damla preparasyonunun X400 büyütmeyle ışık mikroskopunda incelenmesi ile yapılmıştır (13).

Hareket ve sorbitol testi için Tryptic Soy Broth 'ta gelişen 24 saatlik genç bakteri kültüründen hareket – sorbitol yumuşak agar besiyerine saplama şeklinde ekim yapılmıştır. 28 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra sarı renk oluşumu sorbitol pozitif, ekim hattının dışındaki gelişme ise hareket pozitif olarak değerlendirilmiştir (85).

Oksidaz testi için koloniler öze ile alınarak Bactident® Oxydase (Merck) test çubuklarına sürülmüştür. 5-10 saniye içinde koyu mor rengin meydana gelmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (84).

Katalaz testinde bir damla % 3 (v/v) 'lük hidrojen peroksitle koloninin lam üzerinde karıştırılması ile yapılmıştır. Gaz kabarcıklarının çıkması pozitif olarak değerlendirilmiştir (13, 84).

Oksidasyon– fermentasyon testi modifiye Leifson (84) tekniğine göre yapılmıştır. Glikozlu besiyerine saplama şeklinde yapılan ekimlerden birinin üzeri parafin likit ile kaplandıktan sonra 28 °C 'de 48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir.

İndol testi için % 1 'lik trypton içeren besiyerine inoküle edilen bakteri kültürü 28 °C 'de 48 saat inkübe edildikten sonra 0.2-0.3 mL Kovacs' ayırıcı ilave edilmiştir. Üst kısımda kırmızı halka oluşumu pozitif, sarı-kahverengi renk ise negatif olarak değerlendirilmiştir (84).

Metil-red testinde % 2.5 NaCl içeren MR/VP Broth 'a inoküle edilen 48 saatlik bakteri kültürüne 5 damla metil kırmızısı damlatılmıştır. Belirgin bir kırmızı renk oluşumu pozitif, renk değişimi olmazsa sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir (84).

Voges-Proskauer testi için % 2.5 NaCl içeren MR/VP Broth 'ta üretilen 48 saatlik bakteri kültürlerinden 1'er mL test tüplerine aktarılmıştır. 0.6 mL  $\alpha$ -Naphtol ve 0.2 mL KOH ilave edilerek karıştırılmıştır. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (84).

LDC, ODC ve ADH testleri için Falkow 's besiyerine yapılan ekimlerin üzeri parafin likit ile kaplandıktan sonra 28 °C'de 48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir (84).

Üreaz testi Urea Agar 'a bakterinin inokülasyonu ile gerçekleştirilmiştir. 48 saat inkübasyondan sonra ortamdaki kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Nitrat redüksiyon testinde Nitrat Broth 'a inoküle edilen 48 saatlik bakteri kültürüne Griess-Ilosvays's ayırıcı damlatılarak nitrat indirgemeleri kontrol edilmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (84).

% 0 ve % 7 tuz içeren ortamda üreme testinde tuzsuz olarak hazırlanan ve son konsantrasyonu % 7 (w/v) olacak miktarda tuz ilavesiyle hazırlanan TSB besiyerinde 48 saat içinde gelişme olup olmadığına göre değerlendirilmiştir (84).

Hemoliz testi % 5 defibrine koyun kanı ve % 2.5 NaCl içeren BHIA 'da yapılmıştır. İnokülasyondan sonra 48 saat içinde hemoliz olup olmadığı değerlendirilmiştir (84).

Laktoz ve glikozdan asit ve H<sub>2</sub>S üretimi testleri % 2.5 tuz ilavesiyle hazırlanmış Kligler Iron Agar besiyerinde yapılmıştır. Dipte sarı rengin oluşumu glikoz, yüzeyde sarı rengin oluşumu laktoz pozitif olarak değerlendirilmiştir. İnokülasyon hattı boyunca siyah rengin meydana gelmesi H<sub>2</sub>S pozitif olarak değerlendirilmiştir (84).

Şekerlerden asit üretimi testi için şeker içeren Fenol red base ortamına bakterinin 24 saatlik kültüründen ekim yapılmış ve 28 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, besiyerinin kırmızı olan renginin sarıya dönüşmesi bakterinin şekeri kullanarak asit oluşturduğunu göstermiştir (84).

Vibriostatik ajan O/129'a duyarlılık testi için % 2.5 NaCl ilavesiyle hazırlanan TSA 'ya bakteri ekildikten sonra besiyerinin ortasına 150 µg'lık O/129 diskinin yerleştirilmesi ile yapılmıştır. Diskin etrafında berrak zonun meydana gelmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (5, 13).

### **3.2.4. Su örneklerinin mikrobiyolojik analizleri**

Balık örneklerinin alındığı kafeslerden, 1 litrelik steril cam kavanozlara alınan su örnekleri, soğutma kabini içerisinde laboratuara ulaştırıldıktan sonra mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir.

Su örneklerinin mikrobiyolojik incelemesinde toplam koliform, *E. coli* ve enterokok miktarları EMS yöntemi (3 'lü tüp) kullanılarak belirlenmiştir (84).

Toplam koliform grup mikroorganizma ve *E. coli* aranmasında koliform grup mikroorganizma ve *E. coli* 'nin hızlı analizi için geliştirilmiş olan LMX Broth besiyeri kullanılmıştır. 48 saat inkübasyon sonunda rengi mavi–yeşil olan tüpler koliform grup mikroorganizma olarak işaretlemiş ve bu tüpler 366 nm uzun dalga boylu UV el lambası ile loş bir ortamda kontrol edilmiştir ve floresan ışınım görülen tüpler *E. coli* olarak işaretlenmiştir (88)

Su örneklerinde enterokok miktarının belirlenmesi amacıyla Chromocult Enterococci Broth besiyeri kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri rengi mavi-yeşil olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (78).

## **4. Araştırma Bulguları**

### **4.1. Ağustos 2000 'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular**

Çipura ve levrek balıklarının bakteriyel hastalıklarının teşhisine 2000 yılının Ağustos ayında başlanmıştır. İlk hastalık vakası 20-30 g ağırlığındaki levrek balıklarında gözlenmiştir. Stok yoğunluğunun 5-7 kg/m<sup>3</sup> olduğu belirtilmiştir. Enfeksiyon ortaya çıktığında deniz suyu sıcaklığı 26 °C olarak ölçülmüştür.

Hasta levrek balıklarında genel olarak durgunluk, gruptan ayrı yüzme, yem almama gibi davranış farklılıkları gözlenmiştir. Bunların solungaçlarında hemoraji, solungaç filamentlerinin uçlarında dökülme ve solungaç yüzeyinin mukoid bir tabaka ile kaplı

olduğu saptanmıştır. Bazı balıklarda pektoral ve kaudal yüzgeçlerin eridiği hatta tamamen kaybolduğu belirlenmiştir.

Karaciğer, böbrek, dalak ve solungaçlardan besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Gelişen kolonilerin identifikasyonu yapılarak etkenin *Myxobacteri* spp. olduğu belirlenmiştir.

#### 4.2. Ekim 2000 'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular

Ekim 2000 'de 25-40 g ağırlığındaki levrek ve çipura balıklarında görülen enfeksiyon sırasında su sıcaklığının 22.5 °C olduğu saptanmıştır. Stok yoğunluğunun 5-7 kg/m<sup>3</sup> olduğu belirtilmiştir. Hasta balıklarda dış bakıda, pelvik yüzgeç tabanında, çene altında, operkulumda kızarıklık saptanmıştır. Yapılan otopsi sonrası, iç organlarda aşırı büyüme ve yağlanma, karaciğer ve kalpte solgunluk saptanmıştır.

Karaciğer, böbrek, dalak ve solungaçlardan TSA 'ya ekimler yapılmıştır. İdentifikasyon testlerinin sonucunda *Myxobacteri* spp. ve *Aeromonas* spp. olmak üzere iki tip bakteri identifiye edilmiştir.

#### 4.3. Aralık 2000 'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular

Aralık ayında, 30-115 g ağırlığındaki levrek balıklarında enfeksiyon görüldüğünde su sıcaklığı 18 °C olup, kafeslerdeki stok yoğunluğunun ise 5-9 kg/m<sup>3</sup> olduğu bildirilmiştir.

Yapılan klinik muayenelerde enfekte balıklarda, genel olarak durgunluk, gruptan ayrı yüzme, yem almama, bazı balıklarda renk koyulaşması gibi belirgin semptomlar gözlenmiştir.

Ölen levrek balıklarının dış muayenesinde; karın altında, yüzgeç kaidelerinde, ağız etrafında ve operkulumda hemorajiler, vücut yüzeyinde aşırı miktarda mukus salgısı, ağız kenarında krem renkli mukus ile karında şişlik gözlenmiştir (Şekil 4.1). Otopside, karın duvarında hemoraji, karaciğerde sararma ve peteşiyel hemorajiler, iç organlarda anemi saptanmıştır. Barsağın şiş ve açık sarı bir sıvı ile dolu olduğu, solungaçların anemik yapıda olup küçük hemorajik odakların bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Hasta balıkların iç organlarından TSA 'ya ekimler yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler sayılarak organlardaki toplam bakteri sayısı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.). Tür tespitini yapmak için uygulanan identifikasyon testleri sonucunda bakterinin *V. anguillarum* olduğu ve organlarda saf olarak bulunduğu belirlenmiştir.

#### 4.4. Ocak 2001 'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular

Ocak ayında 35-130 g ağırlığındaki levrek balıklarında enfeksiyon saptanırken, çipura balıklarında herhangi bir hastalık belirtisi görülmemiştir. Enfeksiyonun görüldüğü dönemde stok yoğunluğun 7-10 kg/ m<sup>3</sup>, su sıcaklığının 18 °C olduğu bildirilmiştir.



Şekil 4.1. Levrek balığında vibriosis vakasında ağız çevresi, operkulum ve yüzgeçlerde hemorajiler



Şekil 4.2. Levrek balığında vibriosis vakasında barsaklarda açık renkli sıvı birikimi

Çizelge 4.1. Aralık ayında hasta levrek balıklarının iç organlarından izole edilen toplam bakteri sayısı (log kob/g)

| Numuneler     | Karaciğer | Böbrek | Dalak | Solungaç |
|---------------|-----------|--------|-------|----------|
| Levrek balığı | 6.45      | 7.54   | 6.16  | *        |
| Levrek balığı | <5        | 5.54   | 6.16  | 8.0      |
| Levrek balığı | 6.14      | 6.41   | 5.69  | 8.0      |
| Levrek balığı | <5        | <5     | <5    | <5       |
| Levrek balığı | <5        | <5     | <5    | <5       |
| Levrek balığı | <5        | <5     | 5.3   | <5       |
| Levrek balığı | 6.5       | <5     | <5    | *        |
| Levrek balığı | <5        | 6.14   | <5    | 5.3      |

\*: Örnek alınmadı

Hasta levrek balıklarının rengine koyulaşma, iştahsızlık ve genel bir durgunluk saptanmıştır. Ölen balıkların dış muayenesinde; yüzgeç tabanlarında ve operkulumda hemorajiler, gözlerde ekzoftalmus ve vücut yüzeyinde aşırı mukus salgısı tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Otopside, solungaçlarda anemi ve peteşiyel kanamalar, vücut boşluğunda kanlı sıvı birikimi, barsakta peteşi ve hemorajiler, barsak çeperinde saydamlaşma ve sarı renkli sıvı birikimi, karaciğerde sarımtırak nekrotik odaklar, böbrekler de solgunluk görülmüştür (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

Enfekte balıkların karaciğer, böbrek, dalak ve solungaçlarından ekimler yapılmıştır. Gelişen koloniler sayılarak izolasyon işlemine başlanmıştır (Çizelge 4.2.). Yapılan identifikasyon testleri sonucunda izolatlardan *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* olduğu belirlenmiştir. İç organlardan elde edilen toplam 96 izolattan 26 tanesinin *V. alginolyticus* olduğu saptanmıştır. İzole edilen *V. alginolyticus* 'un H<sub>2</sub>S negatif olduğu görülmüştür.



Şekil 4.3. *Vibrio alginolyticus* izole edilen vibriosis vakasında gözlerde ekzoftalmus, yüzgeç kaidelerinde ve ağız çevresinde hemorajiler.



Şekil 4.4. Levrek balığında vibriosis vakasında vücut boşluğunda kanlı sıvı birikimi ve dalakta büyüme



Şekil 4.5. Levrek balığında vibriosis vakasında karaciğerde solgunluk ve peteşiyel kanamalar

Çizelge 4.2. Ocak ayında hasta levrek balıklarının iç organlarından izole edilen toplam bakteri sayısı (log kob/g)

| Numuneler     | Karaciğer | Böbrek | Dalak | Safra kesesi | Kalp  | Solungaç |
|---------------|-----------|--------|-------|--------------|-------|----------|
| Levrek balığı | 7.3       | *      | 8.27  | <5           | >8.47 | >8.47    |
| Levrek balığı | >8.47     | >8.47  | >8.47 | *            | >8.47 | >8.47    |
| Levrek balığı | 7.3       | 7.14   | 7.47  | <5           | >8.47 | >8.47    |
| Levrek balığı | 6.0       | *      | 7.11  | 7.95         | *     | 8.36     |
| Levrek balığı | 6.0       | 5.47   | <5    | *            | 5.47  | >8.47    |

\*: Örnek alınmadı

#### 4.5. Şubat 2001'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular

Şubat ayında su sıcaklığı 16 °C iken, 7-12 kg/m<sup>3</sup> olarak stoklanan 40-160 g 'lık levrek balıklarında hastalık meydana gelmiştir. Aynı işletmede çipura balıklarında enfeksiyon görülmemiştir. Hasta balıkların tedavisi için 80 mg/kg dozda oxytetracycline yeme katılarak balıklara 10 gün süreyle yedirilmiş, ölümlerin seyrinde bir yavaşlama görüldüyse de tamamen kesilmediği belirtilmiştir. Bunun üzerine 7 günlük flumequine

tedavisine başlanmıştır. Klinik belirtilerin görülmesinden 2 hafta sonra alınan balık örneklerinden yapılan ekimler sonucunda patojen bakteri yoğunluğunun diğer aylara göre daha az olduğu saptanmıştır. Klinik semptom gösteren balıkların iç organları steril koşullarda çıkartılıp TSA 'ya ekimler yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler sayılmıştır (Çizelge 4.3.). TSA 'da gelişen kolonilerin identifikasyonu sonrasında, izolatların *V. anguillarum* olduğu anlaşılmıştır.

Hasta balıklarda durgunluk, su yüzeyinde yüzme, hareket ve denge bozuklukları, deride kararma, pullarda dökülme ve ülserler görülmüştür. Operkulumda, yüzgeç tabanlarında, ağız çevresinde, solungaçlarda kanama görülmüştür. Otopside, vücut boşluğunda sarı sıvı birikimi, barsak çeperinde kanama ve sarı sıvı birikimi, iç organlarda özellikle karaciğerde solgunluk ve peteşiyel hemorajiler dikkati çekmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.3. Şubat ayında hasta levrek balıklarının iç organlarından izole edilen toplam bakteri sayısı (log kob/g)

| Numuneler     | Karaciğer | Böbrek | Dalak | Safra kesesi | Kalp | Solungaç |
|---------------|-----------|--------|-------|--------------|------|----------|
| Levrek balığı | <5        | <5     | 5.54  | 6.17         | <5   | 5.77     |
| Levrek balığı | <5        | 5.3    | <5    | 5.6          | 5.6  | 6.63     |
| Levrek balığı | 5.69      | 5.3    | <5    | 5.3          | 6.9  | 7.17     |
| Levrek balığı | 5.3       | <5     | 5.3   | 5.6          | *    | <5       |
| Levrek balığı | <5        | 6.3    | 6.3   | 5.69         | *    | 5.69     |
| Levrek balığı | 5.84      | *      | 5.84  | 6.17         | 6.9  | <5       |
| Levrek balığı | 5.3       | 5.3    | 6.0   | *            | *    | 7.0      |
| Levrek balığı | <5        | <5     | <5    | *            | *    | 6.77     |



Şekil 4.6. Levrek balığında vibriosis vakasında karaciğerde solgunluk ve gözlerde opaklık

#### 4.6. Haziran 2001 'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular

Haziran ayının başında, su sıcaklığı 23 °C iken görülen hastalık vakasında levrek balıklarında çene altında, operkulumda, anüs etrafında, pektoral ve pelvik yüzgeçlerinin tabanında hemorajiler saptanmıştır. Pelvik yüzgeçlerinde erime görülmüştür. Çipura balıklarında iştahsızlık ve durgunluk dışında herhangi bir klinik

semptom görülmemiştir. Solungaç ve yüzgeçlerde erozyonlar ve nekrozlar bulunduğu için *Myxobacter* 'den şüphelenilmiştir.

Otopside, karaciğer anemik yapıda olup peteşiyel kanamalar görülmüştür. Barsaklarda iltihaplı sıvı birikimi ve solungaç epitellerinde erime ve bölgesel iltihaplanmalar saptanmıştır.

Karaciğer, dalak, böbrek ve solungaçlardan TSA 'ya ekimler yapılmıştır. 24 saat sonra gelişen koloniler sayılmıştır (Çizelge 4.4.). Yapılan identifikasyon testleri sonucunda bakterilerin *V. alginolyticus* olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.4. Haziran 'da çipura ve levrek balıklarının iç organlarından izole edilen toplam bakteri sayısı (log kob/g)

| Numuneler         | Karaciğer | Böbrek | Dalak | Solungaç |
|-------------------|-----------|--------|-------|----------|
| Levrek balığı (+) | 5.39      | 6.74   | 6.11  | >8.47    |
| Levrek balığı (+) | 7.43      | >8.47  | 6.41  | >8.47    |
| Levrek balığı (+) | 5.9       | <5     | <5    | 6.32     |
| Çipura balığı (+) | 4.76      | <5     | 6.74  | >8.47    |
| Levrek balığı (+) | 7.17      | *      | *     | >8.47    |
| Levrek balığı (+) | *         | >6.47  | 6.43  | >8.47    |
| Levrek balığı (+) | <5        | <5     | *     | 6.17     |
| Levrek balığı (+) | *         | 6.69   | 6.47  | >8.47    |
| Levrek balığı (-) | 3.3       | 3.39   | 3.0   | <3       |
| Levrek balığı (-) | 3.3       | *      | 3.3   | 3.3      |
| Levrek balığı (-) | 3.84      | 3.47   | 3.0   | 3.77     |
| Çipura balığı (-) | 3.3       | 3.0    | 3.39  | <3       |
| Çipura balığı (-) | 3.77      | *      | *     | <3       |

\*: Örnek alınmadı, (+): Hasta , (-): Sağlıklı

Haziran ayı sonunda su sıcaklığı 23 °C iken, levrek balıklarında 1 hafta içinde yoğun mortalitenin görüldüğü bildirilmiştir. Hasta levrek balıklarının gözlerinin korneasında opaklık, ağız, operkulum ve yüzgeç tabanında yoğun hemorajiler, vücudun ventral kısmı tamamen kanlanmış, abdomende dropsi, anüs büyümüş etrafı iltihaplı, pul altında aşırı kanama, gözlerde ekzoftalmus saptanmıştır. Otopside, midede şişkinlik, iç organlarda aşırı derecede büyüme ve kanama, barsak şiş, vücut boşluğunda şeffaf sıvı birikimi saptanmıştır.

Karaciğer, dalak, böbrek, gözler ve solungaçlardan TSA 'ya ekimler yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler sayılmıştır (Çizelge 4.5). İdentifikasyon testlerinin sonunda izolatların *V. anguillarum* olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.7. Temmuz 2001 'de Görülen Hastalık Vakasındaki Bulgular

Örneklerin alındığı zaman su sıcaklığı 25 °C olarak ölçülmüştür. Klinik olarak hasta balıklarda deri renginde kararma, vücut üzerinde, yüzgeç tabanlarında, ağız etrafında hemorajiler ve gözlerde ekzoftalmus görülmüştür (Şekil 4.7).

Otopside; karın duvarında hemoraji, barsakta açık renkli sıvı birikimi, karaciğerde hemoraji ve bölgesel sararma dikkati çekmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Levrek balığında vibriosis vakasında operkulum ve yüzgeçlerde hemorajiler, anüs etrafında iltihaplanma.



Şekil 4.8. Levrek balığında vibriosis vakasında anüsten beyaz renkli sıvı akıntısı.

Çizelge 4.5. Haziran 'da hasta levrek balıklarının iç organlarından izole edilen toplam bakteri sayısı (log kob /g)

| Numuneler     | Karaciğer | Böbrek | Safra kesesi | Kalp | Dalak | Göz   | Solungaç |
|---------------|-----------|--------|--------------|------|-------|-------|----------|
| Levrek balığı | 8.04      | 8.34   | 6.69         | *    | 7.26  | >8.47 | <5       |
| Levrek balığı | 6.87      | *      | *            | 6.95 | 6.29  | 7.96  | >8.47    |
| Levrek balığı | 7.64      | 7.74   | 7.07         | *    | 7.47  | 6.69  | 8.22     |
| Levrek balığı | 7.13      | 7.4    | *            | *    | 6.95  | *     | >8.47    |
| Levrek balığı | 7.11      | <5     | 6.3          | 6.74 | 5.77  | *     | 8.13     |
| Levrek balığı | <5        | 7.79   | 6.81         | 6.70 | 6.77  | *     | 7.07     |
| Levrek balığı | 7.1       | 6.92   | *            | 6.47 | 5.87  | *     | 6.77     |

\*: Örnek alınmamıştır

Steril koşullarda çıkartılan iç organlardan TSA 'ya ekimler yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen koloniler sayılmıştır (Çizelge 4.6). Yapılan identifikasyon testleri sonucunda *V. anguillarum* ve *Pseudomonas* spp. olmak üzere 2 tip bakteri identifiye edilmiştir.

Çizelge 4.6. Temmuz 'da hasta levrek balıklarının iç organlarından izole edilen toplam bakteri sayısı (log kob /g)

| Numuneler     | Karaciğer | Böbrek | Dalak | Safra kesesi | Solungaç |
|---------------|-----------|--------|-------|--------------|----------|
| Levrek balığı | 6.95      | >7.47  | 6     | 5.8          | 6        |
| Levrek balığı | >7.47     | >7.47  | 7.2   | 6.3          | 5.7      |
| Levrek balığı | 6         | 7.3    | 6     | *            | 5.7      |

\*: örnek alınmadı

Bu çalışmada hasta balıklardan izole edilen bakterilerin dönemsel dağılımı su sıcaklığı ile birlikte tartışmaya esas olmak üzere topluca ve özet halde Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Hasta balıklardan izole edilen bakteriler ve su sıcaklığı

| Dönem   | °C Su Sıcaklığı | L e v r e k       |                   |                 |               |               | Çipura            |
|---------|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------|---------------|---------------|-------------------|
|         |                 | <i>V. anguil.</i> | <i>V. algino.</i> | <i>Pseudom.</i> | <i>Aerom.</i> | <i>Myxob.</i> | <i>V. algino.</i> |
| 08.2000 | 26              |                   |                   |                 |               | +             |                   |
| 10.2000 | 22.5            |                   |                   |                 | +             | +             |                   |
| 12.2000 | 18              | +                 |                   |                 |               |               |                   |
| 01.2001 | 18              | +                 | +                 |                 |               |               |                   |
| 02.2001 | 16              | +                 |                   |                 |               |               |                   |
| 06.2001 | 23              |                   | +                 |                 |               |               | +                 |
| 06.2001 | 23              | +                 |                   |                 |               |               |                   |
| 07.2001 | 25              | +                 |                   | +               |               |               |                   |

#### 4.8. Suyun Mikrobiyolojik Özelliklerine Ait Sonuçlar

Deniz suyunda yapılan koliform grup bakteri, *E. coli* ve enterokok analizinde sularda bu bakterilerin bulunmadığı (<3 EMS/ 100 mL) saptanmıştır.

#### 4.9. Suyun Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerine Ait Sonuçlar

Bu çalışmada suyun fiziksel ve kimyasal parametrelerine yönelik sonuçlar Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Suyun fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait sonuçlar (mg/L ; °C)

| Örnekler       | Amonyak<br>(NH <sub>3</sub> -N) | Nitrat<br>(NO <sub>3</sub> -N) | Nitrit<br>(NO <sub>2</sub> -N) | Demir | Fosfat<br>(PO <sub>4</sub> ) | Sıcaklık |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|------------------------------|----------|
| Sınır Değerler | 0.02 –0.05                      | 0.1-1.0                        | 0.02                           | <0.1  | 0.1-1.0                      | 20-25    |
| 08.2000        | **                              | **                             | **                             | **    | **                           | 26       |
| 10.2000        | **                              | **                             | **                             | **    | **                           | 22.5     |
| 12.2000        | **                              | **                             | **                             | **    | **                           | 18       |
| 01.2001        | 0.02                            | 0.1                            | 0.010                          | 0.04  | 0.62                         | 18       |
| 02.2001        | 0.02                            | 0.1                            | 0.006                          | 0.07  | 0.27                         | 16       |
| 06.2001        | 0.04                            | 0.3                            | 0.004                          | 0.05  | 0.66                         | 23       |
| 06.2001        | 0.03                            | 0.3                            | 0.008                          | 0.03  | 2.51                         | 23       |
| 07.2001        | 0.01                            | 0.1                            | 0.009                          | 0.05  | 0.75                         | 25       |

\*\* : Analiz yapılmadı.

## 5. Tartışma

### 5.1. Hastalık Etmenleri

İşletme kara tesislerinde yumurtadan yavru üretmekte olup, kendi yavrularıyla kafeslerde kültür balığı besiciliği yapmaktadır. Kuluçkahanede larvalarda görülen bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlara karşı sık sık oxytetracycline ve formaldehit banyolarının yapıldığı, bu işlemlere maruz kalan yavruların kafeslere aktarılmasından sonra meydana gelen vibrio enfeksiyonlarına karşı uygulanan oxytetracycline tedavisine cevap vermediği bildirilmiştir. Kuluçkahanelerde yoğun olarak kullanılan antibiyotiklerin direnç gelişimine neden olabileceği unutulmamalıdır (5).

Çizelge 4.7 'de de görüldüğü gibi levreklerden Ağustos ve Ekim 2000 dönemlerinde *Myxobacter* spp., Ekim 2000 döneminde ayrıca *Aeromonas* spp., Aralık 2000, Ocak 2001, Şubat 2001, Haziran 2001 ve Temmuz 2001 dönemlerinde *V. anguillarum*, ayrıca Ocak 2001 ve Haziran 2001 dönemlerinde *V. alginolyticus*, Temmuz 2001 döneminde ise *Pseudomonas* spp., çipuradan ise sadece Haziran 2001 döneminde *V. alginolyticus* izole edilmiştir.

İzole edilen bakteriler arasında *V. anguillarum* ilk sırayı almış, diğer 4 bakteri türü ise kendi içlerinde etkin bir şekilde öncelik alamamışlardır. *V. anguillarum* 'un ağırlıklı olarak izole edilmesi diğer çalışma bulguları ile uyum içindedir (14, 23, 89). Bu araştırmacılar levreklerde *V. anguillarum* 'un önemine dikkat çekmişlerdir.

Bu bakterinin izole edildiği tüm balıklarda çeşitli araştırmacılar (6, 20, 43, 81, 82, 90) tarafından tarif edilen tipik klinik ve otopsi bulguları saptanmıştır (Şekil 4.1 , Şekil 4.2 , Şekil 4.3). Hastalığa neden olan bakterilerin bu izolatlar oldukları Koch postülatı çerçevesinde denenmemiş olmakla beraber, Austin (6) tarafından belirtildiği gibi özellikle böbreklerden saf halde izole edilmiş olmaları bunların muhtemel hastalık etmeni olarak tanımlanmalarını sağlamıştır. Kuşkusuz, bu aşamada Grisez ve Ollevier (23) 'in ölmek üzere olan balıklardan izole ettikleri 16 *V. anguillarum* 'un tümünün balıklar için patojen olmadığı şeklindeki bulguları bu tanımlamanın "muhtemel" olarak bırakılmasına neden olmaktadır.

Bakterinin identifikasyonunda elde edilen tüm reaksiyonlar *V. anguillarum* için Çizelge 2.2 'de (6) verilen değerlerle uyumludur.

*V. anguillarum* 'un izole edildiği dönemlerde deniz suyu sıcaklığı ile bir bağlantı kurulamamıştır. Tersine olarak, Bullock (43), Svobodova ve ark. (91) tarafından *V. anguillarum* enfeksiyonları için ilkbahar ve sonbahar dönemlerinin kritik olduğu belirtilmekle beraber, bu çalışmada su sıcaklığının 23 – 25 °C olduğu Haziran ve Temmuz 2001 tarihlerinde tipik vibriosis semptomları ve klinik bulguları olan levreklerden *V. anguillarum* izole edilmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi bu izolasyonlar böbreklerden saf olarak yapılmış olsa da izolatlar sağlıklı balıklara aşılanıp hastalık oluşması saptanmamış olduğu için burada hastalık etmeni oldukları kesin olarak iddia edilmemektedir. Bununla beraber, bu dönemde *V. anguillarum* izole edilmiş olması üzerinde önemle durulması gereken bir bulgudur.

Levrekten izole edilen *V. alginolyticus* da yine 18 ve 23 °C gibi farklı su sıcaklıklarında izole edilmiştir. Hasta balıklar tipik semptomlarını göstermişlerdir. Ayrıca klinik ve otopsi bulguları da literatür ile uyumludur.

Balık örneklerinin alındığı işletme, bölgedeki diğer işletmelerin de konumlarında olduğu gibi komşu işletmeye 20 metre uzaklıktadır. Dolayısı ile işletmenin birinde hastalık başladığı zaman, diğer işletmelerdeki balıklara da hastalık çok hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Bu durumda işletmelerde hastalıkla mücadele etmek çok zor ve pahalı olmaktadır.

Çipura balığının doğal ortamı Ege kıyıları, levrek balığının ise Akdeniz kıyılarıdır. Çipura balıkları optimum 22-25 °C sıcaklıkta, sığ sularda yaşama özelliğine sahipken, levrek balıkları optimum 20-23 °C sıcaklıkta, oksijeni bol olan sularda yaşama özelliğine sahiptir. İşletmenin bulunduğu bölgenin özellikleri çipura yetiştiriciliği için daha elverişlidir. Dolayısıyla doğal ortamından farklı bir bölgeye adapte edilen levrek balıklarında hastalıklar çipura balıklarından daha sık ve yüksek mortaliteyle seyretmektedir (4).

Bölgede *Vibrio* enfeksiyonlarının yoğun yağmurlardan sonra ve su sıcaklığının 23 °C 'nin altında bulunduğu dönemlerde patlak verdiği Çağırğan (5) tarafından belirtilmiştir. Yağmurlar nedeniyle Gölköy havzasının taşması sonucu denizdeki organik kirliliğin artması nedeniyle hastalığın patlak olduğu düşünülmektedir. Bu araştırmada su sıcaklığı 25 °C iken tespit edilen *vibrio* enfeksiyonunda balıklarda omurga deformasyonu ile aşırı parazit bulunduğu görülmüştür. Hastalık dönemlerinde yağış olmadığı bildirilmiştir. Bu durumda hastalığın ortaya çıkışı ile yağışlar arasında doğrudan ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ayrıca, stok yoğunluğunun yüksek olduğu kafeslerde mortalitenin yüksek olduğu görülmüştür. Hastalıktan ölen balıkların kafesten uzaklaştırılmaması durumunda balıklar tarafından tüketildiği, bu nedenle enfeksiyonun hızla yayıldığı tespit edilmiştir. Bu bulgular hastalığın ortaya çıkmasında su sıcaklığı, yağışların neden olduğu tuz değişimi ve organik yük artmasından daha önemli olan etkenin işletme yönetimi olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

*V. anguillarum* 'dan farklı olarak bu araştırmada izole edilen 26 *V. alginolyticus* suşunun identifikasyon bulguları Çizelge 2.2 (6) ile mutlak uyum içinde değildir. Bunlardan 5 tanesi yaygın koloni özelliği göstermemiştir. Yaygın koloninin, bakterinin peritrik flagellaya sahip olmasıyla ilgili olduğu, bu şekildeki flagellaların oluşumunun inkübasyon sıcaklığı, tuzluluk ve besiyerinin pH 'sı ile ilgili olduğu bildirilmiştir (20, 92). İzole edilen *V. alginolyticus* suşlarının H<sub>2</sub>S testinin negatif olduğu görülmüştür. Colorni ve ark. (20) aynı karakterdeki bakterileri izole etmiş ve *V. alginolyticus* olarak identifiye ettiklerini bildirmiştir.

Bu çalışmada izole edilen *V. alginolyticus* 'un H<sub>2</sub>S negatif olması ile Muroga ve ark. (93) 'ın hasta deniz balıklarından *V. alginolyticus* ve *V. parahaemolyticus* arasında ara karakter gösteren bakterileri izole ettiklerini bildirmiş olmaları farklıdır. Her ne kadar *V. parahaemolyticus* H<sub>2</sub>S negatif bir bakteri ise de VP, %7 NaCl 'de gelişme ve sakkaroz testleri *V. alginolyticus* 'tan farklıdır (94).

Colorni ve ark. (20) 'in belirttiği gibi bu araştırmada da *Myxobacteri* 'lerin neden olduğu enfeksiyonda 2-3 gün içinde solungaç epitellerinde hemoraji ve mukus artışı gözlenmiştir. Daha sonra solungaçlarda lamellerin dökülmesi şeklinde gelişen nekroz gelişmiş, pektoral ve kaudal yüzgeçlerde erimeler görülmüştür. *Myxobacteri* Ağustos 2000 ve Ekim 2000 dönemlerinde izole edilmiştir.

*Aeromonas* sadece Ekim 2000 döneminde *Myxobacteri* ile birlikte, *Pseudomonas* ise Temmuz 2001 döneminde *V. anguillarum* ile birlikte izole edilmişlerdir. Larsen ve Jensen (14) hasta deniz balıklarından sıklıkla *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* bazen de *Aeromonas* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. İsrail Eliat 'ta yetiştirilen çipuralarda görülen hemorajilerden *Vibrio* spp. ile birlikte *Pseudomonas* spp. ve *Aeromonas* spp. de izole edilmiş olup, bakteriyel hastalıkların çipura yetiştiriciliğini önemli derecede engellediği bildirilmiştir (12).

Çipuradan izole edilen tek bakteri olan *V. alginolyticus*, su sıcaklığının 23 °C olduğu 15 Haziran 2001 döneminde izole edilmiştir. Yine Eliat 'ta ölmek üzere olan hasta çipuraların kanında *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* ve *V. parahaemolyticus* izole edilirken, ölen balıkların deri ve kanlarından *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp. izole edilmiştir (20). Hasta çipuraların semptomatik, klinik ve otopsi bulguları da literatür ile uyumludur.

Bu çalışmada klinik semptomlar gösteren levrek ve çipuralardan *Pasteurella* izolasyonu yapılamamıştır. Pasteurellosis Türkiye 'de 1993 ve 1994 yıllarında görülmüş, daha sonra görülmemiş ya da rapor edilmemiştir (70, 78). Bu çalışmada izole edilememiş olması hastalığın Türkiye 'de olmadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü bu çalışmada sadece tek işletmeden klinik semptomlar gösteren balıklar ile çalışılmıştır. Bu işletmede tipik pasteurellosis semptomlarının görülmemiş olması düşündürücüdür.

*Vibrio* enfeksiyonlarında klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce genellikle beyaz bir dışkının ortama bırakıldığı ve bundan 2-3 gün içinde hastalığın görüldüğü tespit edilmiştir. Bu bulgu bölgedeki bazı işletmeler tarafından da bilinmekle beraber, konu üzerinde sebep – sonuç ilişkisi bilinmemektedir. Ancak bu gözlem ivedilikle ve öncelikle üzerinde durulması, istatistik analizlerle de desteklenmek üzere çalışılması gereken bir konudur.

## 5.2. Mikroorganizma Sayısı ile Hastalık İlişkisi

Çalışmalar boyunca Aralık 2000 döneminden başlamak üzere hasta ve sağlıklı balıkların çeşitli organlarında toplam mezofil aerob bakteri sayımı yapılmıştır (Çizelge 4.1 – 4.6). Hasta balıkların organlarındaki bakteri sayısı sağlıklı olanlara göre 3 – 4 logaritma birimi daha fazla bulunmuştur. Bu bulguların tartışılabilceği kaynaklara erişilemediği için tartışma literatür ile değil kendi içinde yapılmıştır.

Bakteri sayısının solungaçlarda daha fazla olduğu görülmekte ve bu sonuç normal olarak değerlendirilmektedir. İç organlardaki sayı ise değişkendir. Her ne kadar balık örnekleri soğukta laboratuvara getirilmişler ise de, gerek yolun uzun olması gerek hastalığın ilerlemesine bağlı olarak sayının değişkenliği nedeni ile bu aşamada organlardaki sayı ile yoruma gitmek gerekli bulunmamıştır. İşletmelerin kendi

mikrobiyoloji laboratuvarlarını kurmaları, hastalık anında vakit geçirmeden iç organlarda sayım yapmaları ile hangi organlarda yükün fazlaştığı daha sağlıklı bir şekilde belirlenebilir. Ayrıca, bakteriyel muayene için örnek alımında, klinik belirtilerin görülmesinden sonra birkaç gün içerisinde ve antibiyotik tedavisi görmemiş balıklardan örnek alınması gerektiği, aksi taktirde hastalık teşhisinin güçleştiği saptanmıştır.

### 5.3. Suyun Özellikleri ile Hastalık İlişkisi

Hastalık olan dönemlerde kafeslerin yakınından alınan su örneklerinde koliform bakteri ve enterokoklara rastlanılmamıştır (<3 EMS/100 mL). Ağ kafeslerin sahil şeridinden uzakta olması bu sonucu ortaya çıkarmıştır.

Balıklar içerisinde bulundukları ortam nedeni ile sürekli olarak mikroorganizmalarla temas halindedir. Bu nedenle bakteriyel hastalıklar yoğun balık yetiştiriciliğinin yapıldığı çiftliklerde büyük ekonomik kayıplara neden olmuştur. Bu hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli rolü balığın doğal direncini kıran etkenler rol oynar. Rasyonların dengesiz olması, ihtiyacın karşılanmaması veya bazı besin maddelerinin fazlalığı bağışıklık sistemine olumsuz etkide bulunarak enfeksiyonların çıkmasına zemin hazırlamaktadır. Suyun fiziksel ve kimyasal kalitesindeki bozukluk ve strese neden olan her türlü olumsuz faktör bakteriyel hastalıkların ortaya çıkması için zemin hazırlamaktadır (91).

Denizde ağ kafeslerde veya karada toprak havuzlarda yetiştiriciliği yapılan çipura ve levrek balıklarında kullanılan suyun kalitesinin üretim açısından önemli olduğu bildirilmiştir. Suyun fiziksel ve kimyasal parametrelerinin belirli değerler içerisinde olması gerekmektedir. Su sıcaklığı 20-25 °C, amonyak 0.02-0.05 mg/L, nitrit 0.02 mg/L, nitrat 0.1-1.0 mg/L, fosfat 0.1-1.0 mg/L ve demir miktarının en fazla 0.1 mg/L olması gerektiği belirtilmiştir (95).

Bununla beraber, bu çalışmada deniz suyu sıcaklığı ile hastalık arasında doğrudan bir ilişki görülmediği yukarıda belirtilmiştir. Suyun kimyasal özellikleri (Çizelge 4.7) incelendiğinde 29 Haziran 2001 dönemindeki fosfat miktarı dışındaki tüm değerlerin sınırlar içinde olduğu görülmekte ve dolayısı ile suyun kimyasal özellikleri ile hastalık arasında bir ilişki kurulamamaktadır. Mikro besin maddelerinden olan demirin ise *V. anguillarum* enfeksiyonlarına duyarlılığı artırdığı, mortalitenin yemdeki demir miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı belirtilmiştir (60). Doğrudan yemdeki demir değil ancak, sudaki demir ile de hastalık arasında bir bağlantı görülmemektedir.

Çalışmalar boyunca ortalamanın üzerinde ağırlıkta ve aşırı yağlı balıklarda dikkati çekecek kadar daha yüksek sıklıkta hastalık görüldüğü belirlenmiştir. Bu balıkların aşırı yem yemesine bağlı olarak vücutlarına daha fazla demir girmiş olduğu düşünülebilir. Bir diğer deyişle, yemdeki demir miktarı artmamış olmakla beraber, aşırı yem tüketimine bağlı olarak vücutta demir birikiminin olması ve bunun hastalığı arttırdığı düşünülebilir. Kuşkusuz bu düşünce, sadece "ileride araştırılabilecek konular içine dahil edilebilir" den öteye gitmemektedir.

Her ne kadar 29 Haziran 2001 döneminde fosfat miktarında aşırı bir artış (2.51 mg/L) görülse de, fosfat miktarının diğer dönemlerde sınırlar içinde kalmış olması gerek

fosfat, gerek diğerkimyasal parametreler ile hastalık arasında bir bağıntı olmadığını göstermektedir.

## 6. Sonuç ve Öneriler

Balık yetiştiriciliğinde bakteriyel hastalıklar karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi haline gelmiştir. Yetiştiricilikte hasta balıkların tedavisi sadece kayıpları azaltmak açısından değil, sağlıklı balıkları da hastalıktan korumak açısından önem taşımaktadır. Kültür balıklarındaki vibriosis salgınlarında ölüm oranını kontrol altında tutma açısından sülfonamid ve antibiyotik tedavisi faydalı olduğu bildirilmiştir (10).

Hastalık şekillenmiş balıklarda iştahsızlık nedeniyle kemoterapotiklerin yem içinde yedirilmesi mümkün görülmemektedir. Bu nedenle iştahsız balıkların kaybedilmiş olduğu düşünülerek, yem almakta olan balıkların tedaviye alınması gerekmektedir. Popülasyonda hastalık görülür görülmez sağaltıma başlanması gerekmektedir. İşletmede korunma veya tedavi amacıyla kullanılacak kemoterapötik ve dezenfektan mutlaka balık hastalıkları uzmanının görüşü alınarak kullanılması, rastgele ilaç kullanımının mikroorganizmada direnç gelişimine neden olacağı unutulmamalıdır.

Çipura ve levrek balıklarının yetiştiricilik periyodu içinde ortaya çıkan bakteriyel hastalıkların kontrolünde; kuluçkahaneden kafeslere balıkların nakli sırasında stres faktörleri minimize edilmeli, balıklara uygulanacak zorunlu bir manipulasyondan önce yemleme yapılmamalı, kafes ağları ayda en az bir kez değiştirilmeli, tüm yetiştiricilik periyodu boyunca dezenfeksiyon işlemleri, profilaktik ilaçlar ve vitamin uygulaması periyodik zamanlarda mutlaka uygulanmalıdır.

Kültür koşullarındaki zorunlu manipulasyonlar, yoğun stoklama azalan çözünmüş oksijen miktarı, suda biriken balık atıkları ve günümüz kültür balıkçılığında ortaya çıkan tüm koşullar balıklar üzerinde stres yaratıp, enfeksiyöz ajanlara karşı balığı zayıf hale getirmektedir. Bu şekilde uygulanan kültür teknikleri, ilaç tedavisine olan yanıtı azaltacaktır.

Larva döneminde uygulanan besleme rejiminin balık yetiştiriciliğinin tüm aşamalarını etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle bu dönemde besleme rejimine çok dikkat edilmesi, balık larvalarında bakteriyel florayı kontrol etmek amacıyla bakterilerden arındırılmış su ve probiyotik kullanımının yaygınlaştırılması gerekmektedir. Daha önceden selekte edilmiş saf bakteri türleri balık yemine katılarak kullanıldığında diğer bakteriyel patojenlere karşı antagonist bir etki oluşturulmaktadır. Bu teknik hem büyüme hem de yaşama oranını artırmakta ve bakteriyel florayı dengede tutmaktadır.

Hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin ve kimyasal maddelerin yanlış kullanımları pek çok sekonder etkiye neden olmaktadır. Bu olumsuz etkiler doğrudan balık üzerinde gözlenebileceği gibi dolaylı olarak insan sağlığı üzerinde de gözlenebilir. Bu kemoterapötikler balık etinde birikime yol açarak insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle balıklarda rezüdü raporları alındıktan sonra satışa sunulmaları gerekmektedir.

## Kaynaklar

1. Giorgetti, G. 1999. The cost of disease Eurofish. The Fish Vet's Page, 40-41 pp.
2. Anonim 2000. Ülkemiz Su Ürünleri Sektörünü Geliştirme Stratejileri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 54 s., Ankara.
3. Tanrıku, T.T., Çağırın, H. ve Tokşen, E. 1997. Bakteriyel balık hastalıkları. Vet. Kontr. ve Araşt. Enst. Müd. Derg., 20; 105-109.
4. Seçer, S. 1998. Bakteriyel ve viral balık hastalıkları. Yüksek Lisans Ders Notları (Yayınlanmamış).
5. Çağırın, H.1993. Kültürü yapılan çipura ve levrek balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavileri. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir.
6. Austin, B. 1987. Bacterial fish pathogens. Diseases in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited, 364 p., Chichester.
7. Çağırın, H. ve Yüreklitürk, O. 1996. Kültürü yapılan çipura ve levrek balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavileri. Bornova Vet. Kont. Araşt. Müd. Derg, 21; 35.
8. Muroga, K. ve Tatani, M. 1982. Isolation of *Vibrio anguillarum* from juvenile red sea bream (*Pagrus major*). Fish Pathology, 16; 211-214.
9. Toranzo, A.E., Barreiro, S.B., Casal, J.F., Figueras, A., Magarinos, B. ve Barja, J.L. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): First report in Spain. Aquaculture, 99; 1-15.
10. Le Breton, A. 1996. An overview oh tfw main infectious problems in cultures sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea braem (*Sparus aurata*): Solutions, sea bass and sea bream culutre: Problems and prospects, 375 p., Italy.
11. Collwell, R.R. ve Grimes, D.J. 1984. *Vibrio* diseases of marine fish populations. Hellolander Meeresuntersuchungen, 37; 265-287.
12. Paperna, I. 1984. Review of diseases affecting cultured *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* L'aquaculture du Bar et des Sparides. G. Barnabe, R. Billard ed. IRNA Publ., 465-482 pp., Paris.
13. Austin, B. ve Austin, D.A. 1993. Bacterial Fish Pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Harwood Limited.
14. Larsen, J.L ve Jensen, N.J. 1979. The ulcus-syndrome in cod (*Gadus morhus*). Nord. 96.
15. Schiewe, M.H., Trust, T.J. ve Crosa, J.H. 1981. *Vibrio ordalii* spp. nov: A causative agent of vibriosis im fish. Washington Sea Grant Program, Seattle, 31-40 pp.
16. Chart, H. ve Trust, T.J. 1984. Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Can. J. Microbiol., 30; 703-710.
17. MacDonell, M.T. ve Colwell, R.R. 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. System. Appl. Microbiol., 6; 171-182.
18. Hastein, T. ve Smith, J.E. 1977. A study of *Vibrio anguillarum* from farm and wild fish using principal components analysis. Journal of Fish Biology, 11; 69-75.
19. Cipriano, R.C., Pyle, J.B., Starliper, C.E. ve Pyle, S.W. 1985. Journal of Wildlife Disease, 21(3); 211-218.
20. Colorni, A., Paperna, I. ve Gordin, H. 1981. Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* cultured at Eliat. Aquaculture, 23; 257-267.

21. Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S. ve Fryer, J.L. 1984. Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific Salmon. J. Fish Dis., 7; 107-116.
22. Horne, M.T. ve Baxendale, A. 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. J. Fish. Dis., 6; 461-471.
23. Grisez, L. ve Ollevier, F. 1995. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol., 61(12); 4367-4373
24. West, P.A. ve Lee, J.V. 1982. Ecology of vibrio species, including *Vibrio cholera*, in naturel waters of Kent, England. Journal of Applied Bacteriology, 52; 435-448.
25. Grisez, L., Reyniers, J., Verdonck, L., Swings, J. ve Ollevier, F. 1997. Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture, 155(1-4); 391-403.
26. Belas, M.R. ve Colwell, R.R. 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated vibrio. J. Bacteriol., 151; 1568-1580.
27. Laurencin, F.B. ve German, E. 1987. Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum* ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. Aquaculture, 67; 203-205.
28. Larsen, J.L. 1984. *Vibrio anguillarum*: influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. J. Appl. Bacteriol., 57; 237-246.
29. Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Faris, A., Krovacek, K., Mansson, I., Bordas, M.N. ve Borrego, J.J. 1995. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic vibrio strains to sea bream (*Sparus aurata*) skin mucus. Aquaculture, 132; 113-120.
30. Park, S.W. ve Chun, S.K. 1986. Characteristics of pathogenic *Vibrio* spp. isolated from cultured yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Bull. Korean Fish. Soc., 19; 147-154.
31. Olafsen, J.A., Christie, M. ve Raa, J. 1981. Biochemical ecology and psycrophylic strains of *Vibrio anguillarum* isolated from outbreaks of vibriose at low temperature. Zentralblatt für bacteriologie und hygiene. Erste Abteilung Originale, 2; 339-348.
32. Kanno, T., Nakai, T. ve Muroga, K. 1989. Mode of transmission of vibriosis among ayu (*Plecoglossus altivelis*). Journal of Aquatic Animal Health, 1; 2-6.
33. Iwata, K., Yanohara, Y. ve Ishibashi, O. 1978. Studies on factors related to mortality of young red sea bream (*Pagrus major*) in the artifical seed production. Fish Pathology, 13; 97-102.
34. Gilmour, A. 1977. Characteristic of marine vibrio isolated from fish farm tanks. Aquaculture, 11; 51-62.
35. Roberts, R.J. 1978. Vibrionaceae. Fish Pathology. Balliere Tindall, 191-195 pp., London
36. Evelyn, T.P. 1971. First records of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada, and taxonomic studies of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 28; 517-525.
37. Baumann, P., Furniss, A.L. ve Lee, J.V. 1984. Genus 1, *Vibrio pacini* 1854, 411 AL. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Baltimore, William Wilkins, 518-538 pp.
38. Singleton, F.L., Attwell, R., Jangi, S. ve Colwell, R.R. 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. Appl. Environ. Microbiol., 44; 1047-1058.
39. Tison, D.L., Nishibuchi, M., Greenwood, J.D. ve Seidler, R.J. 1982. *Vibrio vulnificus* biogroup 2: New biogroup pathogenic for eels. Applied Environmental Microbiology, 44; 640-646.

40. Muroga, K., Takahashi, S. ve Yamanoi, H. 1979. Non-cholera vibrio isolated from diseased ayu. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 45; 829-834.
41. Lee, J.V., Shread, P., Furniss, A.L. ve Bryant, T.N. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* spp. nov. Journal of Applied Bacteriology, 50; 73-84.
42. Çağırğan, H., Tanrıku, T.T. ve Tokşen, E. 1996. Balık hastalıklarından korunmada genel hijyenik tedbirler. Vet. Kontr. ve Araşt. Enst. Md. Derg., 20; 39-55.
43. Bullock, G.L. 1987. Vibriosis in fish. Fish disease leaflet 77. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington.
44. Aoki, T., Kitao, T. ve Kawano. 1981. Changes in drug resistance of cultured ayu, *Plecoglossus altivelis*, in Japan. Journal of Fish Diseases, 4; 223-230.
45. Jun, L., Jun, Y., Rita, W.T., Julia, M.L., Huaishu, A. ve Norman, Y.S. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of vibrio isolates from cultured silver sea bream (*Sparus sorba*). Marine Pollution Bulletin, 39(1-12); 245-249.
46. Arda, M. 1974. Balıklarda bakteriyel, mantar, viral ve ekolojik nedenlerden ileri gelen hastalıklar ve tedavileri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 300, 259 s., Ankara.
47. Meyer, F.P. ve Schnick, R.A. 1989. A review of chemicals used for the control of fish diseases. Reviews in Aquatic Science, 1(4); 693-710.
48. Baker, R. J., Knittel, M. D. ve Fryer, J. L. 1983. Susceptibility of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, and rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to infection with *Vibrio anguillarum* following sublethal copper exposure. Journal of Fish Diseases, 6; 267-275.
49. Dec, C., Angelidis, P. ve Baudin-Laurencin, F. 1990. Effects of oral vaccination against vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Journal of Fish Diseases, 13; 369-377.
50. Fryer, J.L., Rohovec, J.S. ve Garrison, R.L. 1978. Immunization of salmonids for control of vibriose. Marine Fisheries Review, 40; 20-23.
51. Horne, M.T., Tatner, M., McDerment, S. ve Agius, C. 1982. Vaccination of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at low temperatures and the long-term persistence of protection. Journal of Fish Diseases, 5; 343-345.
52. Navarre, O. ve Halver, J.E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture, 79(1-4); 207-221.
53. Blazer, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. Annual Review of Fish Disease, 309-323 pp.
54. Kubota, S., Kimura, M. ve Egusa, S. 1970. Studies on a bacterial tuberculoids of the yellowtail. I. Symptomatology and histopathology. Fish Pathology, 4; 111-118.
55. Kitao, T. 1993. Pasteurellaceae. Bacterial Diseases of Fish, 157-165 pp.
56. Balebona, M.C., Morinigo, M.A., Sedano, J., Martinez, E., Vidaurreta, A., Borrego, J.J. ve Toranzo, A.E. 1992. Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in Southwestern Spain. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 12(1); 168-170.
57. Baptista, T., Romalde, J. ve Toranzo, A.E. 1990. First occurrence of *Pasteurellosis* in Portugal affecting cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 16(3); 92-95.
58. Bakopoulos, V., Adams, A. ve Richards, R.H. 1995. Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. J. Fish. Dis., 18; 1-7.

59. Nizan, S. ve Hammerschlag, E. 1993. First report of Pasteurellosis in freshwater hybrid Tilapia in Israel. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 13(5); 179-180.
60. Çağırgan, H.1993. The first isolation of *Pasteurella piscicida* from cultured sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. Hay. Araş. Derg., 3; 82-83.
61. Candan, A. 1991. Çipura yetiştiriciliğinde mevsimsel olarak görülen hastalık etkenlerinin teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
62. Yasunaga, N., Hatai, K. ve Tsukahara, J. 1983. *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red sea bream. Fish Pathology, 18; 107-110.
63. Magarinos, B., Santos, Y., Romalde, J.L., Rivas, C., Barja, J.L. ve Toranzo, A.E. 1992. Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. J. Gen. Microbiol., 138; 2491-2493.
64. Magarinos, B., Romalde, J.L., Santos, Y., Casal, J.F., Barja, J.L. ve Toranzo, A.E. 1994. Vaccination trials on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. Aquaculture, 120; 201-208.
65. Egusa, S. 1992. Infectious diseases of fish. A.A. Balkema Publishers, 696 p.
66. Kusuda, R. ve Yamaoka, M. 1972. Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. Bull. Jap. Scient. Fish., 38; 1325-1332.
67. Hawke, J.P., Plakos, S.M., Minton, R.V., McPhearson, R.M., Snider, T.G. ve Guarino, A.M. 1987. Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in Coastal Alabama. Aquaculture, 65; 193-204.
68. Candan, A., Küçüker, M. ve Karataş, S. 1996. *Pasteurellosis* in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 5; 150-153.
69. Janssen, W.A. ve Surgalla, M.J. 1968. Morphology, physiology and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). Journal of Bacteriology, 1606-1610.
70. Sanders, E. ve Fryer, J.L.1991. "The Pasteurellaceae". Methods Aquatic Bacteriology, 119-121 pp.
71. De Kinkelin, P., Michel, C.H. ve Ghittino, P. 1985. Precis de Pathologie des Poissons, 348 p., INRA-OIE, Paris.
72. Aoki, T. ve Kitao, T. 1985. Detection of transferable R plasmids in strains of the fish pathogenic bacterium, *Pasteurella piscicida*. Journal of Fish Diseases, 8; 345-350.
73. Çolak, S.H. 1999. Deniz levreklerinde deneysel olarak oluşturulan Pasteurellosis hastalığının patogenezi ve kemoterapatlere olan duyarlılığı. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
74. Satoh, K., Nakagawa, H. ve Kasahara, S. 1987. Effect of ulva meal supplementation on disease resistance of red sea bream. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 53(7); 1115-1120.
75. Fukuda, Y. ve Kusuda, R. 1982. Detection and characterization of precipitating antibody in the serum of immature yellowtail immunized with *Pasteurella piscicida* cells. Fish Pathology, 17; 125-127.
76. Wiklund, T. ve Bylund, G. 1990. *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonid fish in Finland. Dis. Aquat. Org., 8; 13-19.
77. Berthe, F.C., Michel, C. ve Bernarde, J.F. 1995. Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. Dis. Aquat. Org., 21; 151-155.

78. Muroga, K., Nakai, T. ve Sawada, T. 1977. Studies on red spot disease of pond cultured eels. Physiological characteristics of the causative bacterium, *Pseudomonas anguilliseptica*. Fish Pathology, 12; 33-38.
79. Bisping, W. ve Amtsberg, G. 1988. Oxidase-positive and fermentative bacteria. Farbatlas zur Diagnose Bacterieller Infektionserreger der Tiere, 123-145 pp., Berlin.
80. Llobrea, A.T. ve Gacutan, R.Q. 1987. *Aeromonas hydrophila* associated with ulcerative disease epizootic in Laguna de bay, Philippines. Aquaculture, 67; 273-278.
81. Stoskopf, M.K. 1993. Bacterial diseases of marine tropical fishes. Fish Medicine, 635-638 pp., Philadelphia.
82. Hikida, M., Wakabayashi, H., Egusa, S. ve Masumura, K. 1979. *Flexibacter* spp. a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 45; 421-428.
83. Paperna, I., Colorni, A., Gordin, H. ve Kissil, G. 1977. Diseases of *Sparus aurata* in marine culture at Eliat. Aquaculture, 10; 195-213.
84. Anonim. 1998. Bacteriological Analytical Manual, 8 th Edition, USA.
85. Kırıl, N. 1997. Enterobakter identifikasyon testlerinin birleştirilmesi üzerine araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
86. APHA. 1975. Standart methods for the examination of water and waste water. Ondördüncü baskı. John D. Ducas Co., 1193 p., USA.
87. Amlacher, E. 1986. Taschenbuch der Fischkrankheiten, Gustav Fischer Verlag, 478 p., Stuttgart.
88. Halkman, A.K. 1995. Mikrobiyolojide Kullanılan Besiyerleri. Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları, 72 s., Ankara.
89. Baudin-Laurencin, F. 1981. Fish vibrio strains antisera in France. International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. Develop. Biol. Standard, 49; 257-259.
90. Frerichs, G.N. ve Roberts, R.J. 1989. The bacteriology of teleost. Fish Pathology, 289-291 pp., London.
91. Svobodova, Z., Lloyd, R. ve Machova, J. 1993. Pollution and fish diseases. Water Quality and Fish Health, Fao, 59 p., Rome.
92. Arda, M. 1978. Genel bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 342, 242 s., Ankara.
93. Muroga, K., Lio-Pro, G., Pitogo, C. ve Imada, R. 1984. Vibrio spp. isolated from milk fish (*Chanos chanos*) with opaque eyes. Fish Pathology, 19; 81-87.
94. Kuleaşan, H. ve Durlu-Özkaya, F. 2000. *Vibrio parahaemolyticus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayınları. Sim Matbbası, Ankara, 522 s.
95. Anonim 2002. Deniz ürünleri yetiştiriciliğinde su kalite kriterleri. T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı. <http://www.tarim.gov.tr>