

MERSİN İLİ ÇAĞLARCA KÖYÜNDEKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) KULUÇKAHANELERİNDE *Flavobacterium* spp. VARLIĞI**Sevgi Yıldırım, Selmin Özer***

Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Mersin

Özet:

Bu araştırma ile Mersin İli Çağlarca Köyü'ndeki iki farklı Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmesinin kuluçkahanelerinde *Flavobacterium* spp. varlığının aranması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Aralık 2006 ve Nisan 2007 tarihleri arasında sperma, ovaryum sıvısı, yumurta, 3 aylık oluncaya kadar yavruların tüm gelişim basamaklarından ve işletmelerde kullanılan sudan örnekler alınmıştır. Yavrular yem almaya başladıktan 30–40 gün sonra II. işletmede görülen salgın sonucunda mortalite % 50 olarak gerçekleşmiştir. Hastalık bulgusu olarak renkte karararma, eksoftalmus, sırt yüzgecinde ve kuyruk yüzgecinde erozyonlar, uyuşukluk, halsizlik, su yüzeyine yakın yüzme ve yem alma oranında azalma gözlemlenmiştir. Otopsi bulgusu olarak solungaçlarda ve karaciğerde anemi ve hemoraji, dalakta büyüme tespit edilmiştir. Her iki işletmenin kuluçkahanesinden alınan 77 adet su örneği ve 270 adet balık örneği olmak üzere toplam 347 adet örnek çalışılmıştır. *Flavobacterium* spp. izolasyon ve identifikasyonu klasik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Toplam 117 örnekten (% 33.71) 141 adet *Flavobacterium* spp. izole edilmiştir. Su örneklerinin 39'unda (% 50.64) 46 adet ve balık örneklerinin 78'inde (% 28.88) 95 adet *Flavobacterium* spp. belirlenmiştir. Toplam izolatın 76'sı (% 42.93) *F. aquatile*, 30'u (% 16.94) *F. columnare*, 20'si (% 11.29) *F. branchiophilum*, 12'si (% 6.77) *F. johnsoniae* ve 3'ü (% 1.69) de *F. saccharophilum* olarak belirlenmiştir. Antimikrobiyel duyarlılık testi disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. Antimikrobiyel duyarlılık testlerine göre *Flavobacterium* spp. izolatlarının sırasıyla gentamisin, streptomisin, neomisin, sulfametoksazol-trimetoprim, ofloksasin, oksitetrasiklin, klindamisin, amoksisilin/klavulinik asit'e duyarlı ve eritromisin, penisilin ve vankomisin'e dirençli oldukları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Flavobacterium* spp., Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Antimikrobiyel duyarlılık

* **Correspondence to:** Selmin ÖZER, Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Yenişehir Kampüsü, 33169 Mersin -TÜRKİYE

Tel: (+90 533) 413 68 93 **Fax:** (+90 324) 341 30 25

E-mail: selmin.oezer@gmail.com

Bu çalışmada kullanılan bulgular, Sevgi Yıldırım'ın aynı adlı yüksek lisans tezinden kısaltılarak hazırlanmış olup, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce desteklenmiştir (Proje No: BAP-FBE-YL(SY) 2007-1)

Abstract: The existence of *Flavobacterium* spp. at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) hatcheries in Caglarca village, Mersin-Turkey

The aim of this study was to examine the existence of the *Flavobacterium* spp. at two different rainbow trout farm hatcheries in Caglarca village, Mersin, between December 2006 and April 2007. For this goal samples were collected from milt, ovarian fluid, and all phases from egg till 3 months old fries and from the water used in both farms. In consequence of disease outbreak at the II. farm, 30–40 days after fry started feeding, mortality occurred as high as 50 %. Clinical signs at fries were observed as dark coloration of the skin, exophthalmia, erosions on dorsal and caudal fins, lethargy, swimming close to the water surface, weakness and loss of appetite. As autopsy signs anaemia and haemorrhage on gills and liver, and splenomegali were observed. Totally 347 samples, including 77 water and 270 fish samples taken from the hatcheries, were examined. *Flavobacterium* spp. were isolated and identified using conventional culture methods. 141 (33.71%) *Flavobacterium* spp. have been isolated from 117 samples. 46 *Flavobacterium* spp. were isolated from 39 (50.64%) water samples and 95 from 78 (28.88%) fish samples. Of the total isolates 76 (42.93%) were identified as *F. aquatile*, 30 (16.94%) as *F. columnare*, 20 (11.29%) as *F. branchiophilum*, 12 (6.77%) as *F. johnsoniae* and 3 (1.69%) as *F. saccharophilum*. Antimicrobial susceptibility test was carried out by agar disc diffusion method. In according to antimicrobial susceptibility test, *Flavobacterium* spp. strains were sensitive to gentamicin, streptomycin, neomycin, sulphamethoxazole-trimethoprim, oxytetracycline, ofloxacin, clindamycin, amoxycilin/clavulinic acid, and resistant to erythromycine, penicillin and vancomycin, respectively.

Keywords: *Flavobacterium* spp., Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Antimicrobial susceptibility

Giriş

Mersin ilinde farklı kapasitelerde 40'tan fazla Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) işletmesi bulunmaktadır (TKB Mersin Tarım İl Müdürlüğü, 2006, yayımlanmamış veri). İşletmelere göre değişmekle birlikte, anaç sağlımları genellikle hava sıcaklıklarının düştüğü Aralık ayı içinde başlamaktadır. Bazı işletmelerden edinilen bilgiye göre, yem almaya başladıktan 30-40 gün sonra yavrularda yoğun ölümler meydana gelmekte, üretimdeki kayıpların çoğunluğu bu aşamada gerçekleşmektedir.

Kitap bilgileri (Austin ve Austin, 1993, Baur ve Rapp, 2003, Holt ve ark., 1993, Wakabayashi, 1993) ve dünyanın birçok ülkesinde yapılmış olan araştırmalar (Austin, 1992, Bernardet ve ark., 1988, Bernardet, 1989, Bustos ve ark., 1995, İspir ve ark., 2004, Korun ve Timur, 2001, Lorenzen, 1991, Madsen ve ark., 2005) bu aşamadaki yavru ölümlerinin en büyük nedeni olarak *Flavobacterium* türlerini göstermektedir. Balıkların normal mikroflorasında, toprak, tatlı su ve denizel ortamda yer alan bu etkenler, bakım, besleme ve çevresel koşullardaki olumsuzluklar neticesinde balıklarda hastalık oluşturabilmektedir (Austin ve Austin, 1993, Holt ve ark., 1993, Suomalainen ve ark., 2005).

Bugüne kadar çeşitli balık türlerinde birçok *Flavobacterium* türü balıklarda hastalık etkeni olarak bildirilmiştir (Alvarado ve ark., 1989, Bader ve ark., 2003, Basson ve ark., 2007, Decostere ve ark., 1998, Holt ve ark., 1993, Lehmann ve ark., 1991, Thomas-Jinu ve Goodwin, 2004). Bu etkenlerden *Flavobacterium psychrophilum* (*Cytophaga psychrophila*) 'gökkuşluğu alabalığı yavru hastalığı', 'bakteriyel soğuk su hastalığı' ya da 'pedünkül hastalığı' olarak bilinen hastalıkları; *F. columnare* (*C. columnaris*) 'kolumnaris hastalığı' ya da 'eyer hastalığı'; *F. branchiophilum* 'bakteriyel solungaç hastalığı' ve *F. maritimus* 'tuzlusu kolumnaris hastalığına sebep olmaktadır (Austin ve Austin, 1993, Holt ve ark., 1993, Wakabayashi, 1993). Ayrıca *F. hydatis* (*C. aquatilis*), *F. Succinicans* (*C. succinicans*) (Bernardet ve ark., 1996) ve *F. johnsoniae* (*C. johnsonae*) (Basson ve ark., 2007, Bernardet ve ark., 1996, Flemming ve ark., 2007) türleri de hasta balıklardan izole edilmiştir.

Bu araştırmanın amacı Mersin İli Çağlarca Köyü'nde faaliyet gösteren iki farklı Gökkuşluğu alabalığı işletmesinde sağımdan başlayarak yavrular 3 aylık oluncaya kadar tüm gelişim basamaklarında ve işletmelerde kullanılan sulardan

örnekler olarak meydana gelen yavru ölümlerinin etiyolojik nedenini ortaya çıkarmak ve izolatların antibakteriyel duyarlılıklarının tespit edilmesidir.

Materyal ve Metot

Su, yumurta ve yavru örnekleri

Mersin ili Çağlarca Köyü'nde faaliyet gösteren iki farklı Gökkuşluğu alabalık işletmesinden Aralık 2006 ila Mayıs 2007 tarihleri arasında, hijyen kurallarına ve soğuk zincire uygun olarak alınan su ve balık örnekleri fakültemiz laboratuvarına getirilerek aynı gün içinde incelemeye alınmıştır. Örnek alınmasına anaç balıkların sağımıyla birlikte başlanarak, 15 günlük peryotlar halinde yavrular 3 aylık oluncaya kadar devam edilmiştir. İşletmelere giren su, anaç havuzu suyu, kuluçka dolabına giren su, yavru havuzu suyu ve işletmeden çıkan sudan steril şişelere birer litre örnek alınmıştır. I. işletmeden 36, II. işletmeden 41 örnek olmak üzere toplam 77 adet su örneği incelenmiştir (Tablo 1).

Genel olarak "balık örneği" olarak ifade ettiğimiz sperma, ovaryum sıvısı, yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru ve yem almaya başlayan yavrulardan örnekler alınmıştır. 2-3 adet erkek anaçtan 1 ml'lik sperma örneği, dişilerden ovaryum sıvısı ve yumurta örnekleri anaçların sağımı esnasında temin edil-

miştir. Her örnekleme için yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta ve yavrulardan en az 20'şer adet alınmıştır. Yavru örnekleri hariç, diğer balık örneklerinin yarısı aşağıda belirtildiği gibi dezenfekte edildikten sonra incelemeye alınmıştır. I. işletmeden 124 ve II. işletmeden 146 olmak üzere toplam 270 adet balık örneği incelenmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. İşletmelerden alınan su örnekleri^a

Table 1. Water samples obtained from farms

Su Örneği Alım Noktası	I. İşletme	II. İşletme	Toplam
Giriş	12	12	24
Çıkış	12	12	24
Anaç havuzu	2	2	4
Kuluçka dolabı	6	7	13
Yavru havuzu	4	8	12
Toplam	36	41	77

^a İşletmelere göre örnek sayıları verilmiştir.

Tablo 2. İşletmelere göre incelenen balık örnekleri^a

Table 2. Examined fish samples of farms

Örnek Adı	I. İşletme	II. İşletme	Toplam
Sperma	12	12	24
Ovaryum sıvısı	12	12	24
Yumurta	12	12	24
Dezenfekte yumurta	12	12	24
Döllenmiş yumurta	12	12	24
Dezenfekte döllenmiş yumurta	12	12	24
Gözlenmiş yumurta	12	18	30
Dezenfekte gözlenmiş yumurta	12	18	30
Keseli yavru	8	8	16
Dezenfekte keseli yavru	8	8	16
Yemlenen yavru	12	22	34
Toplam	124	146	270

^a İşletmelere göre örnek sayıları verilmiştir.

Referans suşlar

Referans suş olarak *Flavobacterium columnare* (Gökkuşluğu alabalığı izolatu, Kotterba, G., 2006) kullanılmıştır.

Yumurta ve keseli yavru örneklerinin dezenfeksiyonu

Yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavru örneklerinin yarısı dezenfekte edilmeden işleme alınırken, diğer yarısı 400 ppm povidin/iodin solüsyonunun 15 dakika süreyle uygulanması ile dezenfekte edilmiştir (Brown ve ark., 1997, Rogers ve Chapman, 1990). Dezenfekte edilen örnekler 3 kez steril distile su ile yıkanmıştır (Brown ve ark., 1997).

Bakteri izolasyonu ve identifikasyonu

Yumurta ile keseli yavruardan, yem alan yavruların iç organlarından (karaciğer, böbrek) direkt olarak ve su örneklerinin 0,5 ml'si Tryptone yeast extract salts agara (TYES-A) ekilerek 17°C'de 5-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sarı renkli koloniler seçilerek TYES-A'a subkültürleri yapılmış ve 17°C'de 5-10 gün inkübe edilmiştir. İzolatların identifikasyonlarında Gram boyama, katalaz, oksidaz, hareket, fleksirubin, 30°C'de üreme, % 2 tuzlulukta üreme, nişasta hidrolizi, indol, jelatin hidrolizasyonu, hidrojen sülfür oluşumu, glukoz ve laktoz parçalanması, glikozun oksidasyon-fermentasyon metabolizması (O/F) ve hemoliz testleri uygulanmıştır. İnkübasyon 17°C'de 5-30 gün olarak gerçekleştirilmiştir (Austin ve Austin, 1993, Brown ve ark., 1997, Holt ve ark., 2000, Dalsgaard ve Madsen, 2000, Madsen ve ark., 2005, Wiklund ve ark., 1994).

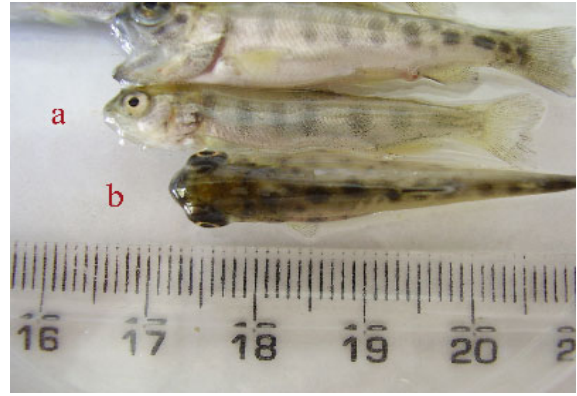
Antibakteriyel duyarlılık testi

Antibakteriyel duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemine göre Müller-Hinton agarda yapılmıştır (Woodland, 2004). Gentamisin (GM, 10 µg), streptomisin (S, 10 µg), neomisin (N, 30 µg), sulfametoksazol-trimetoprim (SXT, 1.25-23.75 µg), eritromisin (E, 15 µg), amoksisilin/klavulinik asit (AmC, 30 µg), klindamisin (CC, 2 µg), ofloksasin (OFX, 5 µg), oksitetrasiklin (T, 30 µg), penisilin (P, 10 µg) ve vankomisin (Va, 30 µg) (OXOID) diskleri kullanılarak 17°C'de 5-10 gün inkübe edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Hastalık bulguları

II. İşletmede yavrular yem almaya başladıktan 30-40 gün sonra ölümler görülmeye başlanmış ve 3 hafta kadar süren salgında yavruların % 50'den fazlası ölmüştür. Hasta ve ölen balıklarda renkte kararma, sırt yüzgecinde erozyon, gözlerde eksoftalmus (Şekil 1 ve 2), solungaçta ve karaciğerde solgunluk, karaciğerde yer yer kanamalar ve dalakta büyüme saptanmıştır (Şekil 3).



Şekil 1. II. İşletmedeki gökkuşluğu alabalığı yavrularında görülen hastalık belirtileri a) Sırt yüzgecinde erozyon b) Renkte kararma ve çift taraflı eksoftalmus

Figure 1. Clinical signs of rainbow trout fries of farm II. a) Erosion of dorsal fin b) Darkening of the skin and bilateral exophthalmia



Şekil 2. Gökkuşluğu alabalığı yavrularında sırt yüzgecinde erozyon

Figure 2. Erosion of dorsal fin rainbow trout fries



Şekil 3. II. İşletmedeki gökkuşağı alabalığı yavrularında görülen otopsi bulguları a) 1.Solungaçta solgunluk 2.Karaciğerde solgunluk ve kanama 3.Dalakta büyüme 4.Sırt yüzgecinde erozyon ve renkte kararırma b) 5.Solungaçta solgunluk 6.Karaciğerde solgunluk c) Renkte kararırma

Figure 3. Autopsy of rainbow trout fries of farm II. a) 1.Paleness of gill 2.Paleness and haemorrhagia of liver 3.Swollen spleen 4. Erosion of dorsal fin and darkening of the skin b) 5.Paleness of gill 6. Paleness of liver c) Darkening of the skin

Tablo 3. *Flavobacterium* izolatlarına ait fenotipik ve biyokimyasal karakterler

Table 3. Phenotypic and biochemical characters of *Flavobacterium* isolates

Fenotipik ve Biyokimyasal Karakterler	RFC	<i>Flavobacterium</i> izolatları ^a				
		FA	FC	FB	FJ	FS
Koloni rengi	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Hareket	-	-(76/76)	-(30/30)	-(20/20)	-(12/12)	-(3/3)
Katalaz	+	+(76/76)	+(30/30)	-(20/20)	+(12/12)	+(3/3)
Sitokrom oksidaz	+	-(76/76)	+(30/30)	-(20/20)	+(12/12)	-(3/3)
Flexirubin reaksiyonu	+	-(76/76)	+(30/30)	+(20/20)	-(9/12)	+(3/3)
Jelatin hidrolizi	+	+(65/76)	+(23/30)	+(14/20)	+(10/12)	+(3/3)
Nişasta hidrolizi	-	+(70/76)	-(25/30)	+(15/20)	+(12/12)	+(3/3)
İndol üretimi	-	-(71/76)	-(30/30)	-(20/20)	-(12/12)	-(3/3)
H ₂ S üretimi	-	-(76/76)	-(30/30)	-(20/20)	-(12/12)	-(3/3)
TSA'da üreme	-	+(50/76)	-(30/30)	+(20/20)	+(12/12)	+(3/3)
Eskülin	+	+(76/76)	+(30/30)	+(20/20)	+(12/12)	+(3/3)
Oksidatif/Fermentatif (O/F) metabolizma	O	F (76/76)	O (18/30) ^c	O (20/20)	F (12/12)	-(3/3)
Laktoz	-	+(76/76)	-(30/30)	-(20/20)	-(12/12)	-(3/3)
Glikoz	-	+(76/76)	-(30/30)	-(20/20)	+(12/12)	-(3/3)
Sakkaroz	-	+(76/76)	-(30/30)	-(20/20)	-(12/12)	-(3/3)
30°C'de üreme	+	+(76/76)	+(30/30)	+(20/20)	+(12/12)	+(3/3)
% 2 tuzlu ortamda üreme	-	+(76/76)	-(30/30)	+(20/20)	-(12/12)	+(3/3)
Hemoliz karakteri	-	α (5/76)	β (3/30)	-(20/20)	-(12/12)	β (2/3)

RFC: *Flavobacterium columnare*, referans suş; FA: *Flavobacterium aquatile*, 76 izolat; FC: *Flavobacterium columnare*, 30 izolat; FB: *Flavobacterium branchiophilum*, 20 izolat; FJ: *Flavobacterium johnsoniae*, 12 izolat; FS: *Flavobacterium saccharophilum*, 3 izolat. (+): pozitif; (-): negatif; (d): değişken. ^a Test sonuçlarının oranları izolat türlerinin sayısına göre parantez içinde verilmiştir. ^c Diğer 12 örnekte O/F metabolizması negatif olarak saptanmıştır.

Bu izolatların 45'i (% 31.91) I. işletmede ve 96'sı (% 68.08) II. işletmede saptanmıştır. Toplam izolatin 76'sı (% 42.93) *F. aquatile*, 30'u (% 16.94) *F. columnare*, 20'si (% 11.29) *F. branchiophilum*, 12'si (% 6.77) *F. johnsoniae* ve 3'ü (% 1.69) de *F. saccharophilum* olarak belirlenmiştir. Toplam 77 adet su örneğinin 39'unda (% 50.64) toplam 46 ve 270 adet balık örneğinin 78'inde (% 28.88) toplam 95 adet *Flavobacterium* spp. izole edilmiştir.

Su örneklerinden izole edilen etkenlerin 27'si (% 58.69) *F. aquatile*, 11'i (% 23.91) *F. Columnare*, 4'ü (% 8.69) *F. branchiophilum*, 3'ü (% 6.52) *F. johnsoniae* ve 1'i (% 2.17) de *F. Saccharophilum* olarak ayırt edilmiştir.

Balık örneklerinden izole edilen etkenlerin 49'u (% 51.57) *F. aquatile*, 19'u (% 20) *F. columnare*, 16'si (% 16.84) *F. branchiophilum*, 9'u (% 9.47) *F. johnsoniae* ve 2'i (% 2.10) de *F. saccharophilum* olarak belirlenmiştir.

I. işletmede incelenen 36 adet su ve 124 adet balık örneği olmak üzere toplam 160 adet örneğin 36'sında toplam 45 adet *Flavobacterium* spp. izole edilmiştir. *F. aquatile* 35 (% 77.77), *F. johnsoniae* 6 (% 13.33) ve *F. branchiophilum* 4 (% 8.88) adet bulunmuştur. Bu izolatların 17'si 15 adet (% 41.66) su örneğinden (Tablo 4), 28'i

de 21 adet (% 16.93) balık örneğinden elde edilmiştir (Tablo 5).

II. işletmeye ait 41 su ve 146 adet balık örneği çalışılmıştır. Bu işletmede 95 adet *Flavobacterium* spp. 81 adet (% 55.47) örnekten izole edilmiştir. Bu izolatların 41'i (% 43.15) *F. aquatile*, 30'u *F. columnare* (% 31.57), 16'sı *F. branchiophilum* (% 16.84), 6'sı (% 6.31) *F. johnsoniae* ve 3'ü (% 3.15) *F. saccharophilum* olarak tanımlanmıştır. Bu izolatların 29'u (% 30.2) 24 adet (% 58.53) su örneğinden (Tablo 6) ve 67'si (% 69.79) 57 adet (% 39.04) balık örneğinden (Tablo 7) elde edilmiştir.

Flavobacterium spp. izolatlarının antibakteriyel duyarlılıkları

I. işletmede saptanan *Flavobacterium* spp. izolatlarından 20'si, II. işletmedeki izolatlardan da 37'sinin antibakteriyel duyarlılığına bakılmıştır. I. işletmede incelenen izolatların tamamının eritromisin, neomisin, penisilin ve vankomisin'e dirençli olduğu görülmüştür. Bu izolatlardan 7'sinin (% 35) oksitetrasiklin'e, 6'sının (% 30) gentamisin ve streptomisin'e, 5'inin (% 25) klindamisin'e, 3'ünün (% 15) sulfametoksazol-trimetoprim'e ve 2'sinin (% 10) amoksisilin/klavulunik asit ve ofloksasin'e duyarlı oldukları saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 4. I. İşletme su örnekleri *Flavobacterium* spp. izolatları^a

Table 4. *Flavobacterium* spp. isolates of water samples of I. farm

Örnek Adı	N	FA	FJ	Toplam izolat
Giriş	11	4	1	5
Anaç havuzu	2	0	0	0
Kuluçka dolabı	6	3	0	3
Yavru havuzu	6	0	0	0
Çıkış	11	8	1	9
Toplam	36	15	2	17 ^b

^a İzolatların sayıları verilmiştir. FA: *Flavobacterium aquatile*, FJ: *Flavobacterium johnsoniae*. N: örnek sayısı.

^b 15 örnekten izole edilmiştir.

Tablo 5. I. İşletme balık örnekleri *Flavobacterium* spp. izolatları^a**Table 5. *Flavobacterium* spp. isolates of fish samples of I. farm**

Örnek Adı	N	FA	FB	FJ	Toplam izolat
Sperma	12	0	0	0	0
Ovaryum sıvısı	12	3	0	0	3
Yumurta	12	0	0	0	0
Dezenfekte yumurta	12	1	0	0	1
Dölllenmiş yumurta	12	4	0	0	4
Dezenfekte döllenmiş yumurta	12	1	0	0	1
Gözlenmiş yumurta	12	1	0	0	1
Dezenfekte gözlenmiş yumurta	12	2	1	1	4
Keseli yavru	8	1	0	0	1
Dezenfekte keseli yavru	8	2	0	1	3
Yemlenen yavru	12	5	3	2	10
Toplam	124	20	4	4	28 ^b

^a İzolatların sayıları verilmiştir. FA: *Flavobacterium aquatile*, FB: *Flavobacterium branchiophilum*, FJ: *Flavobacterium johnsoniae*. N: örnek sayısı. ^b 21 örnekten izole edilmiştir.

Tablo 6. II. İşletme su örnekleri *Flavobacterium* spp. izolatları^a**Table 6. *Flavobacterium* spp. isolates of water samples of II. farm**

Örnek Adı	N	FC	FA	FB	FJ	FS	Toplam izolat
Giriş	13	4	5	1	1	0	11
Anaç havuzu	2	0	0	0	0	0	0
Kuluçka dolabı	7	2	3	1	0	0	6
Yavru havuzu	6	0	0	0	0	0	0
Çıkış	13	5	4	2	0	1	12
Toplam	41	11	12	4	1	1	29 ^b

^a İzolatların sayıları verilmiştir. FA: *Flavobacterium aquatile*, FB: *Flavobacterium branchiophilum*, FC: *Flavobacterium columnare*, FJ: *Flavobacterium johnsoniae*, FS: *Flavobacterium saccharophilum*. N: örnek sayısı.

^b 24 örnekten izole edilmiştir.

Tablo 7. II. İşletme balık örnekleri *Flavobacterium* spp. izolatları^a**Table 7. *Flavobacterium* spp. isolates of fish samples of II. farm**

Örnek Adı	N	FC	FA	FB	FJ	FS	Toplam izolat
Sperma	12	2	1	0	0	0	3
Ovaryum sıvısı	12	0	1	1	2	0	4
Yumurta	12	0	0	0	0	0	0
Dezenfekte yumurta	12	0	0	0	0	0	0
Dölllenmiş yumurta	12	0	0	0	1	0	1
Dezenfekte döllenmiş yumurta	12	0	0	0	0	0	0
Gözlenmiş yumurta	18	1	1	0	0	0	2
Dezenfekte gözlenmiş yumurta	18	2	0	1	0	0	3
Keseli yavru	10	2	2	1	0	0	5
Dezenfekte keseli yavru	10	2	0	0	0	0	2
Yemlenen yavru	22	8	3	5	1	1	18
Toplam	146	29	19	12	5	2	67 ^b

^a İzolatların sayıları verilmiştir. FA: *Flavobacterium aquatile*, FB: *Flavobacterium branchiophilum*, FC: *Flavobacterium columnare*, FJ: *Flavobacterium johnsoniae*, FS: *Flavobacterium saccharophilum*. N: örnek sayısı.

^b 57 örnekten izole edilmiştir

Tablo 8. I. İşletme *Flavobacterium* spp.'nin antibakteriyel duyarlılık dağılımları^a

Table 8. Antibacterial sensibility ranges of *Flavobacterium* spp. of I. farm

Duyarlılık	AmC	CC	E	G	N	OFX	T	P	S	SXT	Va
Duyarlı	2	5	0	6	0	2	7	0	6	3	0
Dirençli	15	15	20	13	20	17	9	20	12	17	20
Orta Duyarlı	3	0	0	1	0	1	4	0	2	0	0

^a Antibakteriyel ilaçlara göre duyarlı, dirençli ya da orta dirençlilik gösteren örnek sayıları verilmiştir. AmC: amoksisilin/klavulinik asit, CC: klindamisin, E: eritromisin, G: gentamisin, N: neomisin, OFX: ofloksasin, T: oksitetrasiklin, P: penisilin, S: streptomisin, SXT: sulfametoksazol-trimetoprim, Va: vankomisin,

Tablo 9. II. İşletme *Flavobacterium* spp.'nin antibakteriyel duyarlılık dağılımları^a

Table 9. Antibacterial sensibility ranges of *Flavobacterium* spp. of II. farm

Duyarlılık	AmC	CC	E	G	N	OFX	T	P	S	SXT	Va
Duyarlı	5	14	4	13	9	18	11	3	6	6	4
Dirençli	26	22	27	23	17	10	21	34	26	30	32
Orta Duyarlı	6	1	6	1	11	9	5	0	5	1	1

^a Antibakteriyel ilaçlara göre duyarlı, dirençli ya da orta dirençlilik gösteren örnek sayıları verilmiştir. AmC: amoksisilin/klavulinik asit, CC: klindamisin, E: eritromisin, G: gentamisin, N: neomisin, OFX: ofloksasin, T: oksitetrasiklin, P: penisilin, S: streptomisin, SXT: sulfametoksazol-trimetoprim, Va: vankomisin

II. işletmede izole edilen 37 adet *Flavobacterium* spp.'nin antibakteriyel duyarlılıkları, sırasıyla ofloksasin (% 48.6), klindamisin (% 37.8), gentamisin (% 35.1), oksitetrasiklin (% 29.7), neomisin (% 24.3), streptomisin (% 16.2), sulfametoksazol-trimetoprim (% 16.2), amoksisilin/klavulinik asit (% 13.5), vankomisin (% 10.8), eritromisin (% 10.8) ve penisilin (% 8.1) olarak belirlenmiştir (Tablo 9).

Gökkuşuğu alabalığı yavrularında renkte karama, gözlerde eksoftalmus, solungaçta ve karaciğerde solgunluk, karaciğerde kanamalar, dalakta büyüme ve % 70'lere varan ölümler öncelikle *Flavobacterium psychrophilum*'u akla getirmektedir (Austin, 1992, Bustos ve ark., 1995, Lorenzen ve ark., 1991, Toranzo ve Barja, 1993, Wiklund ve ark., 1994). Ülkemizde yapılmış olan araştırmalar da benzer bulguları göstermektedir (Balta, 1997, Diler ve Altun, 2003, İspir ve ark., 2004, Timur ve ark., 2004). Ancak bu araştırma kapsamında ne su ne de balık örneklerinde *F. psychrophilum* saptanamamıştır. II. işletmede, yem almaya başladıktan 30–40 gün sonra belirtilen hastalık bulguları yanısıra yavru balıkların sırt yüzgeçlerinin aşınarak “eyer” şeklini aldığı da görülmüştür (Şekil 1 ve 2). Bu semptomlarla seyreden hastalığın etkeninin *Flavobacterium columnare* olduğu birçok kaynakta yer almaktadır

(Austin ve Austin, 1993, Bernardet, 1989, Farmer, 2004, Figueiredo ve ark., 2005, Wakabayashi, 1993). Kolumnaris hastalığı %100'lere varan ölümlerle seyredilmektedir (Austin ve Austin, 1993, Bernardet, 1989, Suomalainen ve ark., 2005, Wakabayashi, 1993). Birbirine yakın iki işletmede yürütülen bu araştırmada *F. columnare* sadece II. işletmenin su ve balık örneklerinde izole edilmiştir. Saptanmış olan bulguların desteği ile II. işletmedeki yavru balıklarda meydana gelen % 50 oranındaki kayıpların kolumnaris hastalığı nedeniyle oluştuğu anlaşılmaktadır. Ancak, kolumnaris hastalığının daha çok dış belirtilerle seyretmesi, diğer klinik ve otopsi bulgularının varlığı, su sıcaklığının düşüklüğü ve diğer bazı balık patojenlerinin de saptanmış olması mikts bir infeksiyon olasılığını da akla getirmektedir. Nitekim, bu araştırmaya paralel yürütülen diğer bir çalışmada aynı balık ve su örneklerinden birçok Gram negatif basilin de saptandığı bildirilmiştir (Özer ve ark., 2008).

Flavobacterium columnare'nin 13°C'nin altında nadiren hastalığa neden olduğu, 18–22°C'lerde salgınlara yol açtığı bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1993, Baur ve Rapp, 2003, Suomalainen ve ark., 2005, Wakabayashi, 1993). Bu çalışmaya paralel yürütülen diğer araştırmada salgının görüldüğü süreçte su sıcaklığı 11°C civa-

rında ölçülmüştür (Özer ve ark., 2008). Salgının meydana geldiği işletmede yavru havuzlarının üstünün açık olması nedeniyle yavruların güneş ışınlarıyla direkt temasta oldukları saptanmıştır. Baur ve Rapp (2003) kuluçkahaneden havuzlara ya da göllere alınan yavrularda güçlü güneş ışınları sebebiyle balıkların gölge bulmaya çalışmalarının stres yaratarak hastalığın ortaya çıkmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Su sıcaklığı her ne kadar düşük olsa da, Mersin'in Nisan ayındaki yoğun güneşi altında yavruların strese maruz kaldıkları düşünülmektedir.

Bu çalışmada su (Tablo 4 ve 6) ve balık örneklerinden (Tablo 5 ve 7) izole edilmiş olan *Flavobacterium* türleri bugüne kadar çeşitli balık türlerinde saptandığı bildirilen *Flavobacterium* türleri içinde yer almaktadır (Austin ve Austin, 1993, Bernardet ve ark., 1996, Holt ve ark., 1993). *Flavobacterium* spp. izolatlarının yumurta örnekleri hariç, tüm örneklerde, tüm gelişim basamaklarında var oldukları görülmektedir (Tablo 5 ve 7). Bazı izolatlar ovaryum sıvısında ve/veya spermada bulunmuştur, ancak yumurtada saptanmamış olmaları anaçlardan yumurtaya bulaşmanın olmadığını, bulaşmanın dışarıdan su aracılığı ile gerçekleştiğini düşündürmektedir. Gelişim basamaklarına göre balık örnekleri *Flavobacterium* spp. varlığı yönünden incelendiğinde (Tablo 5 ve 7) yem alan yavrulardaki sayısal artış belirgin olarak dikkati çekmektedir. *Flavobacterium* spp.'nin balıkların normal bağırsak mikroflorası içinde yer alması, sindirimin başlaması ile birlikte etkenlerin sayıca çoğalması bu artışın nedenini açıklamaktadır. Ayrıca çalışmanın tabloları incelendiğinde en çok *F. aquatile*'ye rastlanıldığı görülmektedir.

Yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavrulara povidin/iodin solüsyonu ile uygulanmış olan dezenfeksiyonun *Flavobacterium* türlerini öldürmede etkisiz kaldığı görülmektedir (Tablo 5 ve 7).

Bernardet (1989), *F. columnare* izolatlarının streptomisin, tetrasiklin, eritromisin ve novobiosine duyarlı, gentamisin, neomisin, trimetoprima dirençli oldukları bildirilmiştir. Decostere ve ark. (1998) da bu etkenin eritromisin, oksitetrasiklin ve streptomisine duyarlı, sulfametoksazol ve neomisine dirençli olduklarını belirtmişlerdir. Araştırma bulgularımıza göre en duyarlı antibakteriyel ilaçların klindamisin, gentamisin, ofloksasin, oksitetrasiklin olduğu, eritromisin, penisilin, vankomisin ve amoksisiline direncin ise çok yük-

sek olduğu görülmektedir (Tablo 8 ve 9). Bu araştırmanın antimikrobiyel duyarlılık test sonuçları (Tablo 8 ve 9) *Flavobacterium* spp.'nin genel olarak tüm antibakteriyel ilaçlara karşı yüksek bir dirençlilik geliştirdiklerini ortaya koymuştur. Antibakteriyel direncin en duyarlı antibakteriyel ilaçta bile % 50'nin üzerinde olması, yanlış ve gereksiz antibakteriyel ilaç kullanımları neticesinde dirençli bakteri suşlarının geliştiğini, hastalık çıkması durumunda sağaltımda zorluklar yaşanabileceğini göstermektedir. Antibakteriyel direncin çok yüksek olması nedeniyle epizootiğin görüldüğü işletmeye herhangi bir ilaç önerilememiştir.

Sonuç

Yapılmış olan bu proje sonuçları değerlendirildiğinde, anaçların sağlımları esnasında yumurta ve spermaya gaita bulaşmasının önüne geçilmesi, ölü yumurtaların sağımlardan ayrılması, uygun bakım ve besleme koşullarının sağlanması, yavru havuzlarının gölgeliklerle güneşten korunması, yeterli ve temiz suyun sağlanması, gereksiz, uygun olmayan ve yanlış ilaç kullanımlarının önüne geçilmesi için sağaltıma geçmeden önce antibakteriyel duyarlılık testinin yapılması hastalık ve ölümden meydana gelen kayıpların önüne geçilmesi için önemli olduğu anlaşılmaktadır. Proje kapsamında elde edilmiş olan bu izolatların patojenite ve virulans denemelerinin yapılması, klasik yöntemlerle identifikasyonların uzun zaman alması nedeniyle polimeraz zincir reaksiyonu gibi moleküler tekniklerin bu projenin devamında uygulanması yararlı olacaktır.

Teşekkür

Friedrich-Loeffler Enstitüsü, Almanya'dan Dr. Günter Kotterba'ya *Flavobacterium columnare* referans suşu ve Åbo Akademi Üniversitesi, Finlandiya'dan Assoc. Prof. Dr. Tom Wiklund'a bilimsel desteği için teşekkürü bir borç bilirim.

Kaynaklar

- Alvarado, V., Stanislavski, D., Boehm, K. H., Schlotfeldt, H. J., (1989). First isolation of *Flexibacter columnaris* in eel (*Anguilla anguilla*) in Northwest Germany (Lower Saxony), *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 9(4): 96-97.
- Austin, B., (1992). The recovery of *Cytophaga psychrophila* from two cases of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fry

- sendrome in the U. K., *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **12(6)**: 207-208.
- Austin, B., Austin, D. A., (1993). *Bacterial Fish Pathogens*, Ellis, Horwood Limited, London. ISBN 971-8709-05-3.
- Bader, J. A., Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., (2003). Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*, *Journal of Microbiological Methods*, **52(2)**: 209-220.
doi:10.1016/S0167-7012(02)00208-7
- Balta, F., (1997). Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu, IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 17-19 Eylül 1997, Eğirdir/Isparta, 641-648.
- Basson, A., Flemming, L. A., Chenia, H. Y., (2007). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates, *Microbial Ecology*, Springer Science&Business Media, LLC.
doi:10.1007/s00248-007-9245-y
- Baur, W. H., Rapp, J., (2003). *Gesunde Fische*, Blackwell Verlag GmbH, Berlin. ISBN 3-8263-3402-7
- Bernardet, J. F., Baudin-Laurencin, F., Tixerant, G., (1988). First identification of *Cytophaga psychrophila* in France, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **8(5)**: 104-105.
- Bernardet, J. F., (1989). *Flexibacter columnaris*: first description in France and comparison with bacterial strains from other origins, *Diseases of Aquatic Organisms*, **6**: 37-44.
doi:10.3354/dao006037
- Bernardet, J. F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K., Vandamme, P., (1996). Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978), *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46(1)**: 128-148.
doi:10.1099/00207713-46-1-128.
- Brown, L. L., Cox, W. T., Levine, R. P., (1997). Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted with in salmonid eggs, *Diseases of Aquatic Organisms*, **29**: 213-218.
doi:10.3354/dao029213
- Bustos, P. A., Calbuyahue, J., Montana, J., Opazo, B., Entrala, P., Solervicens, R., (1995). First isolation of *Flexibacter psychrophilus*, as causative agent of rainbow trout fry sendrome (RTFS), producing rainbow trout mortality in Chile, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **15(5)**: 162-164.
- Decostere, A., Haesebrouck, F., Devriese, L. A., (1998). Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish, *Veterinary Microbiology*, **62**: 35-45.
doi:10.1016/S0378-1135(98)00196-5
- Diler, Ö., Altun, S., (2003). Kültürü yapılan gökkuşağı alabalığından izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **7**: 1-8.
- Farmer, B. D. (2004). Improved methods for the isolation and characterization of *Flavobacterium columnare*, *Master Thesis*, Northwestern State University, Louisiana, USA.
- Figueiredo, H. C. P., Klesius, P. H., Arias, C. R., Evans, J., Shoemaker, C. A., Pereira J., D. J. and Peixoto, M. T. D. 2005. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil, *Journal of Fish Diseases*, **28**: 199-204.
doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00616
- Flemming, L., Rawlings, D. Chenia, H., (2007). Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa, *Research in Microbiology*, **158**: 18-30.
doi: 10.1016/j.resmic.2006.09.001.
- Holt, R. A., Rohovec, J. S., Fryer, J. L., (1993). Bacterial cold-water disease, in *Inglis et al., Eds, Bacterial Diseases of Fish*, Blackwell Scientific Publications 3-22, Oxford, UK. ISBN: 978-0-632-03497-0.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., William, S. T., (2000). *Bergey's Manual*

- of *Determinative Bacteriology*, 9th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. ISBN 0-683-00603-7.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., Dörücü, M., (2004). Doğu Anadolu Bölgesi'nde bazı Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması, *Firat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **16**(4): 718-724.
- Korun, J., Timur, G., (2001). Gökkuşağı alabalığında FMS üzerine bir çalışma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **12**: 15-30.
- Lehmann, J., Mock, D., Stürenbreg, F.-J., Bernardet, J. F., (1991). First isolation of *Cytophaga psychrophila* from a systemic disease in eel and cyprinids, *Diseases of Aquatic Organisms*, **10**: 217-220. doi:10.3354/dao010217
- Lorenzen, E., Dalsgaard, L., From, J., Hansen, E. M., I,HØrlyck, V., Korsholm,H., Mellergaard, S., Olesen, N.J., (1991). Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **11**(2): 77-79.
- Madsen, L., Møller, J. D., Dalsgaard, I., (2005). *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment, *Journal of Fish Diseases*, **28**(1): 39-47. doi:10.1111/j.1365-2761.2004.00598
- Özer, S., Demirel, M., Us, M., Yıldırım, S. (2008). Mersin ili Çağlarca köyü'ndeki gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) kuluçkahanelerinin mikrobiyal florası, *Journal of Fisheries Sciences.com*, **2**(3): 261-271. doi:10.3153/jfsc.com.mug.200713.
- Rogers, R., Chapman, P. F., (1990). Variation in iodine concentration during water hardening of salmonid eggs, *Proceedings of the 41st Annual Northwest Fish Culture Conference*, Fish Culture, Department of Fish and Game Boise, Idaho, 120-129.
- Suomalainen, L. R., Tirola, M. A., Valtonen, E. T., (2005). Influence of rearing conditions on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Journal of Fish Diseases*, **28**: 271-277. doi:10.1111/j.1365-2761.2005.00631
- Thomas-Jinu, S., Goodwin, A. E., (2004). Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): Efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds, *Journal of Fish Diseases*, **27**: 23-28. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00504
- Timur, G., Timur, M., Korun, J., (2004). Türkiye'de bir alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) kuluçkahanesinde *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun çıkışı üzerine bir çalışma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **17**: 21-27.
- Toranzo, A. E., Barja, L. J., (1993). Fry Mortality Syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **13**(1): 30-32.
- Wakabayashi, H., (1993). Columnaris disease, in Inglis et al., Eds, *Bacterial Diseases of Fish*, Blackwell Scientific Publications 23-39, Oxford, UK. ISBN: 978-0-632-03497-0.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönström, L., Dalsgaard, I., (1994). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **14**(2): 44-46.
- Woodland, J., (2004). *Bacteriology*. NWFHS laboratory procedures manual, 2nd edn. Chapter 5, pp. 44. Pinetop Fish Health Center, Arizona, available at: http://www.fws.gov/wildfishsurvey/manual/NWFMS_Lab_Manual7.20_4.0_Edition.pdf