



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BALIK PATOJENİ *Vibrio anguillarum*'un
KARAKTERİZASYONU VE BİOFİLM OLUŞUMU**

Mehmet DURNA

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Hastalıklar Programı

Danışman


Doç. Dr. Tülay AKAYLI

Ocak, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 03/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Hastalıklar programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. Tülay AKAYLI (Danışman)
İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Gülşen TİMUR
İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri
Fakültesi



Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ
STEINUM
İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri
Fakültesi



Doç. Dr. Ahmet AKMİRZA
İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri
Fakültesi



Yard. Doç. Dr. Zuhal ZEYBEK
İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 10072 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Tülay AKAYLI'ya; İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölüm Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülşen TİMUR'a; benden yardım ve desteğini esirgemeyen Araş. Gör. Özgür ÇANAK, Araş. Gör. Çiğdem ÜRKÜ, Araş. Gör. Emre TURGAY ve Araş. Gör. Dr. R. Eda YARDIMCI'ya; Yetiştiricilik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans ve doktorasını yapan tüm öğrenci arkadaşlarıma, örnekleme çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen balık işletmelerine ve çalışanlarına; tez aşamasında iken ERASMUS programıyla bulunduğum ve laboratuvarlarında çalışma imkanı bulduğum Santiago De Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Anabilim Dalı Bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Alicia Estevez TORANZO, Sayın Prof. Dr. Juan BARJA ve bu birimde çalışan diğer tüm idari personeline en içten dileklerle teşekkür ederim. Ayrıca bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen aileme ve projemi destekleyen İstanbul Üniversitesi BAP birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak, 2014

Mehmet Durna

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	7
2.1. LEVREK BALIĞI (<i>Dicentrachus labrax</i> , LINNEAUS, 1758) VE YETİŞTİRİCİLİĞİ	7
2.2. LEVREK BALIKLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLAR	9
2.3. VİBRİOSİS.....	12
2.4. <i>Vibrio anguillarum</i>	14
2.5. <i>Vibrio anguillarum</i> ' UN İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	16
2.5.1. Bakteriyolojik Yöntemler	17
2.5.2. Moleküler Yöntemler.....	17
2.5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	17
2.5.3. Serolojik Yöntemler.....	19
2.5.3.1. Aglütinasyon Tekniği	20
2.5.3.2. Dot blot Tekniği	21
2.6 BAKTERİLERDE BİOFİLM OLUŞUMU	21
3. MALZEME VE YÖNTEM	24
3.1. MALZEME.....	24
3.1.1. Örnekleme Yapılan İşletmeler ve Hasta Balık Örneklerinin Temini.....	24
3.1.2. Çalışmanın Gerçekleştirildiği Kurum ve Kuruluşlar	24

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Referans Bakteriler ve Antikorlar	24
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kitler	25
3.2. YÖNTEM	28
3.2.1. Hasta Balıkların Klinik Muayenesi, Otopsis ve Viseral Organlarından	28
Bakteri İzolasyonu.....	28
3.2.2. Hasta Balıklardan <i>V. anguillarum</i> 'un İzolasyonu ve İdentifikasyonu	29
3.2.3. Şüpheli <i>V. anguillarum</i> İzolatların Moleküler Yöntemle Teşhisi.....	29
3.2.4. <i>V. anguillarum</i> Suşlarının Serolojik Yöntemlerle Serotiplerinin Belirlenmesi	32
3.2.5. Biofilm Testi	33
4. BULGULAR	35
4.1. HASTA BALIKLARIN KLİNİK VE OTOPSİ BULGULARI	35
4.2. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR	40
4.3. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ BULGULARI	51
4.4. LAM AGLÜTİNASYON BULGULARI.....	51
4.5. DOT-BLOT BULGULARI	53
4.6. BİYOFİLM BULGULARI.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 4.1:	A işletmesindeki hasta levrek balığında operkulumda ve vücut üzerinde hemorajiler..... 35
Şekil 4.2:	150–200 g ağırlığa sahip hasta levrek balığında baş bölgesinde ve operkulumda hemorajik lezyonlar..... 36
Şekil 4.3:	Hasta levrek balığında anal bölgede hemoraji..... 36
Şekil 4.4:	Hasta levrek balığında solungaçlarda hiperemi ve primer lamellalarda erime, karaciğerde yaygın hemoraji ve hiperemi..... 37
Şekil 4.5:	Hasta levrek balığında karaciğerde yaygın hemoraji ve hiperemi, büyümüş dalak ve viseral organlar arasında yağ dokusunda hiperemi ve hemoraji..... 37
Şekil 4.6:	B işletmesinden temin edilen hasta levrek balığında vücut renginde açılma, yüzgeçlerde erime, pelvik yüzgeç dibinde hemoraji ve abdomende şişkinlik..... 38
Şekil 4.7:	B işletmesindeki hasta levrek balığında gözlerde hafif ekzoftalmus, pullarda dökülme, operkulum üzerinde hemoraji, karaciğerde hemoraji..... 39
Şekil 4.8:	Hasta levrek balığında solgun karaciğerde hemoraji, böbrekte erime, dalakta büyüme ve beyaz küçük nekrotik odaklar..... 39
Şekil 4.9:	Hasta levrek balığında solgun karaciğer, dalakta büyüme, bağırsakta sarı renkli sıvı birikimi..... 40
Şekil 4.10:	O/F besiyerinde fermentatif üreme özelliği gösteren 4 no'lu izolat..... 41
Şekil 4.11:	TSA besiyerinde 5 no'lu izolata ait krem renkli koloniler..... 42
Şekil 4.12:	5 no' lu izolata ait Gram boyama preparatı (Gram X400)..... 42
Şekil 4.13:	O/129 testine duyarlı 5 no'lu izolat..... 43
Şekil 4.14:	TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan 5 no'lu izolat..... 44
Şekil 4.15:	VAM besiyerinde sarı renkli koloniler oluşturan 5 no'lu izolat..... 43
Şekil 4.16:	Kanlı agar besiyerinde β hemoliz oluşturan 5 no'lu izolat..... 44
Şekil 4.17:	Arjinin dihidrolaz testinde pozitif sonuç veren 5 no' lu izolat ve negatif kontrol tüpü (K)..... 45

Şekil 4.18:	İndol testinde pozitif sonuç veren 5 no'lu izolat ve negatif kontrol tüpü (K).....	45
Şekil 4.19:	VP testinde negatif kontrol tüpü (K) ve pozitif sonuç veren 5 no'lu izolat.....	46
Şekil 4.20:	Negatif kontrol tüpü (K) ve sitrat testinde pozitif sonuç veren 5 no'lu izolat.....	46
Şekil 4.21:	Negatif kontrol (K) ve Jelatin hidroliz testinde pozitif sonuç veren 5 no'lu izolat.....	47
Şekil 4.22:	Nitrat indirgenmesi testinde pozitif sonuç veren 4 no' lu izolat ve negatif sonuç veren 6 no'lu <i>V. splendidus</i> I suşu.....	47
Şekil 4.23:	PCR ürünlerinin agaroz jelde analizi.....	52
Şekil 4.24:	<i>V. anguillarum</i> O1 ve O2 serotiplerine karşı antiserum kullanılarak gerçekleştirilen lam aglütinasyon testinde 5 no'lu izolat tarafından türün O1 serotipi antiserumuna karşı oluşturulan pozitif reaksiyon (okla gösterilmiştir).....	52
Şekil 4.25:	Dot-blot testinde kullanılan nitroselüloz membranda izolatlara ait nokta şeklinde mor renk oluşumu.....	53
Şekil 4.26:	ELISA plağının 2., 3. ve 4. gündeki görünümü.....	54
Şekil 4.27:	ELISA plağının kristal viyole içeren protokolün uygulanmasından sonraki görünümü.....	56
Şekil 4.28:	5 no'lu izolata ait pelikül oluşumu (okla gösterilmiştir).....	57

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1 : <i>Vibrio anguillarum</i> 'un <i>rpoN</i> genine ait 519 bç'lik kısmın çoğaltılmasında kullanılan PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları.....	31
Tablo 4.1 : Levrek balıklarından izole edilen bakteri izolatlarının fenotipik özellikleri.....	48
Tablo 4.2 : LB (Luria Bertani Broth) üreyen bakterilerin ELISA plağındaki optik yoğunluk (OD) değerleri.....	55
Tablo 4.3 : Kristal Viyole ile renklenen ELISA plağındaki optik yoğunluk (OD) değerleri.....	56

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
µl	: mikro litre
µM	: mikro Molar
µmol	: mikro mol
gr.	: gram
mM	: mili Molar
ng	: nano gram
nm	: nanometre
OD	: Optik yoğunluk
°C	: Derece santigrat
u	: ünite

Kısaltmalar	Açıklama
bç	: baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	: Ethylene diamine tetra acetic acid
FAO	: Birleşmiş Millet Gıda ve Tarım Örgütü
LB	: Luria Bertani Broth
NaCl	: Sodyum klorür
O/F	: Oksidasyon/Fermentasyon
ONPG	: Orto nitrofenil beta galaktosidaz
PBS	: Fosfat buffered saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpoN	: Sigma N
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris acetate- EDTA
TCBS	: Tiyosülfat sitrat safra tuzları sukroz
TSA	: Triptik soya agar
TUİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
VAM	: <i>Vibrio anguillarum</i> besiyeri
VP	: Vogues-Proskauer

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BALIK PATOJENİ *Vibrio anguillarum*'un KARAKTERİZASYONU VE BİOFİLM OLUŞUMU

Mehmet DURNA

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tülay AKAYLI

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde deniz balığı üretimi yapan balık çiftliklerindeki levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) hastalığa neden olan *Vibrio anguillarum*'un karakterizasyonu ve biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla iki adet işletmeden 150-200 gr ağırlığında, çeşitli hastalık belirtileri gösteren 8 adet balıktan örnekleme yapılmıştır. Hasta balık örneklerinin dış bakısında vücut üzerinde ve özellikle anal bölgede yaygın hemorajiler ile lezyonlar, pul kaybı, gözlerde ekzoftalmus, solungaçlarda hemoraji ile abdomende şişkinlik gibi klinik bulgular tespit edilmiştir. Hasta balıkların iç bakısında ise karın içerisinde ascites, karaciğerde yaygın hemoraji ve hiperemi, hiperemik bağırsak duvarında incelleme ve şeffaflaşma, dalakta büyüme tespit edilmiştir.

Hasta balık örneklerinin karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarından %1,5 NaCl içeren TSA yanı sıra TCBS ve VAM gibi seçici besiyerlerine yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda A işletmesinden temin edilen hasta balık örneklerinden *V. anguillarum* yanı sıra *V. splendidus* I, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. mediterranei*, *V. alginolyticus* ve *Aeromonas schubertii*; B işletmesinden temin edilen hasta balık örneklerinden ise *V. anguillarum* yanı sıra sekonder etken olarak *A. schubertii* izole ve tanımlanmıştır.

Bakteri izolatlarından TSA besiyeri üzerinde krem renkli, TCBS ve VAM besiyerlerinde sarı renkli koloni oluşturan, Gram-negatif, hareketli, fermentatif, sitokrom oksidaz ve

katalaz testlerinde pozitif sonuç veren, O/129'a hassas olan, kanlı agarda β -hemoliz yapan, arjinin ve ONPG testlerinde pozitif sonuç veren izolatlar, diğere biyokimyasal özelliklerine göre *V. anguillarum* olarak izole ve tanıfiye edilmiştir. Biyokimyasal metotlarla *V. anguillarum* olarak tanıfiye edilen izolatlar, *rpoN-ang5'* ve *rpoN-ang3'* primerleri ile gerçekleştirilen ve bu türe özel olan *rpoN* PCR analizi sonucunda 519 bazlık tek bant oluşturmuştur.

V. anguillarum O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen lam aglütinasyon testi sonucunda çalışmada hasta kültür levrek balığı örneklerinden izole edilen *V. anguillarum* suşlarından elde edilen O-antijen ekstraktları yalnızca türün O1 serotipine karşı geliştirilen antikorla reaksiyona girerek çökeltme oluşturmuştur. Dot-Blot testinde; referans *V. anguillarum* suşları ve izole edilen *V. anguillarum* izolatlarının poliklonal antikorla reaksiyona girmesi sonucu nitroselüloz membranda mor renk oluşumu gözlenmiştir. Referans *V. anguillarum* suşları ile bu çalışmada izole edilen 2 adet *V. anguillarum* izolatının ELISA plağında biyofilm oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Ayrıca saha izolatlarından yalnızca bir tanesinin sıvı-hava ara yüzeyinde pelikül oluşturduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile Ege Bölgesindeki çiftliklerde yetiştirilen kültür levrek balıklarından izole edilen ve bakteriyolojik metotlarla *V. anguillarum* olarak tanıfiye edilen bakterinin aglütinasyon testi ile O1 serotipi olduğu ortaya çıkartılarak, Dot-Blot testi ile konfirme edilmiştir. Referans *V. anguillarum* suşları ile bu çalışmadan izole edilen 2 adet *V. anguillarum* izolatının ELISA plağında biyofilm oluşturma yeteneği incelenmiş ve bir izolatın sıvı-hava ara yüzeyinde pelikül oluşturduğu tespit edilmiştir.

Ocak 2014, 95 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Vibrio anguillarum*, Levrek, biofilm, Dot-blot, *rpoN* PCR

SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOFILM FORMATION and CHARACTERIZATION of FISH PATHOGEN *Vibrio anguillarum*

Mehmet DURNA

Istanbul University

Graduate School of Science and Engineering

Department of Aquaculture

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Tülay AKAYLI

The aim of this study is the characterization and determination of the biofilm formation of *Vibrio anguillarum* isolates that induced vibriosis in cultured European sea bass reared in marine farms operating in Aegean Sea region. For this purpose, sampling studies were made on 8 fish samples weighing between 150-200 g, showing some disease signs supplied from two farms. Diffuse hemorrhages and the body surface and especially in the anal region, loss of scales, exophthalmia, and hemorrhages in the gills and ascites in the abdomen were observed in the external examination of the diseased fish samples. Accumulation of a fluid in the abdominal cavity, diffuse hemorrhages and hyperemia over the liver, thinning and transparency on the hyperemic intestine wall and enlarged spleen were observed in the internal examination of the diseased fish samples.

As a result of the bacteriological inoculations were made from the internal organs of the diseased fish samples such as liver, kidney and spleen onto TSA containing 1,5% NaCl, selective media such as TCBS and VAM. *V. splendidus* I, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. mediterranei*, *V. alginolyticus* and *Aeromonas schubertii* were isolated besides *V. anguillarum* isolates from farm (A) and *A. schubertii* was isolated beside *V. anguillarum* isolates from farm (B) as secondary bacterial agents.

After comparing with the previous reports and the reference isolates, bacterial isolates that formed creamy colonies on TSA and yellow colonies on TCBS and VAM, Gram-negatif, motile, fermentative, positive in cytochromoxidase and catalase tests, sensitive to O/129, β -haemolytic on blood agar and positive in arginine and ONPG tests were identified as *V. anguillarum* according to their other biochemical properties and API

20E profiles. Isolates that were identified as *V. anguillarum* formed a single band of 519 bp in the *rpoN* PCR analysis which is a species-specific method and performed by using *rpoN-ang5'* ve *rpoN-ang3'* primers and subsequently molecular confirmation of the biochemical identification was made.

As a result of the slide agglutination test in which the antibodies raised against *V. anguillarum* serotypes O1, O2 and O3 were used, O-antigens extracted from *V. anguillarum* recovered from diseased cultured sea bass in this study, only reacted with the antibody raised against *V. anguillarum* serotype O1 and produced agglutination. As the reference *V. anguillarum* isolates and field isolates has reacted with the polyclonal antibody, a purple color formation on the nitrocellulose membrane was detected in the dot-blot test. Biofilm formation abilities of reference *V. anguillarum* isolates and two field *V. anguillarum* isolates on ELISA plate were examined. Also, it was detected that only one field isolate has formed pellicle in the liquid-air interface.

As a result, with this study *V. anguillarum* was recovered from European sea bass cultured in the fish farms located in the Aegean Sea region and identified by using bacteriological methods. Their serotype was detected as O1 and this result was confirmed with Dot-blot test. Biofilm formation abilities of reference *V. anguillarum* isolates and two field *V. anguillarum* isolates on ELISA plate were examined and it was detected that one field isolate has formed pellicle in the liquid-air interface.

January 2014, 95 pages.

Keywords: *Vibrio anguillarum*, European sea bass, biofilm, Dot-blot, *rpoN* PCR

1. GİRİŞ

Su ürünleri üretimi dünya gıda üretiminde önemli bir role sahiptir. Önceleri sadece avcılıkla sağlanan su ürünleri üretimi, av miktarının düşmesi, doğal stokların giderek azalması ve dünya nüfusunun artışına paralel olarak gelişen besin ihtiyacı sonucu balık yetiştiriciliğini zamanla zorunlu bir ihtiyaç haline getirmiştir (Giorgetti, 1999; Stickney, 2005). Dünya hayvansal protein tüketiminin Latin Amerika ve Karayipler’de %7’si, Afrika’da %19’u, Asya’da %22’si ve dünya genelinde %16’sı su ürünlerinden karşılanmaktadır (Çeliker, 2007). FAO’ya göre yetiştiricilik sektörü son on yıl içerisinde yılda ortalama % 6,6 oranında büyüyerek, dünya çapında en çok gelişen gıda üretim sektörü haline gelmiştir (FAO, 2012).

Kültür balıkçılığı insanlığın ilk uğraşlarından birisidir. Balık yetiştiriciliği ilk olarak tarım arazilerini sulamak amacıyla Akdeniz’in kanal ve göletlerinde başlamıştır. Daha sonra özel yapılmış havuzlarda kültür balıkçılığı yapılmaya başlanmış, hatta balıkçılığa ait bazı yasalar da çıkartılmıştır. Bu sistem daha sonra Romalılar tarafından Avrupa’ya götürülmüştür (Barnabe, 1990; Çelikkale, 1994; Giorgetti, 1999; Karakaş ve Türkoğlu, 2005). Türkiye’de su ürünleri yetiştiriciliği iç sularda 1960’lı yıllarda Avrupa’dan ithal edilen gökkuşağı alabalığı yumurtalarıyla (*Oncorhynchus mykiss*) başlamıştır (Çelikkale, 1994; Alpbaz, 2005). Türkiye’de deniz balığı yetiştiriciliği 1980’li yılların başında denizlerde kafes yetiştiriciliği ki bunun ilk örneği Ege ve Akdeniz Bölgesi’nde denizden yakalanan yavru balıkların kafeslerde pazar boyuna gelene kadar büyütülmesi ile başlamış, 1985 yılında denizde ilk kültür balığı tesisi Ege denizinde kurulmuştur (Çelikkale ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005). 1999 yılında ise Marmara bölgesinde ilk özel balık çiftliği faaliyete geçmiştir. Yetiştiriciliğin artmasıyla deniz balıkları üretimi ülke ekonomisinde giderek önem kazanarak gelişmeye açık bir sektör halini almıştır (Alpbaz, 2005; Memiş, 2010).

Üç tarafı denizlerle çevrili bir yarımada konumunda olan yurdumuzun 8.333 km’lik kıyı şeridi ve 177.714 km uzunluğunda nehirleri bulunmaktadır. Deniz ve içsu

kaynaklarımızın toplam yüzey alanı 25 milyon hektardır ve bu rakam Türkiye'deki toplam tarım alanlarına yakındır (Çelikkale ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005; Memiş, 2010, TUİK, 2012). Bu nedenle balıkçılık kaynaklarının etkin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Ayrıca dünyada yaklaşık 40 milyon balıkçı ve yetiştirici geçimini su ürünlerinden sağlarken ülkemizde balıkçılık sektörü 47 bin kişiye doğrudan istihdam sağlamaktadır (FAO, 2006, 2008).

Ülkemizde, su ürünleri üretimi 2011 yılında bir önceki yıla göre % 7,73 artarak 703,545 ton olarak gerçekleşmiştir ve Türkiye'nin üretimi dünya su ürünleri üretiminin % 0.43'ünü oluşturmaktadır (FAO, 2011; TUİK, 2012). Üretimin % 61,44'ü deniz balıklarından, % 6,45'i diğer deniz ürünlerinden, % 5,27'si iç su ürünlerinden ve % 26,83'ü yetiştiricilikten elde edilmektedir. Deniz ürünleri avcılığında ilk sırayı % 62,43'lük oran ile Doğu Karadeniz Bölgesi almaktadır. Bu bölgeyi %15,49 ile Batı Karadeniz, % 8,20 ile Marmara, % 6,95 ile Ege ve % 6,93 ile Akdeniz Bölgeleri izlemektedir. Tek başına Türkiye'nin deniz balıkları yetiştiriciliği istatistikleri incelendiğinde ise üretim miktarının 2011 yılında bir önceki yıla göre % 8,15 artış gösterdiği görülmektedir (TUİK, 2012).

Doğal ortamı Akdeniz kıyıları olan levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıkları yurdumuzda yetiştiriciliği yapılan en önemli deniz balıkları türlerindedir (Çelikkale ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005; Memiş, 2010). Levrek balığı üretimimiz 2012 yılında 65.512 tona ulaşırken aynı yıl içinde çipura balığı üretimimiz 30.743 ton olmuştur (TUİK, 2013).

Kültür balıkçılığının gelişmesi ve balık stoklarının yoğunluğu bazı sorunların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Yetiştiricilik sektörünün işletme yönetimi, pazarlama ve ürünün sağlıklı bir şekilde tüketiciye sunulması gibi çözümlenmesi gereken sorunları mevcuttur. Bu sorunların yanı sıra, üretim miktarını kısıtlayan faktörlerin başında bakteriyel balık hastalıkları ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı gibi problemler gelmektedir. Bu nedenle hızlı teşhis ve tedavi yöntemleri kullanılarak bakteriyel balık hastalıklarına çözüm bulmak giderek önem kazanmaktadır (Timur ve Timur, 2003; Buller, 2004; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Balıklar içerisinde buldukları ortam nedeniyle sürekli olarak mikroorganizmalarla temas halindedir. Balık hastalıklarının ortaya çıkışında çevre, patojen ve konakçı önemli rol oynamaktadır (Austin ve Austin, 2012). Yüksek miktarlarda balık yetiştiriciliğinin yapıldığı ve balıkların yoğun olarak bir arada buldukları balık çiftliklerinde bakteriyel hastalıklar büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bakteriyel hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli faktör balığın doğal direncini kıran patojen bakterilerden kaynaklanmaktadır (Timur ve Timur, 2003; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012). Bu nedenle, kültür ve akvaryum balıkları yetiştiriciliğinde su kalitesinin (fiziksel, kimyasal, biyolojik ve diğer fizyolojik parametrelerin) optimal değerlerin dışına çıkması, yanlış yetiştiricilik uygulamaları, hastalıklara karşı koruyucu önlemlere yeterince dikkat edilmemesi ve hasta balıkların sağlıklı balıklarla temasta bulunmaları gibi nedenlerle balıklar arasında infeksiyöz hastalıklar hızlı bir şekilde yayılmakta ve işletmelerde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Buller, 2004; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012).

Bakteriyel hastalıklar, doğal ortamından farklı bir bölgeye adapte edilen levrek balıklarında çipura balıklarına göre daha sık görülerek yüksek mortaliteye neden olur (Candan, 1991; Çağırman, 1993; Çağırman ve Yüreklitürk, 1996). Deniz ve acı sularda yaşayan diğer balık türlerinde olduğu gibi levrek balıklarının en önemli bakteriyel hastalığı vibriosisdir (Candan 1991; Çağırman, 1993; Le Breton, 1999; Demircan, 2004; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012). Vibriosis, deniz ve tatlı suda bulunan pek çok balık türünde ve kültür balıklarında hastalığa neden olan en yaygın hastalıktır ve dünya çapında bir dağılıma sahip olup genellikle su sıcaklıklarında artış yaşandığı ilkbahar aylarında görülmektedir. Balık nakli, stok yoğunluğu ve düşük çözünmüş oksijen miktarı gibi balıkta strese neden olan faktörler kültür balıklarının vibriosis gibi infeksiyöz hastalıklara karşı hassasiyetini arttırmaktadır (Toranzo ve diğ., 2005; Thompson ve diğ., 2006; Colwell, 2006; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Balıklarda hastalığa neden olan başta *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *V. ordalii* olmak üzere pek çok *Vibrio* türü bakteri mevcuttur (Buller, 2004; Colwell, 2006; Noga, 2010; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012). Balık patojeni olan *Vibrio* türlerinin adezyon (yapışma) yetenekleri (Abdallah ve diğ., 2009) ve enfeksiyon meydana getirme oranı, sıcaklık ve tuzluluk gibi iki önemli çevresel faktöre bağlı olarak gelişmektedir

(Belas ve Colwell, 1982). Farklı *Vibrio* türlerinin her yaştaki çipura ve levrek balıklarında hastalık oluşturduğu belirtilmiştir (LeBretton, 1999; Akaylı, 2001; Buller, 2004; Toranzo ve diğ., 2005; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Kültür balıklarında yaygın olarak görülen ve vibriosise neden olan başlıca *Vibrio* türü *Vibrio anguillarum*'dur (Toranzo ve diğ., 2005; Rodger, 2010; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012). Genetik araştırmalar sonucu McDonnell ve Colwell (1985) tarafından *Listonella anguillarum* olarak adlandırılan *V. anguillarum*, 48'den fazla balık türünde hastalığa neden olmaktadır. Bu bakteri hastalığın dominant türü olmasına rağmen diğer *Vibrio* türleri de hastalıkta rol oynar (Hjeltnes ve Roberts, 1993; Austin ve Austin, 2012). *V. anguillarum* deniz ortamının normal mikrobiyal florasında bulunmakla birlikte ortamdaki bakteri sayısı deniz suyu sıcaklığının artmasıyla yazın artar, kışın ise azalır (Colwell, 2006; Thompson ve diğ., 2006; Austin ve Austin, 2012). Buna bağlı olarak *Vibrio* türü bakteriler deniz balıklarının bağırsaklarının normal florasında da baskın olarak bulunur (Thompson ve diğ., 2006; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Vibriosise karşı tedavi ve aşılama çalışmaları devam etmesine rağmen, kullanılan antibakteriyel maddelere karşı duyarlılığın azalması ve aşısı üretilen bakterinin uygun serotipinin belirlenememesinden kaynaklanan aşılama başarısızlıklar söz konusudur (Knappskog ve diğ., 1993; Thompson ve diğ., 2006; Austin ve Austin, 2012). Bakteri ve virüslerin alt tür seviyesindeki birbirinden farklı çeşitlemelerine serovar veya serotip adı verilir. Serotiplendirme, organizmaların alt tür seviyeleri bakımından sınıflandırılmasına izin verir ki bu da epidemiyoloji (türler arası karşılaştırma) çalışmalarında çok önemli bir konudur (Sorensen ve Larsen, 1986; Knappskog ve diğ., 1993). Serotiplerin belirlenmesinde bakteriye ait virülens faktörleri, Gram-negatif bakterilerin hücre yapısında bulunan lipopolisakkaritler, ekzotoksin varlığı, plazmitler, fajlar ve aynı türün iki üyesini birbirinden ayırt etmeye yarayan serolojik özellikler kullanılabilir (Sorensen ve Larsen, 1986; Knappskog ve diğ., 1993). Farklı ülkelerden ve farklı balık türlerinden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının iyi karakterize edilmesi, serotiplerinin ve virülens mekanizmalarının araştırılmasına bağlı olarak uygun aşılama üretilmesi çok önemlidir (Knappskog ve diğ., 1993; Çağırğan, 2004). Avrupa serotiplendirme sistemine göre *V. anguillarum*'un 23 farklı serotipi bulunmaktadır (Sorensen ve Larsen, 1986; Pedersen

ve diğ., 1999). Dünya çapında kültürü yapılan ve doğadaki balıkların hastalık olgularından *V. anguillarum*'un O1 ve O2 serotipleri (Sorensen ve Larsen, 1986) yanısıra O3 ve O4 serotipleri bildirilirken (Myhr ve diğ.,1991; Santos ve diğ.,1995) adı geçen serotiplerin balıklarda ölümlere neden olduğu bildirilmiştir. Diğer serotipler ise çevresel suşlar olarak kabul edilmektedir ve çok nadiren balıklarda vibriosis olgularından izole edilmiştir (Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve diğ., 2005).

Günümüzde balık hastalıklarının teşhisinde yaygın olarak mikrobiyolojik, serolojik, moleküler, histopatolojik ve immunohistokimyasal teknikler kullanılmaktadır (Noga, 2010; Rodger, 2010; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). *Vibrio anguillarum*'un mikrobiyolojik tanısının yapılabilmesi için kullanılan rutin biyokimyasal testler (Kimberley ve Macnair, 2004; Austin ve Austin, 2012), PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile moleküler düzeyde identifikasyonu (Gonzales ve diğ., 2003), bakterinin serotipini belirlemek için aglütinasyon (Sorensen ve Larsen, 1986) ve Dot-blot yöntemlerinin kullanılması (Cipriano ve diğ., 1985) gibi tekniklerin kullanımı bakteriyel izolatların patojenitesinin ve virülensinin belirlenmesinde önemli tekniklerdir. Bu tekniklerin yanısıra son yıllarda farklı *Vibrio* türlerinin virülens faktörü oluşturan ve patojeniteye katkıda bulunan biyofilm oluşumunun tespiti de bu tekniklere ilave edilebilir (Wang ve diğ., 2003; Nagata ve Eguchi, 2003; Abdallah ve diğ., 2009).

Biyofilm oluşumu, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesi veya canlı yada cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan bakterilerin oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (Costerton ve diğ., 1995; Donlan ve Costerton, 2002; Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm tabakası için gereken 3 temel eleman yüzey, mikroorganizma ve EPS (ekzosellüler polimerik madde)'dir. Biyofilm tabakasının oluşmasında ilk basamak yüzeye yapışma işlemidir ve hücre dışı yapıları, pH, besin miktarı ve sıcaklık yüzeye yapışmada etkili role sahiptir. Bakteri hücreleri sahip olduğu hücre dışı uzantılar ya da saldığı polimerler ile yüzeye sıkıca bağlanır ve bu bağlanma geri dönüşümsüzdür. Yüzeye sıkıca tutunan bakteriler burada çoğalarak önce mikrokolonileri oluşturur ve bunlar büyüyüp ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur (O'Toole ve diğ., 2000; Hallam ve diğ. 2001; Donlan ve Costerton, 2002; Allison, 2003; Altun ve Şener, 2008).

Akuatik patojenlerin virülens mekanizması; hücreler arası iletişimi sağlayan çevreyi algılama sistemi (quorum sensing) tarafından kontrol edilmektedir. Bu algılama sistemi biyofilm oluşturan bakterilerde çok gelişmiştir. Akuatik Gram-negatif bakterilerde bulunan hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal sistemine sahip olan *V. anguillarum* gibi bakterilerde, birbirleriyle haberleşmek için *Acyl*-homoserine lactones (AHLs) sinyal molekülünü kullanırlar (O'Toole ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2003; Defoirdt ve diğ., 2005). Bakterilerin sinyal molekülü ile biyofilm oluşumu, oksidatif strese karşı direnç ve proteazlar yanısıra, hemolizin, tip 3 salgı sistemi, hücre dışı toksinler ve siderofor üretimi gibi bir seri virülens faktörünü üretmektedir (O'Toole ve diğ., 2000; Whitchurch ve diğ., 2002; Defoirdt ve diğ., 2005). Bu sinyal molekülleri aracılığıyla bakterilerin yoğunlukları izlenmekte ve yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin üretimi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenmektedir. Hücreden hücreye oluşan sinyal sistemi ile bakteriler mevcut genleri aracılığıyla biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır (O'Toole ve diğ., 2000; Whitchurch ve diğ., 2002; Wang ve diğ., 2003; Defoirdt ve diğ., 2005). Nagata ve Eguchi, (2003) tatlı su balıklarından izole ettikleri *Vibrio anguillarum* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini incelerken, Wang ve diğ., (2003) ise yaptıkları çalışmada *V. anguillarum*'un O1 serotipine ait hücre dışı membran proteinlerini (OMP) kodlayan genleri klonlamış ve bu genlerden *OmpU*'nun biyofilm oluşumunu sınırlayan bir role sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada öncelikle Ege Bölgesi'nde bulunan ve deniz balığı üretimi yapan bazı balık çiftliklerindeki hasta levrek balıklarının iç organlarından izole edilen *V. anguillarum*'un bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerden PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemiyle teşhisinin yapılmasının yanı sıra etkenin lam aglütinasyon ve Dot-blot yöntemlerini kullanarak serotiplendirilmesi ve biyofilm oluşumunun varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. LEVREK BALIĞI (*Dicentrachus labrax*, LINNEAUS, 1758) VE YETİŞTİRİCİLİĞİ

Morone labrax ve *Roccus labrax* sinonimleri ile de adlandırılan levrek balığı aşağıdaki şekliyle sistematikteki yerini almıştır (Akşiray, 1987; Barnabé, 1990; Stickney, 2005).

Phylum : Vertabrata

Subphylum : Pisces

Classis : Osteichthyes

Subordo : Percoidei

Familya : Serranidae

Genus : *Dicentrarchus*

Species : *Dicentrachus labrax* (Linneaus, 1758)

Fusiform şeklinde bir vücut yapısına sahip olan levrek balıkları grimsi renklidirler. Karın kısmı beyaz olan levrek balıklarında operkulumun üst kısmında siyahımsı bir benek vardır. Genç bireylerin vücudu üzerinde siyah benekler bulunur ve balık yaşlandıkça bu benekler kaybolur (Barnabé, 1990; Alpbaz, 2005). Levrek balıklarında birbirinden ayrı iki adet diken şua içeren dorsal yüzgeç bulunur. Operkulumun kenarı çok keskin ve serttir. Dişi balıklarda burun yapısı daha sivri ve vücutları daha geniş yapılıdır. Erkekler ise ince uzun vücutludur. 1 m'ye kadar uzayabilen levrek balıklarının boyu ortalama 50 cm. olup, ağırlığı da 12 kg' a ulaşabilir (Barnabé, 1990; Uçal ve Benli, 1993).

Levrek balıkları, kumlu, çamurlu sığ biyotoplarda ve kıyılara yakın yaşamayı severler. Levrek balıkları sıcaklığa ve tuzluluğa karşı gösterdiği toleransı ile nehir ağızlarında ve lagünlerde de yaşayan bir littoral bölge balığıdır. Tuzluluk değişimlerine karşı oldukça

dayanıklılırlar ve ‰ 90 tuzluluk oranlarına bile dayandıkları kaydedilmiştir. Bu nedenle tatlı sulu göllere ve aşırı tuzlu dalyanlara bile girerek yaşamlarını sürdürürler. Tatlı sularda büyüebilirler, fakat üreyemezler. Bu tür tüm Akdeniz’de görülmekle birlikte, Kuzey Atlantik’ten Kanarya Adaları’na ve İngiltere’nin yukarı sahillerine kadar yayılım gösterir. Ülkemizin bütün denizlerinde bulunmasına rağmen, bu balığın son yıllarda Karadeniz ve Marmara’da avcılığı azalmıştır. Sonbahar ve kış aylarında özellikle littoral bölgede olta, paragat ve gırgır ağıları ile avcılığı yapılmaktadır. Havaların soğuması ile birlikte kışlamak için derin sulara göç ederler. Levrek balığı, karnivor bir tür olup, bazen yalnız bazen de küçük sürüler halinde dolaşır. Doğal ortamda çoğunlukla kendinden daha küçük boydaki balıkları yiyerek gıda ihtiyaçlarını karşılarlar. Kültür ortamında ise ‰ 45-50 protein içeren ekstrude pelet yemlerle beslenirler (Stickney, 2005; Alpbaz, 2005; Memiş, 2010). Levrek balıkları 5-28 °C arası sıcaklıklarda yaşarlar. 11-14°C su sıcaklığında yılın en kısa ve en soğuk aylarında yumurta bırakmaktadırlar. Yaşamlarını sürdürebilmeleri için ideal oksijen miktarları 4.5-8 mg/l’tir. Dalgalı sularda yaşamayı severler. Fazla bulanık ve kirli sularda genel olarak görülmezler (Akşiray, 1987; Moretti ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005).

Akdeniz bölgesindeki levrekler, Atlantik kıyılarındakilere oranla daha genç yaşta ve küçük boyda cinsel erginliğe ulaşırlar. Levrek balıkları Akdeniz’de Ocak-Mart ayları arasında yumurta bırakırlar. Dişilerin erkeklere göre daha hızlı geliştiğı saptanmıştır. Optimum büyüme sıcaklığı 20-25°C arasındadır (Moretti ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005; Memiş, 2010). Üreme organı dişi ve erkek balıklarda ayrı gelişme gösterir. Genellikle erkeklerin gonadlarının genital bir açıklıkla, dişilerin ise gonadlarının genital bir çıkıntı ile dışarı açılması ayırıcı bir özelliktir (Barnabe, 1990; Moretti ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005, Memiş, 2010). Levrek balıklarının gelişmesi üzerine yapılan bir çalışmada yumurtadan çıkış uzunlukları 3,8 mm olduğu saptanmıştır. 30 mm. boyda larvalarda metamorfoz tamamlanır ve bu boyda ebeveynlerine benzemeye başlarlar (Barnabe, 1990; Moretti ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005).

Levrek balığı yetiştiriciliğine ilk olarak Fransa’da Barnabe (1972) tarafından başlatılmış ve levrek balıklarına hormon müdahalesi ile yumurtlamanın kontrol altına alınabileceğı rapor edilmiştir (Barnabe, 1990; Moretti ve diğ., 1999). Sonrasında levrek balıkları başarılı bir şekilde yumurtadan itibaren yavru balık haline gelinceye kadar

yetiştirilmiştir. Günümüzde ise Akdeniz bölgesi ülkelerinde yumurtadan pazar boyuna kadar geniş bir endüstri kolu haline gelmiştir (Barnabe, 1990; Moretti ve diğ., 1999; Stickney, 2005; Thompson ve diğ., 2006). Ülkemizde önceleri çipura balığının besiyeye alınması ve daha sonrada larva üretimine geçilmesinin ardından, levrek larvalarının kültür çalışmalarında yoğun artışlar gözlenmiştir. Su ürünleri yetiştirme teknolojisinin gelişimi ile beraber levrek kültürü üzerindeki çalışmalar ülkemizde 1985 yılında başlamış ve günümüzde çok başarılı uygulama sonuçlarına ulaşılmıştır (Alpbaz, 2005; Stickney, 2005; Thompson ve diğ., 2006). Yıllık 35 ton ile başlayan deniz balıkları üretimimiz 2012 yılında 100.000 tona yaklaşmıştır ve bunun 65.512 tonunu levrek balığı üretimi oluşturmaktadır (TUIK, 2013).

Levrek balığı üretiminde sağlanan bu gelişim yeni türlerin akuakültürüne de öncülük etmiştir. Deniz balığı yetiştiriciliği alabalık (*O. mykiss*) yetiştiriciliğine göre zorluklarının çok olmasına rağmen ülkemizin Ege Denizi kıyılarının türün yetiştiriciliğine uygun özelliklere sahip olması ve üretimin büyük bir kısmının Avrupa ülkelerine ihraç edilmesi ile önemli bir maddi kazanç sağlanması gibi avantajlar bu gelişimi hızlandırmıştır (Çelikkale ve diğ., 1999; Fırat ve Saka, 2003; Okumuş ve Deniz, 2007). Çevre Bakanlığı'nın 24 Ocak 2007 tarih ve 26413 sayılı resmi gazetede yayımlanan istihsal alanlarını tanımlayan tebliğ nedeni ile artık günümüzde deniz balığı yetiştiriciliği açık sulardaki kafeslerde yapılmaktadır. Son yıllarda ise su ürünleri yetiştiriciliği yapılacak alanların kıyıda en az 1 mil açıkta ve en az 30 metre derinlikteki sularda yapılabilmesi zorunluluğu nedeniyle üretimdeki bu hız yavaşlamış olsa da geçiş döneminin tamamlanmasının ardından 2012 yılında üretim miktarımız yeniden artış göstermeye başlamıştır (Memiş, 2010).

2.2 LEVREK BALIKLARINDA GÖRÜLEN BAKTERİYEL HASTALIKLAR

Akuakültür sektöründe kontrollü yetiştiricilik yapılmaya başlanması ve kültür çalışmalarının artmasına bağlı olarak hastalıklardan kaynaklanan önemli ekonomik kayıplar gözlenmektedir. Günümüze kadar balıklarda enfeksiyöz hastalıklara neden olan birçok patojen bakteri tespit edilmiştir ve bunların deniz balıklarında ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Le Bretton, 1999; Colorni, 2004; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2012). Daha önceki araştırmacıların belirttiği gibi levrek

balıklarında hastalık yapan bakteriler çoğunlukla *Vibrio* (Tanrikul ve diğ., 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008), *Pasteurella* (Korun ve Timur, 2005; Avsever ve diğ., 2012; Avcı ve diğ., 2013) *Aeromonas* (Doukas ve diğ., 1998; Avsever ve diğ., 2012), *Pseudomonas* (Berthe ve diğ., 1995) ve *Mycobacterium* (Korun ve diğ., 2005) genuslarına dahildir. Ayrıca levrek balıklarında Rickettsia-benzeri organizmalar (Timur ve diğ., 2005; Timur ve diğ., 2013) yanı sıra Gram-pozitif karakterdeki bakterilerden Streptokok enfeksiyonları da bildirilmiştir (Colomi ve diğ., 2002).

Denizde kültürü yapılan levrek balıklarında vibriosis ilk olarak Breuil ve Haffner tarafından (1989) Güney Fransa’da bildirilmiştir. Çeşitli *Vibrio* türlerinden kaynaklanan vibriosis özellikle perakut, akut veya kronik olarak hemorajik septisemi ile seyreden bir hastalıktır (Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). İlk olarak Bergman tarafından 1909 yılında yılan balıklarında (*Anguilla anguilla*) saptanan *Vibrio (Listonella) anguillarum* bu hastalığın başlıca patojenidir (Actis ve diğ., 1999). Ülkemizde ise kültür levrek balıklarında vibriosis'e neden olan *Vibrio* türleri arasında *V. anguillarum* (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1996; Akan ve diğ., 1996; Korun, 2004; Demircan, 2004; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008, Güralp, 2012; Aydın, 2012) yanı sıra *Vibrio ordalii* (Çağırğan, 1993; Timur ve diğ., 2007), *V. harveyi* (Korun ve Akaylı, 2004; Korun ve Timur, 2008, Güralp, 2012), *V. alginolyticus* (Korun, 2008) ve *V. splendidus* (Güralp, 2012) çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Pasteurellosis ilk defa 1963 yılında Amerika’nın doğu kıyılarındaki beyaz levrek (*Morone americanus*) ve çizgili levrek (*M. saxatilis*) balıklarında yoğun olarak ölümlere neden olmuştur (Snieszko ve diğ., 1964; Janssen ve Surgalla, 1968). Doğadaki ve kültür deniz balıklarında görülen bu hastalığın etkeni *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (sin. *Pasteurella piscicida*)’dır. Bu patojen bakteri hasta çipura, levrek, çizgili levrek, sarı kuyruk (*Seriola quinqueradiata*) ve dil (*Solea solea*, L. 1758) balıklarında bildirilmiştir (Toranzo ve diğ., 2005). Ülkemizde pasteurellosis Timur ve diğ. (1999) tarafından Yalova’daki bir kamu işletmesinde kültürü yapılan dokuz aylık levrek balıklarında *Ichthyophonus hoferi* ile birlikte karma enfeksiyon şeklinde ölümlere neden olduğu; Kuzey Ege denizinde yetiştirilen levrek balıklarında Candan ve diğ. (1996)

tarafından, daha sonra da Ege denizinde yetiştirilen levrek balıklarında düşük su sıcaklığında Korun ve Timur (2005) tarafından bildirilmiştir. Ülkemizde son yıllara gelindiğinde Ege bölgesindeki kültürü yapılan levrek ve çipura balıklarından pasteurellosisin görülmeye devam ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (Avsever ve diğ., 2012; Avcı ve diğ., 2013).

Mycobacteriosis, balıklarda değişik formlarda görülen bakteriyel bir hastalıktır (Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2012). Bu hastalığın başlıca patojeni olan *Mycobacterium marinum* günümüze kadar Yunanistan ve İtalya olmak üzere Akdeniz’de kültürü yapılan levrek balıklarında ve Kızıldeniz’deki İsrail kıyılarında kültürü yapılan levrek balıklarında rapor edilmiştir (Colorni, 1992; Colorni ve diğ., 1993, 1996; Diamant ve diğ., 2000; Sechi ve diğ., 2002; Ucko ve diğ., 2002). Yurdumuzdaki kültür balıklarında *Mycobacterium marinum* sadece bir deniz işletmesindeki kültür levrek balıklarının viseral organlarının histolojik kesitlerinde karakteristik granulomalar içinde asit fast boyalarla boyanan çomak şekilli bakterilerin bulunduğu Korun ve diğ. (2005) tarafından bildirilmiştir.

Rickettsia-benzeri organizmalar levrek balıklarında ilk olarak 1994 yılında Güney Fransa’da 30-70 g ağırlığa sahip anormal yüzme hareketi gösteren ölmek üzere olan juvenil hasta balıklarda % 20 oranında mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir (Comps ve diğ., 1996). Daha sonra Yunanistan’dan Athanassopoulou ve diğ. (1999) tarafından bildirilmiş olup, Steiropoulos ve diğ. (2002) yaptıkları immünohistokimyasal çalışmalarla levrek balıklarından izole edilen *Rickettsia* benzeri organizmayla *P. salmonis* arasındaki antijenik benzerlikleri çalışmışlardır. Ülkemizde ise ilk olarak 2003 yılında Karadeniz kıyılarında yüzer kafeslerde yetiştiriciliği yapılan levrek balıklarında *Listonella (Vibrio) anguillarum* veya *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* birlikte karma enfeksiyon olarak bu hastalık bildirilmiş (Timur ve diğ., 2005) olup daha sonra Ege Denizi’nde kültür levrek balıklarında da yoğun ölümlere yol açtığı Timur ve diğ. (2013) tarafından bildirilmiştir.

Streptokokkozis doğadaki çeşitli balıklarda ve kültür balıklarında yaygın bir şekilde görülen önemli bir hastalıktır (Romalde ve Toranzo 1999; 2002). Balıklarda görülen streptokok enfeksiyonlarının ana etiyolojik etkenlerinden biri olan *S. iniae*’nin Akdeniz’de ve Kızıldeniz’de İsrail kıyılarında kültürü yapılan levrek balıklarında

hastalığa neden olduğu ilk olarak Colorni ve diğ. (2002) tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde ise levrek balıklarında streptokokkozisin görüldüğüne dair herhangi bir rapor mevcut değildir.

Ayrıca ülkemizde levrek yetiştiriciliğinde günümüze kadar rapor edilen enfeksiyöz bakteriyel hastalık patojenleri arasında; *Aeromonas hydrophila* (Şahrikoğlu ve Candan, 2002), atipik *Aeromonas* enfeksiyonuna neden olan *Aeromonas salmonicida* (Karataş ve diğ., 2005; Timur ve diğ., 2007), *Shewanella putrefaciens* (Korun ve diğ., 2009), *Tenacibaculum maritimum* (Türk, 2006; Timur ve diğ., 2007; Şen, 2007; Yardımcı, 2011) ve *Pseudoalteromonas sp.* (Güralp, 2012) tarafından bildirilmiştir.

2.3. VİBRİOSİS

Balık yetiştiriciliğini etkileyen ve üretimde büyük kayıplara yol açan en önemli bakteriyel hastalık vibriosisdir (Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2012). Vibriosis, deniz ve acı su balıklarında çok sık görülen, *Vibrio* cinsi bakterilerin neden olduğu önemli hastalıklardan biridir (Buller, 2004; Colwell, 2006; Noga, 2010; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Deniz ve acı suda yaşayan balık türlerinin en önemli ve iyi bilinen bu bakteriyel hastalık birçok literatürde *red pest*, *red disease*, *pestis rubia anguillarum*, *erysipelosis anguillarum*, *cod pest*, *eye disease*, *ulcer disease*, *bakteriyel dermatitis* veya tuzlu su furunkulozisi gibi farklı isimlerle ifade edilmiştir (Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). Zaman içinde Listonellozis ismi kabul edilmesine rağmen (McDonnell ve Colwell, 1985) birçok araştırmacı *Vibrio* türü bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tanımlamak ve ortak bir isim vermek için bu hastalığın ismini Vibriosis olarak kullanmaya devam etmektedir (Reed ve Francis-Floyd, 1996; LeBretton, 1999; Woo ve Bruno, 1999; Timur ve Timur, 2003; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012).

Vibrionaceae familyası üyeleri özellikle denizel ortamın en baskın bakteriyel gruplarından birini oluşturur ve denizel ekosistemi oluşturan bakteriyel populasyonun önemli bir kısmını teşkil eder (Simidu ve Tsukamoto, 1985; Thompson ve diğ., 2006). Bu familya balıklarda hastalıklara neden olan *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* ve *Photobacterium* gibi genusları içermektedir (Austin ve Lee, 1992; Austin ve Austin, 2012). *Vibrio* genusunun üyeleri, Gram-negatif, hareketli, düz veya kıvrık çomaklar

olup, genellikle kapsülsüz, sporsuz ve polar flagellalar aracılığı ile hareket eden bakterilerden oluşmaktadır (Bolinches ve diğ., 1986; Thompson ve diğ., 2006; Noguerola ve Blanch, 2008). Aerobik veya fakültatif anaerobik olan *Vibrio*'lar karbonhidratları fermente ederek asit oluştururlar, fakat gaz oluşturmazlar. 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine phosphate (O/129) vibriostat testine hassastırlar, bu madde üremelerini engeller. TCBS agar, diğer bakterilerin üremesine engel olan ve patojenik *Vibrio*'ların üremesini sağlayan seçici besiyeri olarak kullanılır (Timur ve Timur, 2003; Buller, 2004; Thompson ve diğ., 2006; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). 20°C'de 48 saat sonunda düz, konveks, krem renkli koloniler oluştururlar. Bu bakteriler katalaz, sitrat ve indol testlerinde pozitif sonuç verirler, jelatini eritirler, lizin ve ornitrini dekarboksile ederler, H₂S testinde negatif sonuç verirler ve üreaz üretmezler (Inglis ve diğ., 1993; Thompson ve diğ., 2006).

Kültür balıklarında yaygın olarak görülen, Vibrionaceae familyasından olan vibriosise neden olan *Vibrio* türü *Vibrio anguillarum*'dur (Muroga, 1975; Toranzo ve diğ., 2005; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012). Avrupa bölgesindeki balıklarda hastalık çıkışı başladıktan sonra dünyanın çeşitli bölgelerinde 48 farklı türde hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Pacha ve Kien, 1969; Thompson ve diğ., 2006; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). Farklı *Vibrio* türlerinin her yaştaki çipura ve levrek balıklarında hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Paperna ve diğ., 1981). *V. anguillarum*'un yanı sıra diğer *Vibrio* cinsi üyelerinden, olan *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida*, *V. damsela* (*Photobacterium damsela*), *V. carchariae* (*V. harveyi*), *V. tubiashii*, *V. marinus*, *V. campbellii*, *V. nereis*, *V. paraheamolyticus*, *V. viscosus* (*Moritella viscosa*), *V. cholerae* non-O1, *V. fischeri*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. ichthyenteri*, *V. logei*, *V. ordalii*, *V. tapetis*, *V. wodanis*, *V. splendidus* ve *V. pelagius* balıklardaki ve kabuklu su ürünleri epizootiklerinden izole edilmiştir (Actis ve diğ., 1999; Timur ve Timur, 2003; Buller, 2004; Noga, 2010; Austin ve Austin, 2012). Günümüzde bu türlerin yanı sıra *V. scophthalmi* ve *V. logei* gibi farklı *Vibrio* türleri de izole edilmiştir (Le Bretton, 1999; Çanak, 2011; Güralp, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Vibriosis hastalığında balık eksternal olarak diğer Gram-negatif bakterilerin neden olduğu infeksiyonlarla benzerlik gösterir ve enfekte balık yem almaz, rengi koyulaşır, genel olarak solungaçlarda ve vücut yüzeyinde solgunluk, pullarda dökülme ve yüzgeçlerde erime, yüzgeç diplerinde hemoraji, ventral abdomen duvarında peteşiyal hemoraji, rektumda kızarıklık ve şişkinlik ve bazende prolapsus tipik dış bulgulardır. Perakut vakalarda, periorbital yada abdominal ödem dışında balıkta herhangi bir dış bulgu görülmeyebilir. Akut vakalarda ise tipik kas içinde peteşiyal hemorajiler ve furunkulozis benzeri geniş kırmızı açık ülseratif lezyonlar gözlenirken (Timur ve Timur, 2003; Demircan, 2004; Aydın, 2012; Güralp, 2012; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012), kronik vakalarda ise kaslara kadar inen derin lezyonlar ve ülserler gelişir, solungaçların solgun ve anemik olduğu, gözlerde korneada opaklaşma ve ülserizasyon bildirilmiştir (Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012).

İnternal olarak peritonda, hava kesesinde, viseral organlar üzerinde ve abdominal yağ tabakasında eritem ve peteşiler, bağırsak cidarında incelme, hemoraji ve sıvı birikimi (ascites), dalağın ise vişne kırmızısı veya solgun renkte, nekrotik olduğu, dalak ve karaciğer solgun gri, gri-kahverengi veya gri-sarı renkte bildirilmiştir (Candan 1991; Çağırğan, 1993; Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999; LeBretton, 1999; Demircan, 2004; Aydın, 2012; Güralp, 2012; Austin ve Austin, 2012).

2.4. *Vibrio anguillarum*

Vibriose neden olan *V. anguillarum* ilk kez Bergman tarafından 1909 yılında Baltık denizindeki hasta yılan balıklarının patojeni olarak bildirilmiştir. Bu bildirimden önce, Canestrini (1893), 1817 yılından beri göç eden yılan balıklarında (*Anguilla vulgaris*) görülen epizootikleri tanımlayarak bakterinin adını *Bacillus anguillarum* olarak bildirmiş ve hastalığın patolojisi yanı sıra bakterinin karakteristik özelliklerinin aynı olduğunu bildirmiştir. Epizootiklerin, daha sonraki yıllarda Atlantik kıyıları ve Pasifik bölgelerinde bulunan çeşitli ülkelerdeki 50'ye yakın tatlı ve tuzlu su balık türünü etkilediği rapor edilmiş (Pacha ve Kien, 1969; Anderson ve Conroy, 1970; Thompson ve diğ., 2006; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012) ve özellikle salmonid balıkların denizel kültürlerinde daha yıkıcı olmuştur (Timur ve Korun, 2004; Timur ve diğ., 2007).

Genel olarak *V. anguillarum* enfeksiyonunda sırtta yakın bölgede hemoraji, pullarda dökülme, yüzgeçlerde erime, derinin renginde koyulaşma, vücut yüzeyinde ülserlerin gelişmesi ve ölümler gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca hasta balıkların iç organlarında hemoraji ve dalakta büyüme de gözlenmiştir (Paperna ve diğ., 1977, 1981; Demircan, 2004; Korun, 2004; Hijeltnes ve Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

V. anguillarum polar flagella ile hareket eden Gram-negatif, kıvrık basil şeklinde ve fakültatif anaerob bir bakteridir. Bu bakteri % 1,5 NaCl içeren TSA besiyerinde 22-25 °C'de 24-48 saatlik inkübasyon sonunda katı besiyeri üzerinde yuvarlak ve krem renkli koloniler oluşturur (Noguerola ve Blanch, 2008; Austin ve Austin, 2012). Etken halofilik özelliğe sahip olduğu için farklı tuzlulukta yaşarlar. Hoff (1989) yılındaki çalışmasıyla bu bakterinin 50 aydan fazla deniz suyunda yaşadığını göstermiştir (Austin ve Austin, 2012). *V. anguillarum* için *Beneckea anguillara* biyotip I (Bauman ve diğ., 1978), veya *Listonella anguillarum* (McDonnell ve Colwell, 1985) gibi farklı isimler kullanılmışsa da günümüzde yaygın olarak *V. anguillarum* kullanılmaktadır (Thompson ve diğ., 2006; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012).

Vibriosisin en önemli etiyolojik ajanı olan *V. anguillarum*'un tür içinde heterojenite sergilediği ve iki farklı biyotipinin olduğunu bildirilmiş fakat daha sonrasındaki çalışmalarda ise *V. anguillarum*'un biyotiplerinin kültürel, biyokimyasal özellikleri ve DNA yapılarına göre *V. anguillarum*'un biyotip 1 yanısıra daha sonra *Vibrio ordalii* olarak adlandırılan *V. anguillarum* biyotip 2 olarak ayırımı yapılmıştır (Myhr ve diğ., 1991; Knappskog ve diğ., 1993; Larsen ve diğ., 1994). Günümüzde bu bakterinin 23 adet farklı serotipinin olduğu bildirilmektedir (Toranzo ve Barja 1990; Toranzo ve diğ., 1997; Pedersen ve diğ., 1999; Buchholtz ve diğ., 2006; Silva-Rubio ve diğ., 2008). *Vibrio anguillarum*'un çeşitli serotipleri balıklarda tanımlanmış fakat bu serotiplerden O1, O2 ve O3'ün daha çok kültür balıklarında patojen olduğu rapor edilmiştir (Larsen ve diğ., 1994).

V. anguillarum serotip O1 başlıca salmonid balıkların ve kalkan balıklarının (*Psetta maxima*) patojeni, serotip O2 ise salmonid balıkların ve deniz balıklarının yaygın patojeni olarak bildirilmiştir (Myhr ve diğ., 1991; Knappskog ve diğ., 1993; Larsen ve diğ., 1994). *Vibrio anguillarum* serotip O2'nin O2a ve O2b (Knappskog ve diğ., 1993) veya O2 α ve O2 β (Boliches ve diğ., 1990) olmak üzere iki farklı serotipi

tanımlanmıştır. Bu alt serotiplerin belirlenmesinde bakterilere ait lipopolisakkarit (LPS) yapılarındaki farklılıklar baz alınmıştır. Serotip O2a salmonid balıklarda ve deniz balıklarında O2b ise daha çok salmonid olmayan balıklarda bildirilmiştir (Knappskog ve diğ., 1993; Larsen ve diğ., 1994). Dünya çapında bu serotiplere ek olarak özellikle morina balığı ve salmonid türü balıklarda *V. anguillarum* serotip O3'te bildirilmiştir (Noga, 2010). Yurdumuzdaki kültür balıklarından olan levrek balıklarında çoğunlukla serotip O1 (Tanrıkul ve diğ., 2004), çipura balıklarında O1 (Çanak, 2011), gökkuşağı alabalıklarında serotip O1 ve O2'nin enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Tanrıkul, 2007).

2.5. *Vibrio anguillarum*' UN İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER

2.5.1. Bakteriyolojik Yöntemler

Diğer bakteriyel hastalıklarda olduğu gibi hasta balıklardan *Vibrio anguillarum*'un kısa sürede identifikasyonu yapılarak ve ölümleri kontrol altına almak için acilen hastalığın tedavisine geçilmelidir. Bunun için öncelikle patojen bakterinin rutin laboratuvar teknikleri ve API hızlı tanı kitleri ile izolasyonu ve identifikasyonu yapılmaktadır (Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999; Noguerola ve Blanch, 2008). Biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinin tespiti için izole edilen patojen bakteriler için Gram boyama, hareket testi (asıllı damla metodu), sitokrom oksidaz, katalaz, O/F, Vibriostatik ajan O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine phosphate)'a hassasiyeti, nitrat indirgenmesi, ONPG (Ortho Nitrophenyl-βD-Galactopyranosidace) testi, mannitol, sorbitol, sakkaroz ve arabinoz gibi farklı karbonhidratlardan asit üretimi, lizin ve ornitrin dekarboksilaz ve arjinin dihidrolaz testleri, indol üretimi, MR (Metil Red), VP (Voges-Proeskeur), % 0,5 ve % 7 NaCl içeren besiyerinde üreme, 37°C'de üreme deneyleri, TCBS ve VAM (*Vibrio anguillarum Medium*) gibi seçici besiyerlerinde üreme özellikleri incelenmektedir (Alsina ve diğ., 1994; Actis ve diğ., 1999; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2012).

Günümüzde *Vibrio anguillarum*'un teşhisinde bu mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra moleküler, serolojik, histopatolojik ve immunohistokimyasal teknikler kullanılmaktadır (Gildberg ve Mikkesen, 1998; Engelsen ve diğ., 2008; Avcı ve diğ., 2012; Austin ve Austin, 2012).

2.5.2. Moleküler Yöntemler

Son yıllarda *Vibrio anguillarum*'un genetik identifikasyonu; spesifik DNA melezlemesi ve radyoaktif madde ile işaretli sentetik oligonükleotidler içeren spesifik probalar kullanılarak 16S rRNA dizi analizi ile yapılmıştır. *Vibrio anguillarum* DNA'sı ile melezlemesinde kullanılan probalar başka bakteri türleri ile çapraz melezleme göstermediği ve bu deney için kullanılan problemlerin spesifik olduğu bildirilmiştir (Picado ve diğ., 1994). Birçok biyokimyasal ve immunolojik yöntemde, balıktan bakterinin izolasyonuna ve kültürüne ihtiyaç duyulur iken melezleme tekniğinde saf kültüre gerek olmaması bu tekniğin son yıllarda kullanımını arttırmıştır (Actis ve diğ., 1999). Hemolizin geni, angE geni ve 16S rRNA genleri *V. anguillarum*'un PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile tanısında kullanılmıştır. Ayrıca Gonzales ve diğ., (2003) PCR yöntemini kullanarak *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genini çoğaltarak, balık doku ve kan örneklerinden bakterinin moleküler yöntemle tanısını yapmışlardır (Wiik ve diğ., 1995; Hirono ve diğ., 1996; Gonzales ve diğ., 2003; Liu ve diğ., 2004). *RpoN* geni, nitrojen tutmada, dekarboksilik asit taşınmasında, toluen ve ksilen katabolizmasında ve hidrojenaz biyosentezinde görevli genlerin transkripsiyonundan sorumlu olan ve bu genlerin anlatım yapabilmesi için bulunması zorunlu olan bakterilerdeki RNA polimeraz sigma faktörü σ_{54} 'ünü kodlamaktadır (Merrick, 1993).

2.5.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Amerika Birleşik Devletlerindeki Cetus firması araştırmacısı olan Kary Mullis tarafından 1985 yılında geliştirilen 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) yani polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi, *in vitro* koşullarda özgün bir DNA dizisinin veya istenilen bir genin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA (rDNA) yöntemleri ile DNA klonlamasına ek olarak kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler tekniklerden PCR yöntemi, balık patojenlerinin tanısında da besiyerinde kültürü zor olan bakterilerin teşhisine olanak sağladığından uzun zamandır kullanılmaktadır (Hiney ve Smith, 1998). Hızlı sonuç vermesi, biyokimyasal analiz sonuçları birbirine çok benzeyen ve aynı tür oldukları sanılan suşların aslında farklı türler olduğunun ayırt edilebilecek kadar hassas olması nedeniyle PCR yöntemi kullanılmaktadır (Nielsen ve diğ., 2001). Bunun yanı sıra her türün kendine has nükleik asit dizisinin olması nedeniyle bu yöntem güvenilmektedir (Cunningham, 2002; Arı, 2004).

PCR yöntemiyle bir çift oligonükleotid primer ve DNA polimeraz enzimi yardımıyla, DNA dizisinin spesifik bir bölgesinin *in vitro* koşullarda çoğaltılması sağlanmaktadır (Newton ve Graham, 1994; Cunningham, 2002; Arı, 2004). Sıcaklığa dayanıklı *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazın bulunması ve sentetik döngülerin, DNA Polimeraz I'nin Klenow parçası (DNA nükleotit dizilerinin bulunmasında kullanılan polimeraz ve ekzonükleaz faaliyetlerine sahip DNA polimeraz I enziminin parçası, Klenow fragmenti) sayesinde yapılması ile bu teknolojinin gelişimi hız kazanmıştır (Sorscher, 1997; Temizkan ve Arda, 2008; Austin ve Austin, 2012). DNA polimeraz ile hedef DNA molekülünün kopyalanması için tipik bir PCR'da 25-35 adet yapay döngü yapılır. Her döngü ürünü, polimeraz aktivitesinin bir sonraki adımı için yeni kalıplar oluşturur. Doğal hücre bölünmesinde kopyalama sürecini tekrar eden PCR, yaklaşık 30 döngü sonrasında DNA dizisinin milyar katını kopyalamış olur (Sorscher, 1997; Arı, 2004). PCR'in içeriği; ısıya dayanıklı DNA polimeraz, gene özgü ileri ve geri primerler, deoksinükleotid trifosfatların her biri, reaksiyon tamponu ve genomik DNA veya hücre lizatından oluşmaktadır. Zincir reaksiyonu 3 aşamadaki üç farklı sıcaklıkta inkübasyon ile gerçekleşir. Bunlardan ilki olan denatürasyon aşamasında; istenen geni içeren DNA'yı denatüre etmek için 90-95°C'de 1 dakika, ikinci aşama olan primerlerin bağlanması aşamasında; tek iplikli kalıba 55-65°C'de 1 dakikada primerlerin bağlanması ve son aşama olan uzama aşaması olan polimerizasyon reaksiyonu 72°C'de 2 dakikada gerçekleşir. Her başarılı döngü sonrası kopya sayısı 2 katına çıkan bu inkübasyonlar, 25-30 döngü boyunca tekrarlanır. Zincir reaksiyonun 2^n (n = toplam döngü sayısı) şeklinde artış meydana gelir (Newton ve Graham, 1994; Sorscher, 1997).

Hirono ve diğ., (1996) PCR yöntemini kullanarak *Vibrio anguillarum*'un hemolizin genini çoğaltmışlar ve bu gen sayesinde patojenin tanısını yapmışlardır. Demircan, (2004) ve Guralp, (2012) hasta levrek balıklarındaki *Vibrio anguillarum*'un genetik tanısında bu yöntemi kullanmışlardır.

rpoN Geni

RNA polimeraz adı verilen enzim tarafından katalizlenen RNA sentezi diğer adıyla (transkripsiyon), DNA'daki bilgilerin RNA halinde kopyasının çıkarılmasına denir. RNA polimeraz enzimi genellikle α , β , β' , σ alt birimlerinden meydana gelmiştir. Bu alt birimler, RNA polimerazın aktif formu olan holoenzimin çekirdeğini (esas enzim)

oluşturur. σ faktörü alt birimlerden en iyi şekilde tanımlanmış olanıdır ve enzim çekirdeğine gevşek şekilde bağlanmıştır. Görevi de transkripsiyonun yapılacağı DNA zincirini ve başlangıç yerini tanıyarak o bölgeye RNA polimerazın bağlanmasını sağlamaktır. Bu alt birim bulunmadığı zamanda, RNA kusurlu RNA ürünleri meydana gelmektedir. Sebebi ise enzim çekirdeği, genin herhangi bir zincirindeki gelişigüzel bir noktaya bağlanarak transkripsiyonu başlatmasından dolayıdır (Merrick, 1989; Temizkan, 1999; Güneş, 2003).

rpoN geni, nitrojen tutmada, dekarboksilik asit taşınmasında, toluen ve ksilen katabolizmasında ve hidrojenaz biyosentezinde görevli genlerin transkripsiyonundan sorumlu olan ve bu genlerin anlatım yapabilmesi için bulunması zorunlu olan bakterilerdeki RNA polimeraz sigma faktörü σ^{54} 'ünü kodlamaktadır (Merrick, 1993).

2.5.3. Serolojik Yöntemler

Vibriosis'e karşı tedavi ve aşılama çalışmaları devam etmesine rağmen, kullanılan antibakteriyel maddelere karşı duyarsızlık ve aşılama başarısızlıklar söz konusudur. Bu nedenle farklı ülkelerden, farklı balık türlerinden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının iyi karakterize edilmesi, serotiplerinin ve virülens mekanizmalarının araştırılması önemlidir. Serotiplendirme, organizmaların alt tür seviyeleri bakımından sınıflandırılmasına izin verir ki buda epidemiyoloji (türler arası karşılaştırma) çalışmalarında da çok önemli bir konudur (Sorensen ve Larsen, 1986; Knappskog ve diğ., 1993).

Mikroorganizmaların antijenik yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanan serotiplerinin belirlenmesinde birçok serolojik teknik kullanılır. İnsan ve veteriner hekimlikle infeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan başlıca serolojik tekniklerden olan aglütinasyon, hemaglütinasyon, presipitasyon, kompleman fiksasyon deneyleri, nötralizasyon ve işaretli reaktiflerin kullanıldığı Floresan antikör tekniği (FAT), Radioimmüno teknik (RIA), Enzim Bağlayıcı İmmunosorbent teknik (ELISA) ve Nokta-leke tekniği (Dot-Blot) gibi serolojik yöntemler 1960'lı yıllardan günümüzde balık hastalıklarının teşhisinde kullanılmaktadır (Anderson, 1974; Toranzo ve diğ., 1987; Arkoosh ve Kaattari, 1990; Adams, 1992; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2012).

2.5.3.1. Aglütinasyon Tekniği

Serumdaki antikorların ortaya çıkarılması için çok kullanılan bir testtir. Bu test kan serumundaki antikorların antijen veya antijen taşıyıcılarıyla birleşerek gözle görülebilir kümeler oluşturmalarını (aglütinasyonu) sağlar. Diğer bir ifadeyle aglütinasyon belirli bir antijen ile ona özgü bir spesifik bir antikor arasında gelişen reaksiyondur (Kimberley ve MacNair, 2004). Uygun bir sıvı ortamda antijenler antikorlarla kompleksler oluşturur ve birbirlerine yapışarak gözle görülebilecek kümeler halinde çökerler (Anderson, 1974; Plumb ve Bowser, 1983; Roberson, 1990; Ağaçfıdan ve Badur, 2002).

Antijene karşı özel olarak geliştirilen ve ticari olarak satılan antikorlar sayesinde aglütinasyon tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır (Kimberley ve MacNair, 2004). Aglutinasyon testi ile identifikasyonun yanı sıra aynı türe ait bakterilerin serotipi de belirlenebilmektedir (Kimberley ve MacNair, 2004). Aglütinasyon tekniğinin lam aglütinasyon, tüp aglütinasyon ve latex aglütinasyon gibi eşitleri de bulunmaktadır (Ellis, 1999).

Günümüze kadar çeşitli aglütinasyon testleri balıklarda bakteriyel hastalıkların teşhisinde, patojen suşların serolojik karşılaştırılmalarında ve patojenlere karşı balık serumlarında antikor aranmasında kullanılmıştır (Krantz ve diğer., 1963; Rabb ve diğer., 1964; Anderson, 1974; Toranzo ve diğer., 1987; Ellis, 1989). Basit, hızlı bir aglütinasyon testi olan lam aglütinasyon, bir damla antiserum ile bir damla antijenin fizyolojik su ile lam üzerinde karıştırılmasıyla yapılır. Lam ve tüp aglütinasyon testleri; farklı araştırmacılar tarafından (Krantz ve diğer., 1963; Rabb ve diğer., 1964) *Aeromonas salmonicida*'ya karşı oluşan antikorların varlığının tespitinde ve furunkulosis'in teşhisinde kullanılmıştır. Küçük miktardaki antikor ile bilinen mevcut bakteriyel balık patojenlerinin büyük çoğunluğunu teşhis etmek mümkündür (Arkoosh ve Kaattari, 1993). Aglütinasyon testinde dengesiz miktarda antijen ve antikor kullanımı yalancı sonuç verebilir. Birçok bakteri genel veya çok yakın antijenlere sahiptir ve bazı antiserumlar bu antijenlere sahip bakterilerle reaksiyona girer ve çapraz reaksiyon oluşturabilir (Anderson, 1974; Toranzo ve diğer., 1987; Arkoosh ve Kaattari, 1993).

Mikroorganizmaların hücre yüzeyindeki antijenlerine bağlı olarak serotiplendirme yapılır ve bakterilerin serotiplendirme çalışmaları sırasında lam aglütinasyon testi kullanılmaktadır (Sorensen ve Larsen, 1986). Serotiplendirme de aynı türe ait bireyler

arasındaki farklılığı ortaya çıkartmak için dış membran proteinleri, virülens faktörler ve lipopolisakkaritler etkilidir (Mandrell ve Zollinger, 1977; Shimada ve diğ., 1994). *V. anguillarum*'un serotiplendirilmesinde Pacha ve Kiehn (1969) aglütinasyon tekniğini kullanarak bu türe ait 3 farklı serotipi tanımlamışlardır.

2.5.3.2. Dot blot Tekniği

Dot-Blot tekniği serolojik bir yöntem olup kuru nitroselüloz membrana gömülü antijenle nitroselüloz membrana damlatılan spesifik antikorun birleşmesi sonucu membranda leke oluşumudur. Nitroselüloz membrana gömülü antijen spesifik antikora bağlanır, özgül antikorun horseradish peroksidazla işaretli ikinci bir antikorla işaretlenmesi ve substratların bağlanması sonucu selüloz membranda mor renk oluşumu pozitif sonucu gösterir (Cipriano ve diğ., 1985; Toranzo ve diğ., 1987; Durmaz, 2001).

Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde ve özellikle bakteriyel patojenlerin serotiplendirilmelerinde kullanılan bir yöntemdir (Cipriano ve diğ., 1985; Avendano Herrera ve diğ., 2004). Farklı araştırmacılar *Vibrio anguillarum*'un serotiplerinin belirlenmesinde Dot-blot tekniğini kullanmışlardır (Cipriano ve diğ. 1985; Sorensen ve Larsen, 1986; Bolinches ve diğ., 1990; Santos ve diğ., 1995; Silva-Rubio ve diğ., 2008). Ayrıca Stevenson ve Daly (1982) *Yersinia ruckeri*'nin, Romalde ve diğ. (2003) *Pseudomonas anguilliseptica*'ın serotiplerinin belirlenmesinde, Douglas-Helders ve diğ., (2001) çiftlik Atlantik salmonlarında solungaç hastalığına neden olan *Paramoeba pemaquindensis*'in saptanmasında da bu testi kullanmışlardır.

2.6 BAKTERİLERDE BİYOFİLM OLUŞUMU

Biyofilm; mikroorganizmaların doğada varlığını sürdürmek için kullandıkları bir yaşam tarzıdır ve bu organizmaların % 65-80'i biyofilm ve enfeksiyon oluşturarak yaşar (O'toole ve diğ., 2000; Allison, 2003). Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelse bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu mikro-ekosistem topluluğu olarak tanımlanmaktadır (Costerton ve diğ., 1995). Biyofilm tabakası bir difüzyon kalkanı ya da moleküler filtre gibi davranarak barındırdığı mikroorganizmaları korur (O'toole ve diğ., 2000; Allison, 2003). Biyofilm bakterileri açlık sınırında yaşar ve yavaş çoğalır, ayrıca çevrelerinde oluşturdukları matriks sayesinde fagositoz, antibiyotik, antikor, toksik madde ve dezenfaktan (O'toole ve diğ., 2000; Lindell, 2012) gibi dış etkenlere dirençlidirler (Pearson ve diğ., 1995;

Hentzer ve diğ., 2004; Defoirdt ve diğ., 2005; Gün ve Ekinci, 2008). Biyofilm hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşimleri sonucunda genetik yapıları örneğin ekstrakromozomal DNA ve direnç plazmidleri değişir (Pearson ve diğ., 1995; Williams ve diğ., 2000; Hentzer ve diğ., 2002; Lee ve diğ., 2003; Defoirdt ve diğ., 2004, 2005).

Biyofilm tabakası için gereken 3 temel eleman yüzey, mikroorganizma ve EPS'dir (O'toole ve diğ., 2000; Hallam, 2001; Allison, 2003). Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen EPS (Ekzosellüler polimerik madde) adı verilen polisakkarit bazlı bir kafestir (Allison, 2003; Lappin-Scott ve Costerton, 2003). Biyofilm tabakasının oluşmasında ilk basamak yüzeye yapışmaktır ve bunu kolaylaştıran hücre dışı yapıları, pH, besin miktarı, sıcaklık da yüzeye yapışmada etkili role sahiptir. Bakteri, sahip olduğu hücre dışı uzantılar ya da saldığı polimerler ile yüzeye sıkıca bağlanır. Bu bağlanma geri dönüşümsüzdür. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokoloniler de büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. Biyofilm tabakasının % 97'si su olması özelliği ile barındırdığı mikroorganizmaları kuruluğa karşı bir derece koruyabilmektedir. Biyofilm tabakası içinde barınan bakteriler, su fazında serbest yüzenlerden sayıca üstündür (Costerton ve diğ., 1995; O'toole ve diğ., 2000; Donlan ve Costerton, 2002; Allison, 2003).

Akuatik patojenlerin virülens mekanizmaları, bakterilerdeki hücreler arası iletişimi sağlamakla görevli çevreyi algılama sistemi (Quorum sensing) tarafından kontrol edilmektedir ve bu algılama sistemi biyofilm oluşturan bakterilerde çok gelişmiştir (O'Toole ve diğ., 2000; Allison, 2003). Özellikle iki gen ürünü bakteriyel iletişimi sağlayan sistemi oluşturmaktadır. Bunlardan *luxI* homolog tarafından kodlanan sinyal üretici, diğeri *luxR* homolog tarafından kodlanan hücre yoğunluğuna bağlı transkripsiyonel aktivatördür. *luxI* ve *luxR*, denizel bakteri olan *Vibrio fischeri*'nin lüminens genlerini düzenlediği (Fugua ve diğ., 1994) ve *Acyl*-homoserine lactones (AHLs) ise Gram-negatif bakterilerin hücreler arası iletişimde haberleşmek için kullandığı sinyal molekülüdür (Pearson ve diğ., 1994; O'Toole ve diğ., 2000; Allison, 2003). Bakterilerin virülens faktörünü üretmek için kullandıkları bu sinyal molekülü ile patojeniteye katkıda bulunan biyofilm oluşumu, oksidatif strese karşı direnç ve proteazlar, hemolizin, tip 3 salgı sistemi, hücre dışı toksinler ve siderofor gibi bir seri virülens faktörü üretirler. Bakterilerin yeterli çoğunluğa ulaştıkları zaman bu sinyal

molekülleri devreye girerek kritik gen ekspresyonları tetikler. Hücreden hücreye oluşan sinyal sistemi (Quorum sensing) ile bakteri tehlikede olduğunu anlayınca mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına alır (O'Toole ve diğ., 2000; Allison, 2003; Defoirdt ve diğ., 2005)

Farklı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarla biofilmlerin *Vibrio* türlerinin hayatta kalma, virülens ve stres direncinde önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve diğ., 2003; Defoirdt ve diğ., 2005; You ve diğ., 2007; Abdallah ve diğ., 2009). Wang ve diğ., (2003) *V. anguillarum*'un hücre dışı membran proteinlerinin (OMP) biyofilm oluşumunu sınırlayan bir role sahip olduğunu belirtirken, You ve diğ., (2007) çevre etkileşiminin aynı bakterinin biyofilm oluşumunda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bakterinin sıvı ortamın yüzeyinde (sıvı-hava surface) yapışarak oluşturduğu pelikül oluşumu ve *V. anguillarum*'un serotiplendirilmesinde bakterinin sıvı ortamında pelikül oluşturması da ayırt edici bir özelliktir (Olsen ve Larsen, 1990; Knapsskog ve diğ., 1993). Ancak yurdumuzda bu bakterilerle biyofilm oluşumu ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Örnekleme Yapılan İşletmeler ve Hasta Balık Örneklerinin Temini

Çalışmada kullanılan hasta levrek balıkları 2011 yılının Ağustos ayında Muğla iline bağlı Bodrum ve Milas ilçelerindeki iki adet (A ve B işletmesi) farklı deniz balığı işletmesinden elde edilmiştir. Örneklemeden önce işletme sahipleri ile irtibata geçilmiş ve hastalık ihbarının ardından işletmelere gidilerek hastalıkla ilgili anemnez bilgileri alınmıştır. Ortalama deniz suyu sıcaklığı 26 °C olan bu işletmelerden, gözle görülür şekilde hastalık belirtisi gösteren, boyları 17-22 cm ve ağırlıkları 150-200 gr. arasında olan 8 adet hasta levrek balıklarından örnekleme yapılmıştır.

3.1.2. Çalışmanın Gerçekleştirildiği Kurum ve Kuruluşlar

Bakteri izolatlarının identifikasyonu için gerekli olan bakteriyolojik çalışmalar, Dot-blot ve biofilm testleri İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalına ait Mikrobiyoloji Laboratuvarında ve İspanya'daki Santiago de Compostela Üniversitesi (USC) Biyoloji fakültesine ait Akuakültür Enstitüsü'nde bulunan Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile ilgili yapılan uygulamalar ise İspanya'daki adı geçen Üniversiteye ait laboratuvarlarda yürütülmüştür.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kontrol Bakterileri ve Antikorlar

Bu çalışmada İspanya'da bulunan Santiago De Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü İhtiyopatoloji grubunun kültür koleksiyonlarında bulunan ve daha önceki çalışmalardaki kültür kalkan (*Psetta maximus*) balıklarından izole edilen *V. anguillarum*'un O1 serotipine ait R82 kodlu bakterisi ve İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan kültür çipura balıklarından Çanak (2011) tarafından izole edilen 1, 2 ve 3 no'lu *V. anguillarum* izolatları pozitif kontrol bakterisi olarak çalışmaya dâhil edilmiştir.

Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum* izolatlarının serotiplerini belirlemek amacıyla yürütülen aglütinasyon testinde kullanılmak üzere İspanya'dan temin edilen *V. anguillarum*'un serotip O1, O2 ve O3 suşlarına karşı geliştirilmiş poliklonal tavşan antiserumları tercih edilmiştir. Dot-Blot testinde ise R82 kodlu *V. anguillarum*'un O1 suşuna karşı geliştirilmiş poliklonal tavşan antiserumu ve keçi de üretilmiş Goat Anti-Rabbit Fosfata Alkaline IgG (H-L)-AP (BIO-RAD 170-6518) konjugatı antikor olarak kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Kitler

Bakteriyolojik örnekleme ve izolatların identifikasyonunda; Triptik Soy Agar (Pronadisa CM131), Kanlı Agar (Oxoid PB5039A), O/F Basal Medium (Difco 268820), Sodyum Klorür (Sigma-Aldrich 31434-5KG-R), Agar (Panreac 402303.1210), Arjinin (Sigma-Aldrich A-5131), Lizin (Sigma 25626), Ornitrin (Sigma O-2375), Dekarboksilaz Base Moller (Difco 289020), Bacto Pancreatic Digestion of Casein Tryptone (BD 211705), Yeast extract (maya özütü) (Himedia RM027), Meat Extract (Panreac 403692), Baktopepton (Difco, 0118-018), Potasyum Nitrat (Probus, 56546), MR/VP Medium (Panreac, 413786), Jelatin (OXOID L8), Nişasta (Merck, 1.01252.0250), Marine Agar (Difco 212185), Eskulin (% 0.1) (Merck 1.00840025), Potasyum di-Hidrojen Fosfat (KH₂PO₄) (Panreac 131509), Disodyum Fosfat (Panreac 131679), Maya Özütü (Panreac 403687), Üre (Sigma U-5378), Fenol Red (Biochrom AG L2203), Simmons Sitrat Agar (Panreac 413811), Arabinoz (Difco 215920), Sakkaroz (Biolife 412503), Maltoz (Difco 216830), Mannoz (Sigma M-4625), Mannitol (Sigma-Aldrich M4125-5006), Sorbitol (Merck 7758), Inositol (Sigma I-5125), Laktoz (Difco 215620), Amyglidalin (Sigma A60050256), Melibiyoz (Sigma M5500-5G) gibi besiyerleri kullanılırken, TCBS Medium (OXOID CM0333) ve *V. anguillarum* Medium (VAM) besiyeri (Alsina ve diğ., 1994) de çalışma sırasında tercih edilmiştir.

Bakteri izolatlarının teşhisinde yardımcı olarak API 20E kiti (Biomerieux, Fransa) de çalışmaya dâhil edilmiştir.

V. anguillarum Medium (Alsina ve diğ., 1994)

<i>Sorbitol</i>	<i>15 gr</i>
<i>Maya özütü</i>	<i>4 gr</i>
<i>Safra tuzu</i>	<i>5 gr</i>
<i>NaCl</i>	<i>35 gr</i>
<i>Krezol kırmızısı</i>	<i>40 mg</i>
<i>Bromtimol mavisi</i>	<i>40 mg</i>
<i>Agar</i>	<i>15 gr</i>
<i>Distile su</i>	<i>1000 ml</i>

(Yukarıda tarif edilen VAM besiyeri sıcak su banyosunda önce 100°C'de 1 saat bekletildikten sonra su banyosunun sıcaklığı 50°C'ye düşürülüp ardından, hazırlanan besiyerinin pH'ı 5M NaOH ile 8,6'ya ayarlandıktan sonra içerisine 10 mg ampisilin eklenmiştir).

3.1.5.Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Safra Tuzları (Scharlau, 11409), Bromtimol Mavisi (Panreac 131167), Krezol Red (Merck 5225), Polimetil Benzaldehit (Panreac 141515.1210), İzoamil Alkol (Panreac 131079), Hidroklorik Asit (Panreac 131020.1611), α -naftilamin (Sigma N9005-25G), Glasiyal Asetik Asit (Panreac 141008.1611), sülfanilik Asit (Merck 686), α - naftol (Merck 6223), Etil alkol (absolute) (Prolabo 20820.293), Potasyum Hidroksit (Analema H-5882), PBS gibi kimyasal maddeler ve solüsyonlar da kullanılmıştır.

PBS (Phosphat Buffered Saline):

<i>PBS tablet</i>	<i>1 adet</i>
<i>Distile su</i>	<i>200 ml</i>

3.1.6.Biyofilm Testinde Kullanılan Malzemeler ve Solüsyonlar

Bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin tespitinde ise Kristal Viyole (Analema 512), Luria Bertani Broth (Pronadisa 1231.00), Aseton (Panreac 141007.1611), 96 kuyucuklu ELISA plağı (Nunc-Immuno plate 439454) kullanılmıştır.

3.1.7. Dot Blot Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

Serotip belirlemek amacıyla Dot Blot Testinde, Trisma Base (Sigma T6066-5KG), Magnezyum Klorür (Merck 5833), Tween 20 (Sigma P-1379), Bovine Serum Albümin (Sigma A-8022), Sodyum Bikarbonat (Sigma S-8875), 5'4 N'N Dimetilformamide (Sigma D4451-250ML), (560) Nitroblue Tetrazolium (Sigma-Aldrich N6876) ve 5-Bromo-4 Cloro-3 Indolil Fosfate (BCIP) (Sigma B-8503) kullanılmıştır.

5X TBS (Trisma Base Salt) :

<i>Trizma Base</i>	4,84 g
<i>NaCl</i>	58,48 g
<i>Distile Su</i>	2 l

Yıkama Solüsyonu (TTBS) :

<i>1X TBS</i>	100 ml
<i>Tween 20</i>	0,5 ml

Blotlama Solüsyonu :

<i>1X TBS</i>	100 ml
<i>Jelatin</i>	3 g

Serum Sulandırma Solüsyonu :

<i>1X TBS</i>	100 ml
<i>Jelatin</i>	2 g

Karbonat Tamponu :

<i>Sodyum Bikarbonat</i>	8,4 g
<i>MgCl₂</i>	0,203 g
<i>Distile Su</i>	1 l

(pH: 9,8; 1M NaOH ile ayarlandıktan sonra 100ml Karbonat Tampon Solüsyonu içine Reaktif A ve B karıştırılır)

Reaktif A Solüsyonu :

<i>(5'4) N'N-dimetil formamide</i>	0,7 ml
<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>	0,03 g
<i>Distile Su</i>	0,3 ml

Reaktif B Solüsyonu :

<i>(5'4) N'N-dimetil formamide</i>	1 ml
<i>5-Bromo-4cloro-3 indolil phosphate</i>	0,015 g

3.1.8. PCR Testinde Kullanılan Malzemeler ve Kitler

Moleküler çalışmalarda; bakteri izolatlarından DNA izolasyonunda InstaGene™ Matrix (BIO-RAD) kiti, Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Pure Tag Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare 27-9558-01) kiti, *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genine ait 519 bç'lik kısmı çoğaltmaya yarayan *rpoN*-ang5' isimli 5'-GTTC-ATAGCATCAATGAGGAG-3' ileri ve *rpoN*-ang3' isimli 5'-GAGCAGACAATATGTTGGATG-3' geri primerleri, PCR

ürünlerinin görüntülenmesi aşamasında ise Agaroz (SeaKem Lonza 50004), 50X TAE Tampon (BIO-RAD 161-0743), Etidyum Bromid (BIO-RAD 161-0433), DNA Yükleme Boyası (Fermentas R0631) ve 50bp'lik DNA Ladder (Fermentas SM1103) kullanılmıştır.

Agaroz Jel :

<u>1X TAE:</u>		<u>%1 Agaroz Jel:</u>	
50X TAE	20ml	1X TAE	100 ml
Distile su	980 ml	Agarose	1 g
		Etidyum bromid(10mg ml-)	2 µl

(1X TAE tamponunun final konsantrasyonu: 40mM Tris, 20mM Asetik asit, 1mM EDTA ve pH 8.3'dir.)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hasta Balıkların Klinik Muayenesi, Otopsi ve Viseral Organlarından Bakteri İzolasyonu

Bu çalışmada 2011 yılının Ağustos ayında Muğla iline bağlı Bodrum ve Milas ilçelerindeki iki deniz balığı işletmesindeki hasta levrek balıklarından örnekleme çalışması gerçekleştirilmiş olup kafeslerdeki hasta levrek balıklarının sergilediği davranışlar ve yüzme hareketleri incelenmiş ve işletme çalışanlarından hasta balıklarla ilgili anemnez bilgileri alınmıştır. Hastalık belirtisi gösteren bireyler kepçe yardımı ile sudan alınarak bir kova içerisinde 2-phenoxyethanol (0,1 ml /litre) ile bayıltılmıştır (Noga, 2010).

Balıklar baygın hale geldikten sonra temiz bir kurutma kağıdı üzerine alınmış ve eksternal bulguları kaydedilmiştir. Sonrasında balıkların dış yüzeyleri kağıt havlu ile silinerek, yüzeyleri %70'lik alkol ile dezenfekte edilmiştir. Daha sonra dezenfekte edilen hasta balık örneklerine ventral, lateral ve operkular insizyon teknikleri kullanılarak otopsi işlemi gerçekleştirilmiştir (Plumb ve Bowser, 1983; Rodger, 2010). Daha sonra internal bulguları kaydedilen hasta balıkların karaciğer, dalak ve böbrek gibi iç organlardan %1,5 NaCl içeren Triptik Soy Agar (TSA), Tiyosülfat Sitrat Bile Sükroz (TCBS) ve *V. anguillarum* için selektif bir besiyeri olan *V. anguillarum* besiyerlerine (VAM) bakteriyolojik ekimler yapılmıştır.

3.2.2. Hasta Balıklardan *V. anguillarum*'un İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Arazi koşullarında ekim yapılan petripler İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına getirilerek 22-25 °C de 24 saat inkübe edilmiştir. Üreme olan petriplerden özellikle TCBS ve VAM besiyerlerinde koloni rengi sarı olan bakterilerden saf koloni elde edilmek için tekrar %1.5'lük NaCl TSA besiyerlerine azaltma ile ekimleri yapılmış ve petripler 22-25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda TSA besiyerinde üreyen bakterilerin koloni morfolojileri incelenerek tür düzeyinde identifikasyon için biyokimyasal testlere geçilmiştir (Romalde ve diğ., 1995; Actis ve diğ., 1999; Austin ve Austin, 2012).

Primer izolasyon ile elde edilen bakteri kültürlerinin morfolojik ve biyokimyasal identifikasyonu için sırasıyla; Gram boyama, asılı damla metodu ile hareket testi, sitokrom oksidaz, katalaz, O/F, Vibriostat (O/129), *ortho-nitrophenly*-βD-galactopyranoside (ONPG), arjinin dihidrolaz (ADH), lizin dekarboksilaz (LDH), ornitrin dekarboksilaz (ODC), sitrat kullanımı, H₂S gaz üretimi, üreaz, jelatinaz, VAM (*V. anguillarum* Medium) seçici besiyeri ve TCBS besiyerinde üreme, %1,5-7 NaCl içeren besiyerinde üreme, indol üretimi, MR/VP testi, glikoz, mannitol, inositol, sorbitol, ramnoz, sukroz, melibiyoz, amiglidalin, sakkaroz, laktoz, maltoz, fruktoz, galaktoz, xylose, mannoz ve arabinozdan asit üretimi, Nutrient Broth besiyerinde farklı tuzluluklarda (% 0, 0,5, 1 ve 1,5 NaCl içeren) ve 37°C'de üreme testleri yapılmıştır. Ayrıca diğer rutin bakteriyolojik yöntemler ve biyokimyasal testlerde bakteri izolatlarının identifikasyonunun kullanılmıştır.

3.2.3. *V. anguillarum* Şüpheli İzolatların Moleküler Yöntemle Teşhisi

3.2.7.1. Bakteri İzolatlarından DNA İzolasyonu

Bu çalışmadaki hasta levrek balıklarından izole edilen bakterilerin DNA izolasyonunda ticari olarak satılan InstaGene™ Matrix (BIO-RAD) kiti kullanılmıştır. DNA izolasyon kitinin kullanımı üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda ve kullanım kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir. %1 NaCl içeren TSA besiyerinde 25°C'de 24 saat inkübe edilmiş taze bakteri kültürlerinden alınan kolonileri içinde 1 ml steril saf su olan ependorf tüplere toplanmış ve süspansiyon edilmiştir. Ependorf tüpler 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Ependorf tüplere 200 µl InstaGene matrix solüsyonu ilave edilerek bakteri pelletleri

süspanse edilerek, 56°C'deki etüvde 30 dakika bekletilip daha sonra 10 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Eppendorf tüpler daha sonra 100°C'deki su banyosunda 8 dakika tutulmuş ve yine 10 saniye vorteksle karıştırılmıştır. Eppendorf tüpler 12.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı 1µl'lik DNA örneği alınarak PCR yönteminde kullanılmıştır.

3.2.3.1. PCR Yöntemi

DNA izolasyonu tamamlanmış olan bakteri örnekleri Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) çoğaltılmaya hazır hale getirilmiştir. PCR yöntemi için Illustra™ pureTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare) ticari hazır kiti üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda kullanılmıştır. Kit içeriğinde stabilizatör içeren sabit boncuklar, Bovine Serum Albumin (BSA), dNTPler (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2.5 unite pureTaq DNA polimeraz ve reaksiyon tamponu bulunmaktadır. Boncuklar sulandırılarak final konsantrasyonu 25 µl'ye getirildiğinde; 10mM Tris-HCl, 50mM KCl ve 1.5 mM MgCl₂'de (oda sıcaklığında pH 9.0) her dNTP'ler 200 µM konsantrasyonunda olmaktadır. PCR reaksiyonu için primer olarak, *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genine ait 519 bç'lik kısmı çoğaltmaya yarayan *rpoN*-ang5' isimli 5'-GTTC-ATAGCATCAATGAGGAG-3' ileri ve *rpoN*-ang3' isimli 5'-GAGCAGACAATATGTTGGATG-3' geri primerleri kullanılmıştır (Gonzalez ve diğ., 2003). Polimeraz zincir reaksiyonunda *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genine ait 519 bç'lik kısmın çoğaltılmasında kullanılan PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları Tablo 3.1'de verilmiştir. Liyofilize boncuklar final konsantrasyonu 25µl olacak şekilde hesaplanarak 22µl distile su içinde çözülmüş ve üstüne 1'er µl primerleri ve son olarak da kalıp DNA'lar koyulmuştur. Pozitif kontrol olarak R82 kodlu *V. anguillarum* suşundan izole edilen DNA örneği ve negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır.

Tablo 3.1 *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genine ait 519 bç'lik kısmın çoğaltılmasında kullanılan PCR bileşenleri ve final konsantrasyonları

Bileşen	Hacim	Final Konsantrasyonu
Ready-To-Go™ PCR Beads	Liyofilize boncuk	1 adet
İleri Primer	1 µl	2µmol
Geri Primer	1 µl	2µmol
DNA	1 µl	1000ng
Distile Su	22 µl	-

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, USC Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü CIBUS Laboratuvar'ında bulunan Ependorf Marka termal-döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Örneklerin PCR'da çoğaltılmaları Gonzalez ve diğ. (2003)'ın tarafından bildirilen PCR protokolü izlenerek yapılmıştır. Bu nedenle Termal-döngü cihazına yerleştirilen örnekler için ilk denatürasyon basamağı için 95 °C'de 3 dakika ve ardından 95 °C için 1 dakika, primerlerin bağlanması için 62 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 40 saniye ve final basamağı olan ürünlerin son uzaması için 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde 30 döngüye ayarlanmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örnekler, analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

PCR ürünlerinin jel elektroforez analizi USC Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü CIBUS laboratuvarında bulunan BIO-RAD marka yatay elektroforez cihazında gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi için %1 oranında agaroz içeren jel hazırlanmıştır (Gonzalez ve diğ., 2003; Arı, 2004). %1'lik agaroz jel hazırlamak için 100 ml 1X TAE içine 1g agaroz eklenip mikrodalga fırında eritilmiştir. Jel elektroforezinde kullanılan 1X TAE tamponu, Bio-Rad firması tarafından temin edilen hazır 50X TAE tamponundan hazırlanmıştır. 50–60°C'ye kadar soğuduktan sonra 0.5µl etidyum bromid solüsyonu eklenmiş ve elektroforez cihazının taraklarına yerleştirilip, tablasına jel dökülerek jelin donması beklenmiştir.

PCR ile çoğalan DNA örneklerinden 8 µl alınıp 2 µl yükleme boyası ile karıştırılmış ve donan agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. 5 µl DNA markırları da jele yüklendikten sonra 120 V'da 30 dakika yürütülmüştür. Süre sonunda agaroz jelde

yürüyen PCR ürünlerinde 519 bp'lik *rpoN* gen parçasının çoğalıp çoğalmadığı bilgisayar bağlantılı BIO-RAD marka GEL-DOC 200 görüntüleme sistemi kullanılarak incelenmiştir.

3.2.4. *V. anguillarum* Suşlarının Serolojik Yöntemlerle Serotiplerinin Belirlenmesi

3.2.4.1. Lam Aglütinasyon ve Dot-Blot Testi için O Antijen Ekstraktının Hazırlanması

Santiago De Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü İhtiyopatoloji grubundan temin edilen R82 suşu (*V. anguillarum* O1), İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no'lu *V. anguillarum* izolatları ve bu çalışmadaki hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum* şüpheli 5 suş, %1 NaCl içeren TSA besiyerinde 25 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra üreyen taze kültürlerinden 2 ml fosfat buffer saline (PBS) içeren steril tüpler içine toplanmış ve 1 saat 100°C'de kaynatılarak 'O' antijen süspansiyonları hazırlanmıştır. Lam aglütinasyon ve Dot-Blot testinde kullanılmak üzere hazırlanan bu antijenler kullanılana kadar -20°C'de dondurularak saklanmıştır (Cipriano ve diğ., 1985; Toranzo ve diğ., 1987).

3.2.4.2. Lam Aglütinasyon Testi

V. anguillarum O1, O2 ve O3 serumları 1/100 oranında dilüte edilmiş ve her serum için ayrı olarak %50 aseton-alkol karışımı içinde temizlenmiş lamaların üstüne 10µl'lik iki damla damlatılmıştır. Bir tarafa negatif kontrol olarak 10µl PBS ilave edilirken diğer tarafına *V. anguillarum* suşlarından daha önce hazırlanan "O" antijen ekstraktından 10µl eklenmiştir ve lamaların sağa sola hareket ettirilmesiyle iyi bir şekilde karışmaları sağlanmıştır. Test sonuçları 2-3 dakika içerisinde değerlendirilmiş, 5 dakikadan sonra oluşan zayıf aglütinasyon negatif olarak değerlendirilmiştir (Bullock, 1978; Plumb ve Bowser, 1983; Toranzo ve diğ., 1987; Roberson, 1990).

3.2.4.3. Dot-Blot Testi

Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum*'un "O" serotipinin belirlenmesinde yöntem olarak Cipriano ve diğ.'nin (1985) *Vibrio anguillarum*'un antijenlerinin saptanmasında kullandığı Dot-Blot yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle nitroselüloz membran başlayacağımız noktadan kesilerek arka kısmındaki kağıdı

ayrılmış ve bir petri kutusunda Tris Buffer Saline (20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5) ile 5 dakika ıslatılmıştır. TBS dökülerek uzaklaştırılmış ve membranların havada kurutulması sağlanmıştır. Daha sonra nitroselüloz membrana gömülme işlemine geçilmiş ve her örnekten 1µl miktarında membranda yerlerini karıştırmamak için yan yana ve alt alta 2'şer kare atlanılacak şekilde ilk olarak pozitif kontrol olarak R82 suşundan (*V. anguillarum* O1), ardından 1, 2 ve 3 suşları ve bu çalışmada izole edilen 5 adet *V. anguillarum* şüpheli suştan elde edilen antijen ekstratı ile negatif kontrol olarak PBS kullanılmış ve bakterilere ait antijen örnekleri sırasıyla nitroselüloz membrana gömülmüştür.

Antijen yüklü nitroselüloz membran bir petri kutusu içinde %3 oranında jelatin içeren TBS (TTBS) karışımında 1 saat çalkalamalı platformda ve oda sıcaklığında bekletilerek blotlama işlemi tamamlanmış ve blotlama işleminden sonra Tween 20-TBS (T-TBS) karışımında 5 dakika yıkanmış ve bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. Nitroselüloz membrana antikor olarak *V. anguillarum* O1 serotipine karşı üretilmiş poliklonal tavşan serumu %1 jelatin içeren TBS ile 1/1000 oranında sulandırılarak eklenmiştir ve 1 saat çalkalamalı platformda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda membran tekrar T-TBS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra nitroselüloz membran Bio-Rad firması üretimi ticari olarak satılan keçide üretilmiş Goat Anti-rabbit IgG (H-L)-AP konjugatı %1 jelatin içeren TBS ile 1/1000 oranında sulandırılarak eklenmiş ve 1 saat çalkalamalı platformda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Nitroselüloz membran 1 saatlik süre dolduktan sonra tekrar T-TBS ile 3 kez yıkanmış ve 5-Bromo-4kloro-3 indolil fosfat ve nitroblue tetrazolium içeren dimetil formamide ile hazırlanmış reaktif A ve B solüsyonları içeren 100µl karbonat solüsyonu içine konmuştur. 10 dakika süre ile reaksiyon beklenmiş ve distile su ile nitroselüloz membranlar yıkanarak reaksiyon durdurulmuştur. Mor renk oluşumu (leke) pozitif sonuç olarak kabul edilirken, renk oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Biofilm Testi

Hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum* şüpheli izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri Woodward ve ark. (2000) tarafından bildirilen 96 kuyucuklu mikropalak'ta biyofilm oluşumu metodu uygulanarak tespit edilmiştir. Bu amaçla öncelikle *V. anguillarum* şüpheli 2 suşun ve pozitif kontrol olarak İ.Ü. Su Ürünleri

Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 kodlu *V. anguillarum* suşları dâhil olmak üzere Luria Bertani (LB) Broth da 24 saatlik kültürleri hazırlanmıştır.

Bakteri kültürünün yoğunluğu spektrofotometrede OD_{595} 'de 0,2 olacak şekilde ayarlanmış ve her bir kuyucuğunda 100 µl LB bulunan 96 kuyucuklu ELISA plaklarına her suştan 3 paralel olacak şekilde üzerine 30 µl'lik hacimde bakteri solüsyonu ilave edilmiştir. Ayrıca blank için ayrılan kuyucuklara 30 µl'lik hacimde LB eklenmiş ve tüm kuyucukların toplam hacminin 130 µl eşitlenmesi sağlanmıştır.

ELISA plakları 20°C' de 2, 3 ve 4 gün inkübe edilmiştir. Her günün inkübasyon sonunda plakların 595 nm'de optik yoğunluklar ölçülmüş ve plaklar steril distile su ile yıkanarak kurutulmuştur. Daha sonra her kuyucuğa 130 µl kristal viyole solüsyonu ilave edilmiş, 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kez steril distile su ile ELISA plakları yıkanmış ve 130 µl etanol/aseton (7/3) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra optik yoğunluk 595nm'de ölçülerek her bir bakterinin etanol/aseton sıvısı içerisinde biyofilm oluşumları belirlenmiştir.

Sıvı-hava ara yüzeyinde biyofilm (pelikül) oluşumunu belirlemek için ise $OD_{595}=0,2$ olan kültürlerden 0,5 ml'si 4,5 ml LB bulunan cam tüplere inoküle edilmiş ve $20\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 8 gün sabit bir şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Hergün gözlemlenerek tüplerdeki biyofilm oluşumu gözle incelenmiş ve pelikül oluşturan suş ya da suşlar belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HASTA BALIKLARIN KLİNİK VE OTOPSİ BULGULARI

Bu çalışmada gerçekleştirilen örnekleme çalışmaları 2011 yılının Ağustos ayında Muğla iline bağlı Bodrum ve Milas ilçelerindeki iki farklı deniz balığı işletmesinde yürütülmüş olup işletmeler A ve B işletmesi olarak isimlendirilmiştir. A işletmesindeki ortalama 150-200 gr ağırlığa sahip hasta levrek balıklarında eksternal olarak yapılan incelemede vücut yüzeyinde, baş bölgesinde ve operkulumda hemoraji (Şekil 4.1), baş bölgesinde ve operkulumda küçük hemorajik lezyonlar (Şekil 4.2), anal bölgede ve vücut üzerinde hemoraji (Şekil 4.3) ve solungaçlarda hemoraji ve erime tespit edilmiştir. İnternal olarak ise aynı balıklarda karın içerisinde sıvı birikimi (ascites), karaciğerde yaygın hemoraji ve hipereminin yanı sıra renginin solgun olduğu; hiperemik bağırsak duvarında incelme ve şeffaflaşma, dalakta büyüme ve viseral organlar arasında yağ dokusunda hiperemi ve hemoraji tespit edilmiştir (Şekil 4.4, 4.5).



Şekil 4.1: A işletmesindeki hasta levrek balığında operkulumda ve vücut üzerinde hemorajiler.



Şekil 4.2: 150–200 g ağırlığa sahip hasta levrek balığında baş bölgesinde ve operkulumda hemorajik lezyonlar.



Şekil 4.3: Hasta levrek balığında anal bölgede hemoraji.



Şekil 4.4: Hasta levrek balığında solungaçlarda hemoraji ve primer lamellalarda erime, karaciğerde yaygın hemoraji ve hiperemi.



Şekil 4.5: Hasta levrek balığında karaciğerde yaygın hemoraji ve hiperemi, büyümüş dalak ve viseral organlar arasında yağ dokusunda hiperemi ve hemoraji.

B işletmesinde ortalama 150-180 gr ağırlığa sahip hasta levrek balıklarında eksternal olarak yapılan incelemede vücut renginde koyulaşma ve vücut yüzeyinde seyrek peteşiyal hemoraji ile birlikte aşırı derecede mukus salgısı, pullarda dökülme, gözlerde hafif ekzoftalmus, yüzgeçlerde erime, pelvik yüzgeçlerin diplerinde hemoraji, operkulum üzerinde hemorajik lezyonlar ve abdomende şişkinlik tespit edilmiştir (Şekil 4.6). İnternal olarak ise karın içerisinde sıvı birikimi (ascites), karaciğerde solgunluk veya hemoraji yanısıra hemorajik odaklar, böbreklerde erime, dalakta büyüme, viseral organlar arasında yağlanma ve bağırsak içinde sarı renkli sıvı birikimi tespit edilmiştir (Şekil 4.7, 4.8, 4.9).



Şekil 4.6: B işletmesinden temin edilen hasta levrek balığında vücut renginde açılma, yüzgeçlerde erime, pelvik yüzgeç dibinde hemoraji ve abdomende şişkinlik.



Şekil 4.7: B işletmesindeki hasta levrek balığında gözlerde hafif ekzoftalmus, pullarda dökülme, operkulum üzerinde hemoraji, karaciğerde hemoraji.



Şekil 4.8: Hasta levrek balığında solgun karaciğerde hemoraji, böbrekte erime, dalakta büyüme ve beyaz küçük nekrotik odaklar.

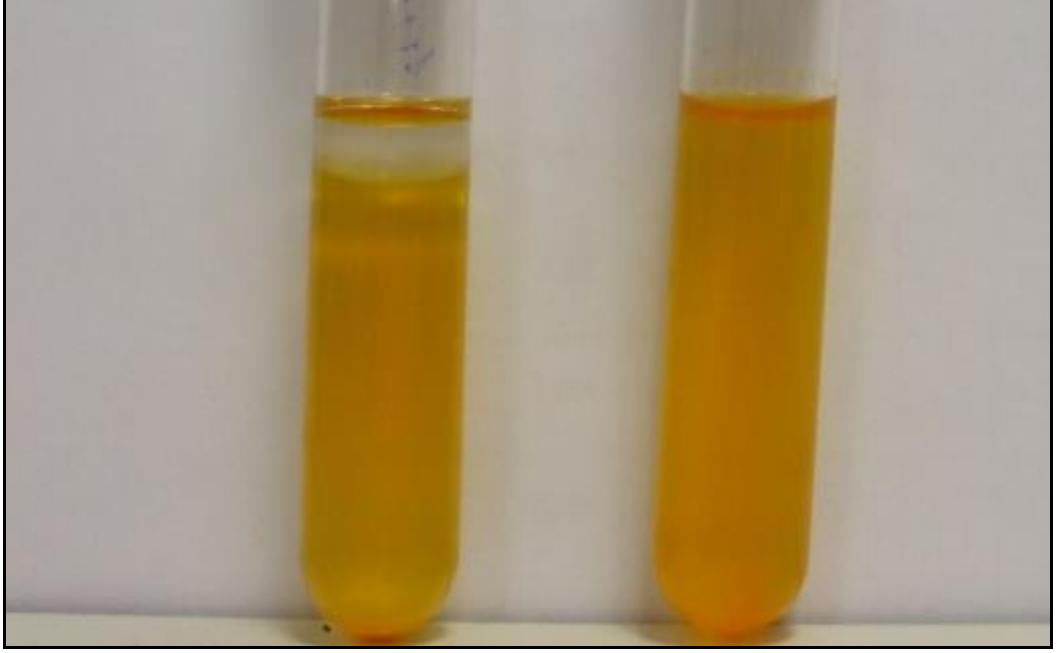


Şekil 4.9: Hasta levrek balığında solgun karaciğer, dalakta büyüme, bağırsakta sarı renkli sıvı birikimi.

4.2. BAKTERİYOLOJİK BULGULAR

Bu çalışmada İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no'lu *V. anguillarum* izolatları ve Ağustos 2011'de gerçekleştirilen örnekleme çalışmasında A işletmesinden 5 adet hasta levrek balığının karaciğer, dalak ve böbreğinden izole edilen 7 izolat ve B işletmesinden de 3 adet hasta levrek balığının karaciğer, dalak ve böbreğinden izole edilen 2 izolat olmak üzere toplam 12 adet izolat çalışılmıştır. Hasta levrek balıklarının viseral organlarından %1.5 NaCl içeren Triptik Soy Agar (TSA), Tiyosülfat Sitrata Bile Sükroz (TCBS) ve *V. anguillarum* için selektif bir besiyeri olan *V. anguillarum* besiyerlerine (VAM) yapılan bakteriyolojik ekimler sonunda elde edilen izolatların koloni morfolojilerinin tespiti için % 1,5'lük NaCl içeren TSA besiyerine ekimler yapılmış. *V. anguillarum* şüpheli bakteri izolatları TSA besiyerinde sarı krem renkli küçük yuvarlak koloniler oluştururken, bazı izolatların ise küçük düz krem renkli koloniler oluşturduğu dikkati çekmiştir.

Çalışmada incelenen tüm bakteri izolatlarının Gram-negatif karakterde ve kıvrık çomak (basil) şekilli morfolojiye sahip, hareketli, sitokrom oksidaz ve katalaz testinde pozitif reaksiyon veren fermentatif (Şekil 4.10) bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen 12 izolata ait morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir.

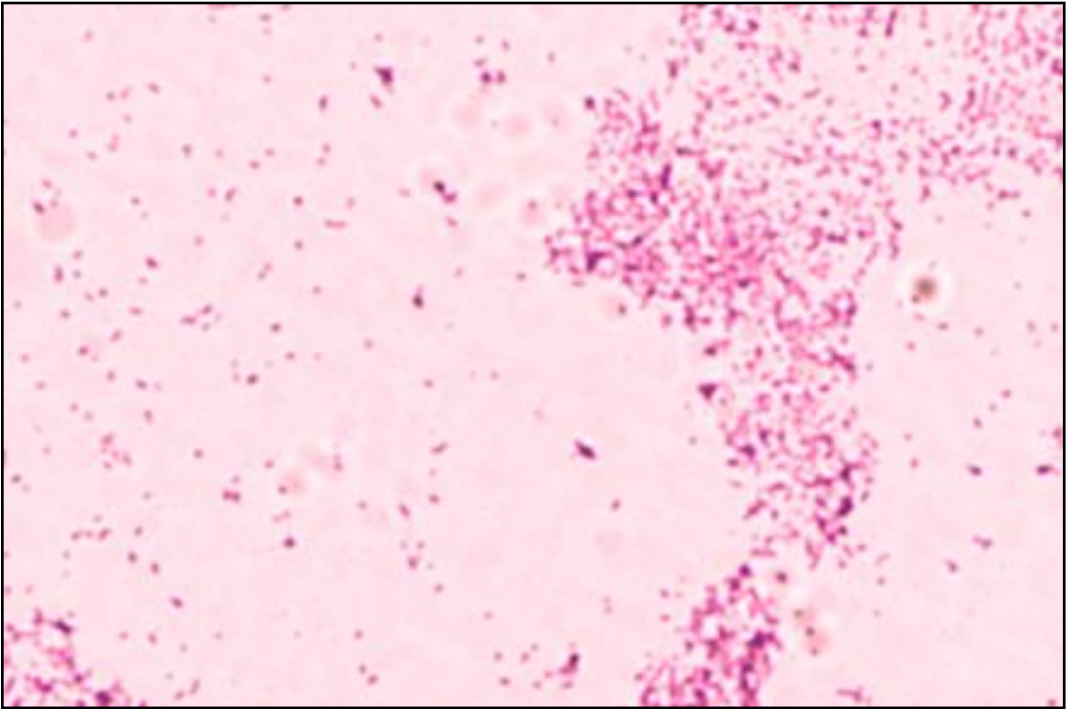


Şekil 4.10: O/F besiyerinde fermentatif üreme özelliği gösteren 4 no’ lu izolat.

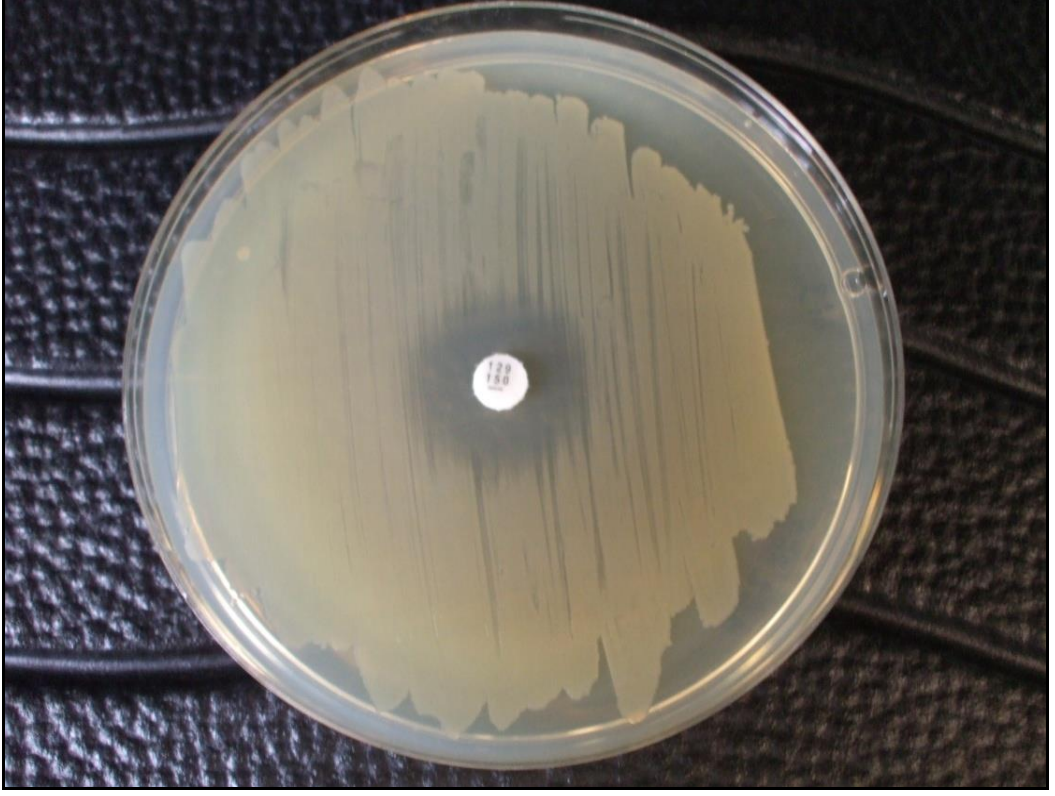
A ve B işletmesinden temin edilen hasta balık örneklerinden yapılan bakteriyolojik ekimler sonrasında % 1,5’luk NaCl içeren TSA besiyerinde sarı-krem renkli koloniler oluşturan (Şekil 4.11) 4 ve 5 no’ lu izolatlar, Gram-negatif karakterde olmaları (Şekil 4.12), O/129’a hassas olmaları (Şekil 4.13), TCBS (Şekil 4.14) ve VAM (Şekil 4.15) besiyerlerinde sarı renkli koloniler oluşturmaları, kanlı agarda β -hemoliz yapmaları (Şekil 4.16), arjinin dihidrolaz pozitif (Şekil 4.17), lizin ve ornitrin dekarboksilaz negatif, indol (Şekil 4.18), VP (Şekil 4.19), sitrat (Şekil 4.20), jelatin (Şekil 4.21), nitrat (Şekil 4.22) ve ONPG test sonuçlarının pozitif olması ve diğer biyokimyasal özellikleri nedeniyle *V. anguillarum* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1).



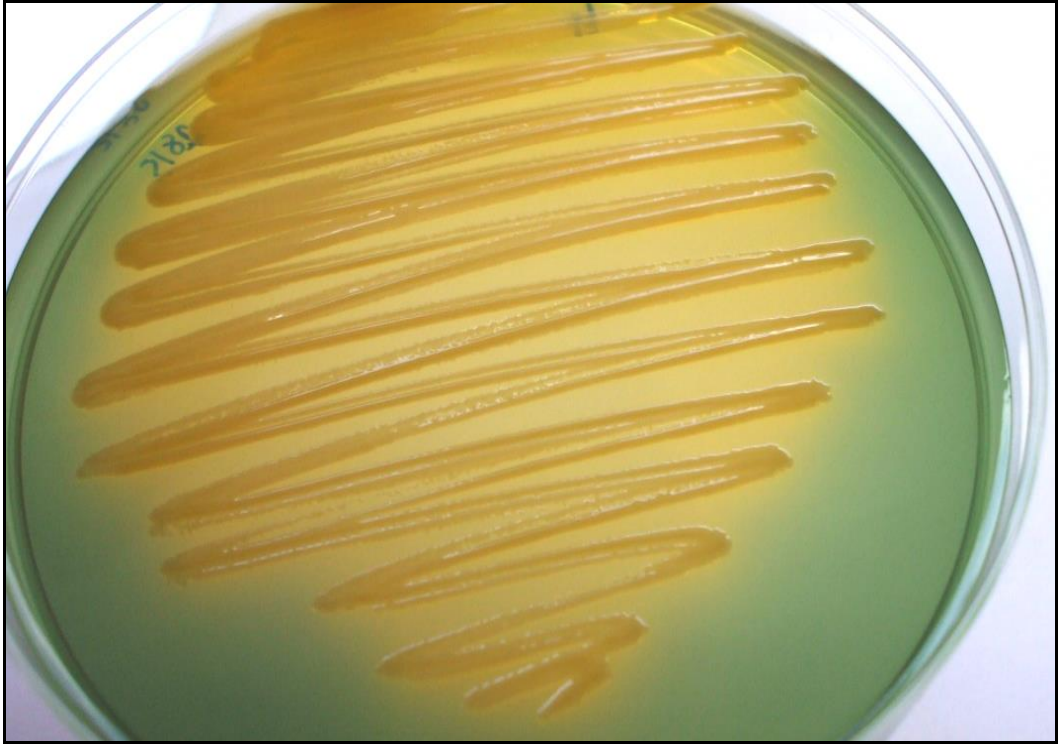
Şekil 4.11: TSA besiyerinde 5 no' lu izolata ait krem renkli koloniler.



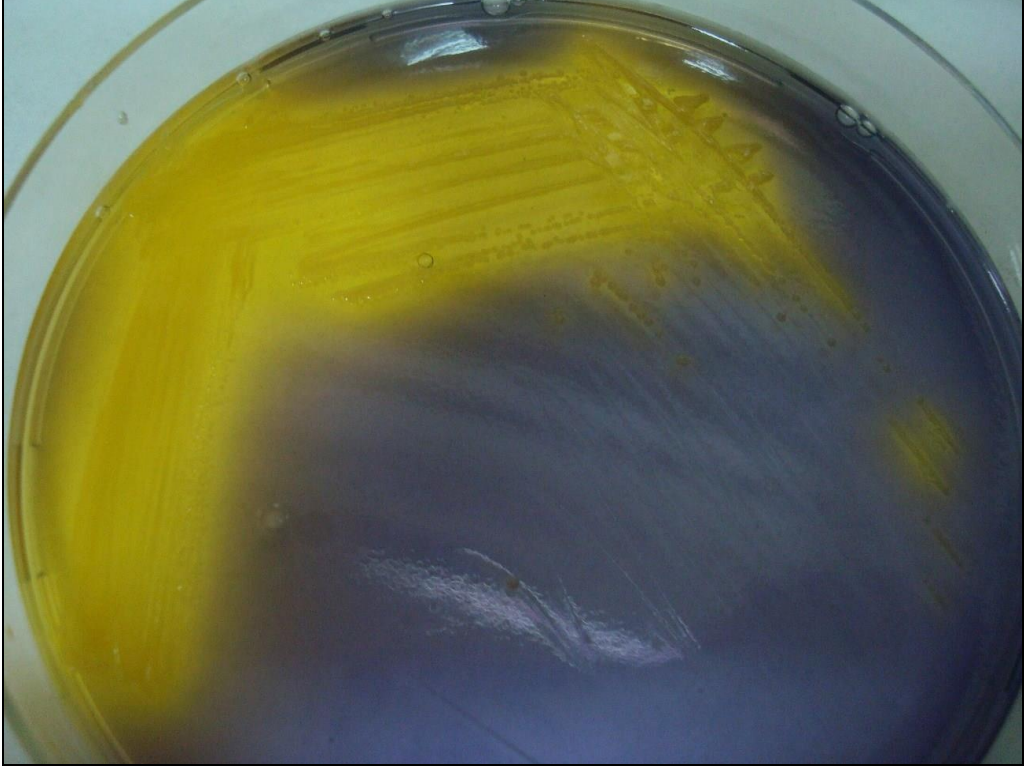
Şekil 4.12: 5 no' lu izolata ait Gram boyama preparatı (Gram X400).



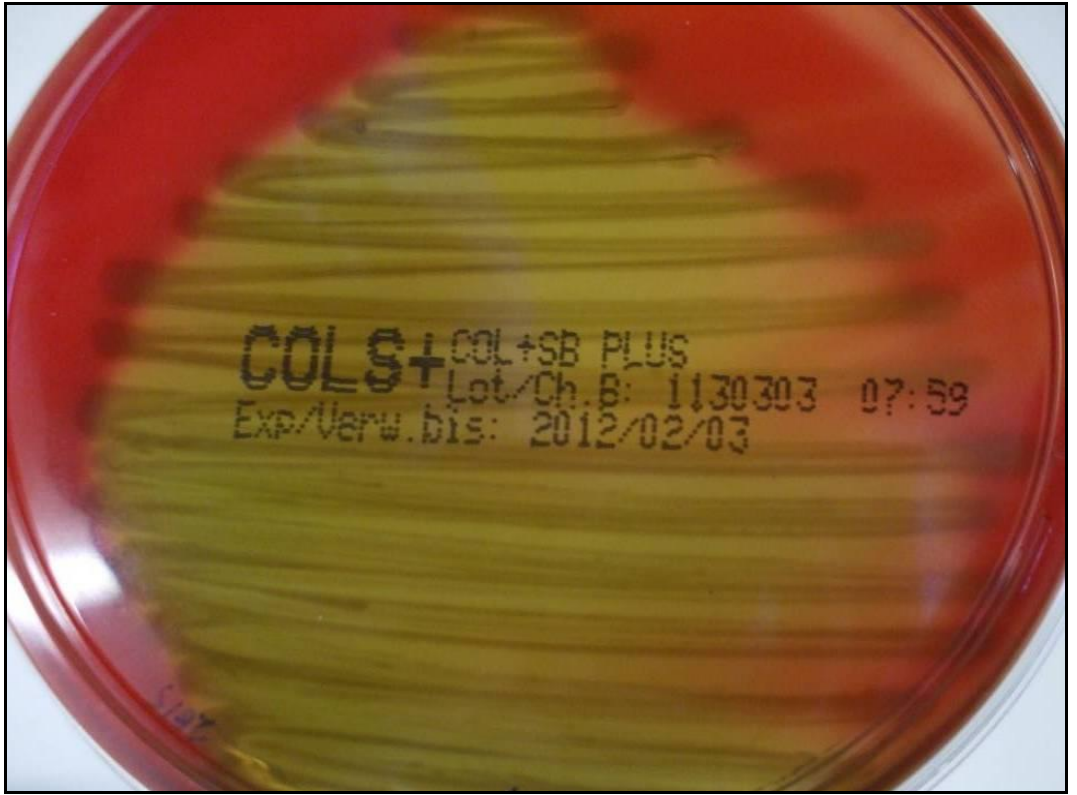
Şekil 4.13: O/129 testine duyarlı 5 no' lu izolat.



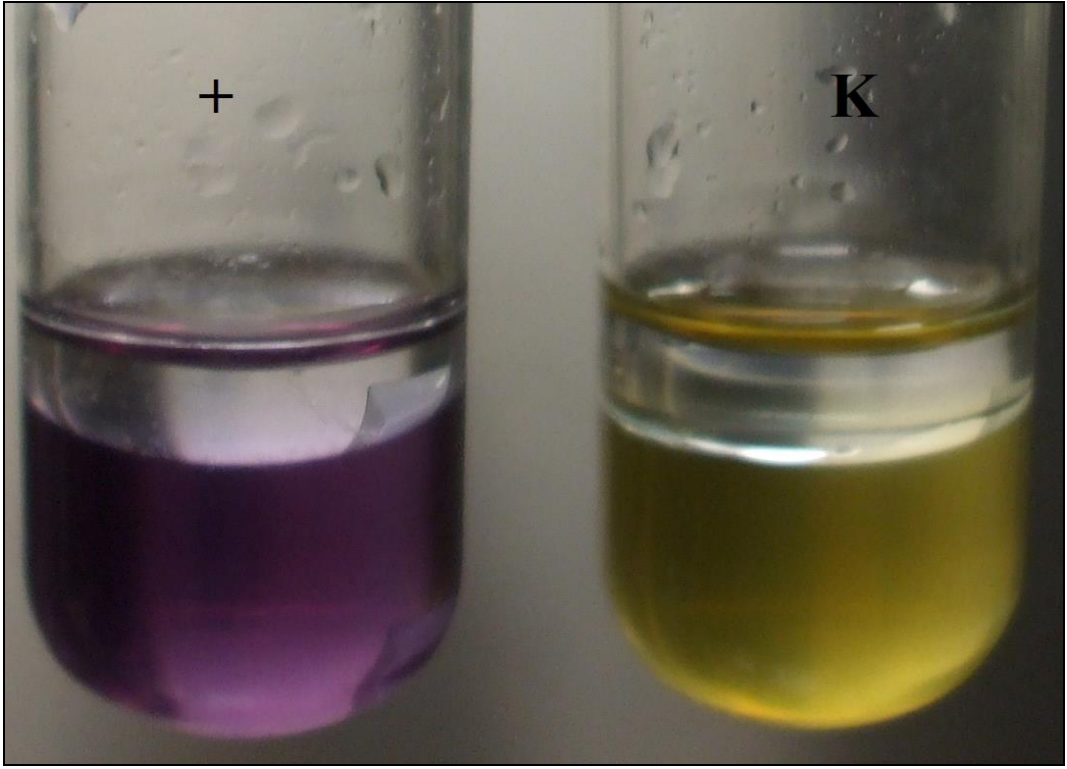
Şekil 4.14: TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan 5 no' lu izolat.



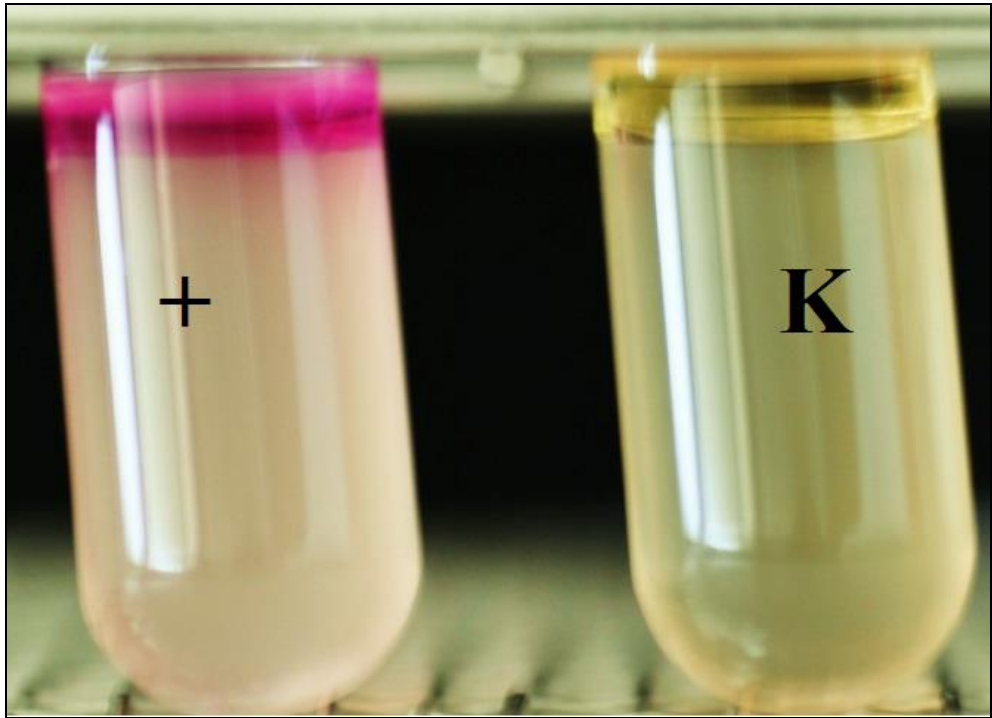
Şekil 4.15: VAM besiyerinde sarı renkli koloniler oluşturan 5 no' lu izolat.



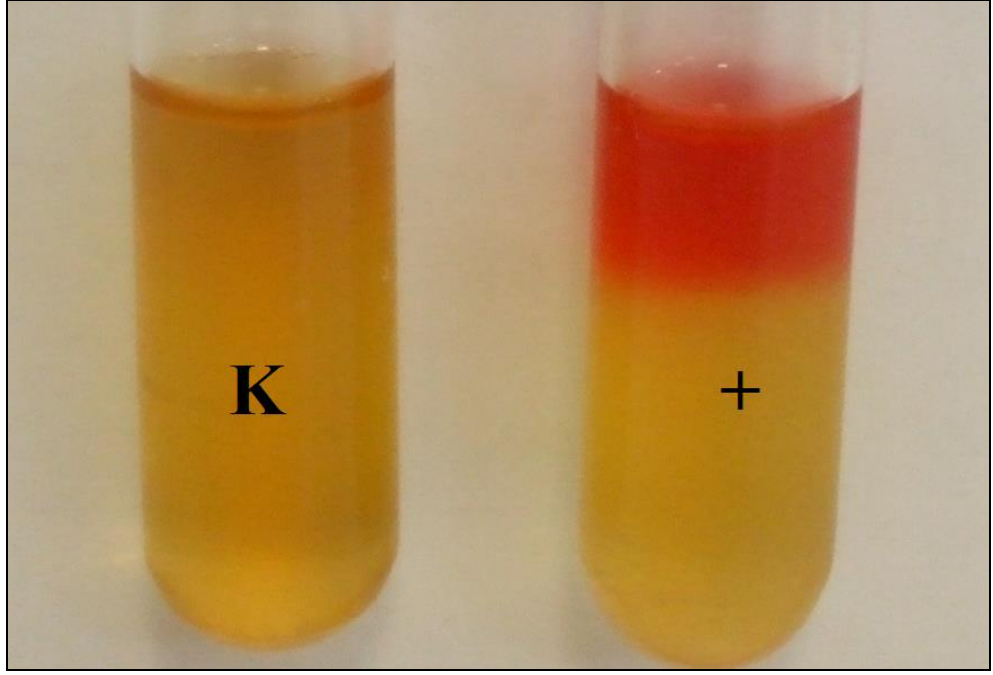
Şekil 4.16: Kanlı agar besiyerinde β hemoliz oluşturan 5 no' lu izolat.



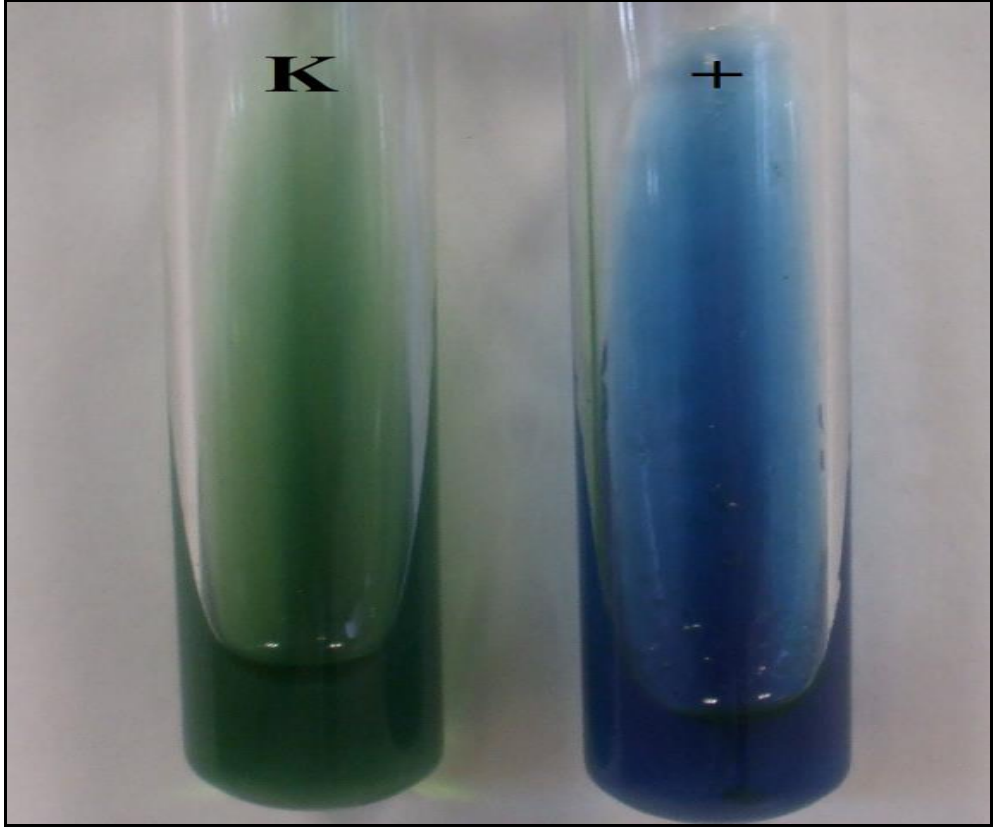
Şekil 4.17: Arjinin dihidrolaz testinde pozitif sonuç veren 5 no' lu izolat ve negatif kontrol tüpü (K).



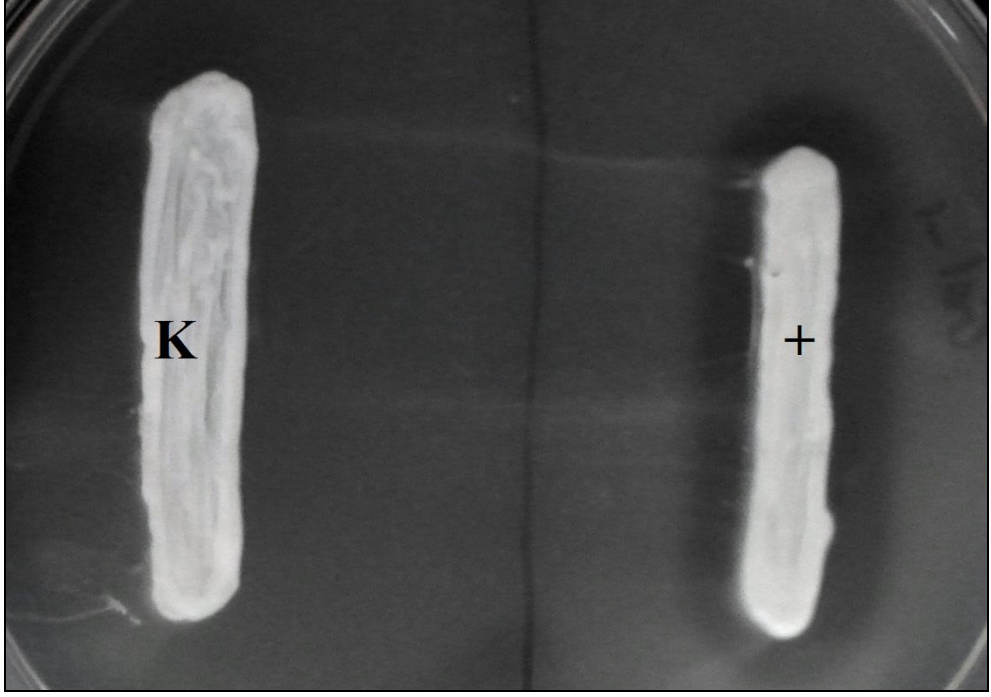
Şekil 4.18: İndol testinde pozitif sonuç veren 5 no' lu izolat ve negatif kontrol tüpü (K).



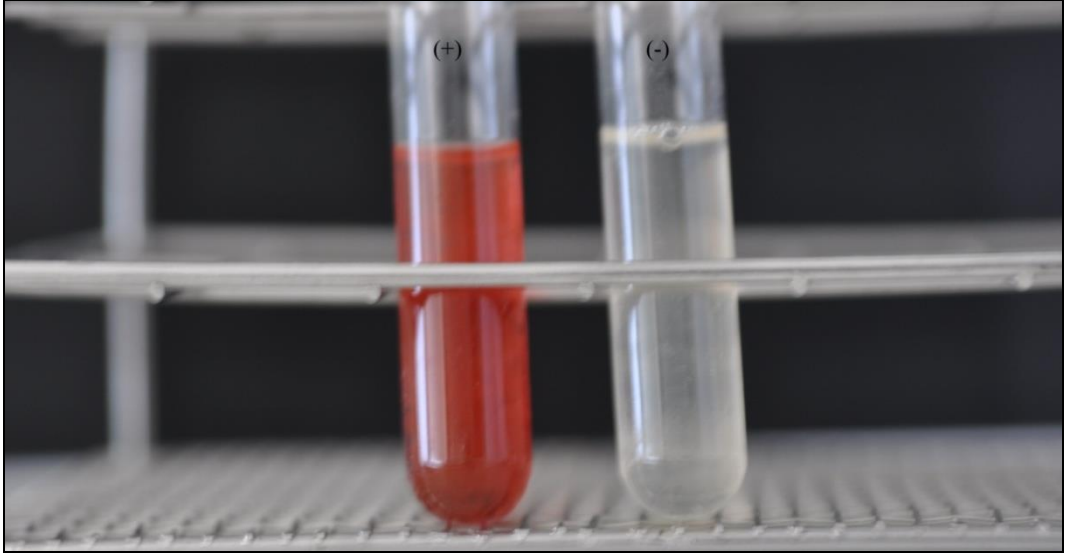
Şekil 4.19: VP testinde negatif kontrol tüpü (K) ve pozitif sonuç veren 5 no' lu izolat.



Şekil 4.20: Negatif kontrol tüpü (K) ve sitrat testinde pozitif sonuç veren 5 no' lu izolat.



Şekil 4.21: Negatif kontrol (K) ve Jelatin hidroliz testinde pozitif sonuç veren 5 no' lu izolat.



Şekil 4.22: Nitrat indirgenmesi testinde pozitif sonuç veren 4 no' lu izolat ve negatif sonuç veren 6 no' lu *Vibrio splendidus* I izolatı.

Tablo 4.1: Levrek balıklarından izole edilen bakteri izolatlarının fenotipik özellikleri

İzolat numarası	1	2	3	4	5	6
Organ	Karaciğer	Böbrek	Böbrek	Karaciğer	Dalak	Karaciğer
Gram	-	-	-	-	-	-
Morfoloji	b	b	b	b	b	b
Hareket	+	+	+	+	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F
O/129 -150µg	H	H	H	H	H	H
TCBS'de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Arjinin dihidroliz	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-
Ornitrin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-
Üre kullanımı	-	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	-
ONPG	+	+	+	+	+	+
Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
Amilaz	+	+	+	+	+	+
Eskulin	-	-	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	+	-	+	+	+	+
Nitrat	+	+	+	+	+	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	Z
Amyglidalin	-	-	-	-	-	-
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-
Kanlı agarda hemoliz	β	β	β	β	β	-
4°C'de üreme	+	+	+	+	+	+
37°C'de üreme	+	+	+	Z	+	+
44°C'de üreme	-	-	-	-	-	-
% 0 NaCl TSA	-	-	-	-	-	-
% 3 NaCl TSA	+	+	+	+	+	+
% 5 NaCl TSA	+	+	+	Z	+	Z
% 8 NaCl TSA	-	-	-	-	-	-
% 10 NaCl TSA	-	-	-	-	-	-
İdentifikasyon	V. <i>anguillarum</i>	V. <i>anguillarum</i>	V. <i>anguillarum</i>	V. <i>anguillarum</i>	V. <i>anguillarum</i>	V. <i>splendidus I</i>

+: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, F: fermentatif, b: basil, Z: zayıf, β: beta hemoliz, H: hassas

Tablo 4.1: Levrek balıklarından izole edilen bakteri izolatlarının fenotipik özellikleri (devam)

İzolat numarası	7	8	9	10	11	12
Organ	Böbrek	Böbrek	Karaciğer	Karaciğer	Böbrek	Böbrek
Gram	-	-	-	-	-	-
Morfoloji	b	b	b	b	b	b
Hareket	+	+	+	+	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F
O/129 -150µg	H	H	H	H	D	D
TCBS'de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Yeşil	Yeşil	Yeşil
Arjinin dihidroliz	-	-	+	-	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	Z	-	Z	Z
Ornitrin dekarboksilaz	+	-	-	+	-	-
Üre kullanımı	-	+	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	+	-	+	+
Jelatinaz	+	+	-	+	Z	+
Amilaz	+	+	+	+	+	+
Eskulin	-	-	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	-	-	-	-	-	-
Nitrat	+	+	+	+	+	+
Arabinoz	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz	+	+	+	-	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	-	-
Laktoz	+	+	+	+	-	-
Amyglidalin	-	-	-	-	-	-
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-
Kanlı agarda hemoliz	-	-	-	-	β	β
4°C'de üreme	-	+	+	-	+	+
37°C'de üreme	+	+	+	+	+	+
44°C'de üreme	-	-	-	+	-	-
% 0 NaCl TSA	Z	-	-	+	+	+
% 3 NaCl TSA	+	+	+	+	+	+
% 5 NaCl TSA	+	+	Z	+	-	-
% 8 NaCl TSA	-	-	-	+	-	-
% 10 NaCl TSA	-	-	-	-	-	-
İdentifikasyon	V. <i>harveyi</i>	V. <i>orientalis</i>	V. <i>mediterranei</i>	V. <i>alginolyticus</i>	A. <i>schubertii</i>	A. <i>schubertii</i>

+: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, F: fermentatif, b: basil, Z: zayıf, β: beta hemoliz, H: hassas

Ayrıca A işletmesinden temin edilen hasta levrek balığı örneklerinin karaciğerinden izole edilen ve TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan 9 ve 10 no' lu izolatların Gram-negatif karakterde, hareketli, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif ve O/129'a hassas fermentatif basiller olduğu tespit edilmiştir. Arjinin pozitif, lizin zayıf pozitif ve ornitrin negatif, indol testinde pozitif, VP testinde negatif sonuç veren 9 no' lu izolat *V. mediterranei*; arjinin ve lizin negatif, ornitrin pozitif, indol ve VP testinde negatif sonuç veren 10 no' lu izolat ise *V. alginolyticus* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1).

A işletmesinden temin edilen hasta balık örneklerinden yapılan bakteriyolojik ekimler sonucu hasta balık örneklerinin böbreklerinden izole edilen ve O/129'a dirençli, arjinin, jelatin ve ONPG testlerinde pozitif ve ornitrin, indol, VP, üre ve sitrat testlerinde negatif sonuç veren, 4°C'de sıcaklıkta ve %0-3 tuzlulukta üreyebilen 11 no' lu izolat ise *Aeromonas schubertii* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1).

A işletmesinden temin edilen hasta levrek balığı örneklerinin karaciğerinden izole edilen ve TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan, arjinin testinde pozitif, lizin ve ornitrin testinde negatif, indol ve VP testinde pozitif sonuç veren, üre test sonucu negatif, sitrat test sonucu pozitif olan, 4 °C sıcaklıkta üreyebilen, %8 tuzlulukta üreyemeyen 6 no' lu izolat *V. splendidus* I olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1).

A işletmesinden temin edilen hasta levrek balığı örneklerinin böbreklerinden izole edilen ve TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan arjinin testinde negatif, lizin ve ornitrin ve indol testlerinde pozitif, VP, üre ve sitrat testlerinde negatif sonuç veren, 4°C sıcaklıkta ve %10 tuzlulukta üremeyen 7 no' lu izolat *V. harveyi* olarak; bu izolat ile benzer özelliklere sahip fakat üre testinde pozitif, sonuç veren ve 4°C'de sıcaklıkta üreyebilen 8 no' lu izolat ise *V. orientalis* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1).

B işletmesinden temin edilen hasta levrek balığı örneklerinin böbreğinden izole edilen ve O/129'a dirençli, arjinin, jelatin ve ONPG testlerinde pozitif ve ornitrin indol, VP, üre ve sitrat testlerinde negatif sonuç veren, 4°C'de sıcaklıkta ve %0-3 tuzlulukta üreyebilen 12 no' lu izolat ise *Aeromonas schubertii* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1).

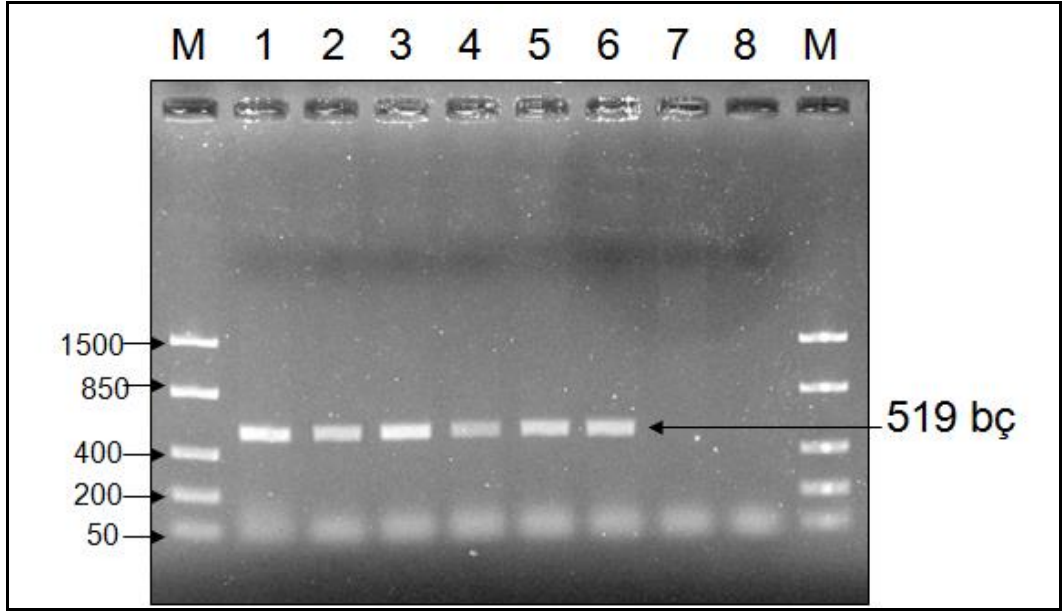
Ayrıca tüm izolatlar jelatin hidrolizi deneyinde pozitif sonuç verirken sadece *V. mediterranei* olarak izole ve tanımlanmış izolat negatif sonuç vermiştir. Aynı şekilde nitrat indirgenmesi deneyinde tüm izolatlar pozitif sonuç verirken sadece *V. splendidus* I negatif sonuç vermiştir.

4.3. PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROS JEL ELEKTROFOREZ BULGULARI

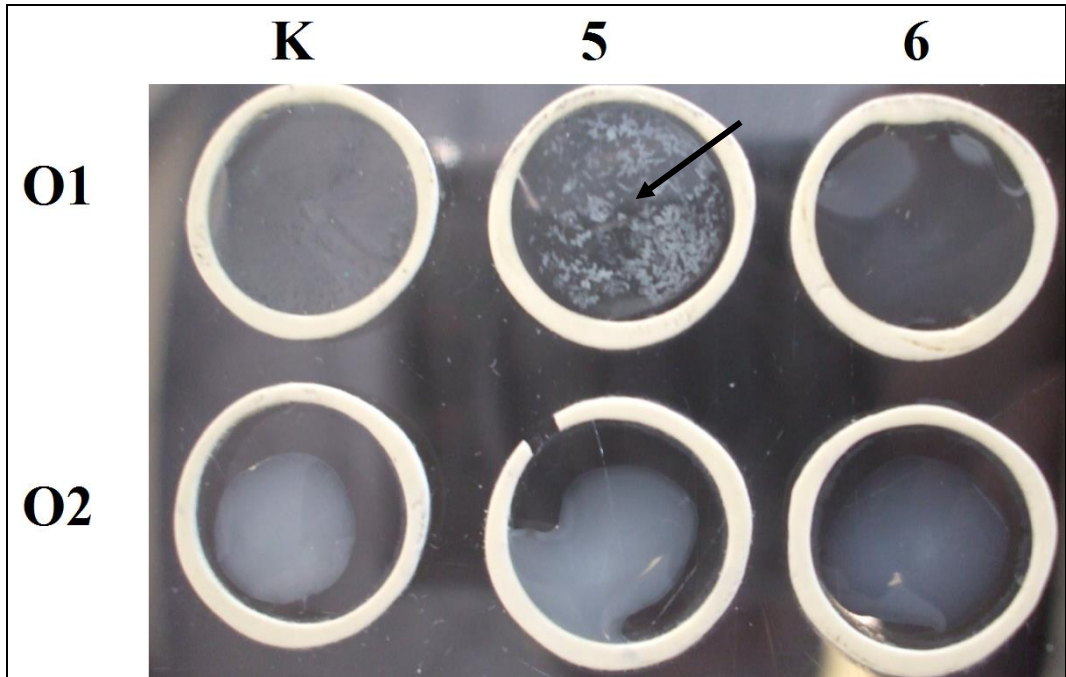
Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen bakterilerden DNA izolasyonu yapılarak *V. anguillarum* şüpheli izolatlarının PCR yöntemi ile tanımlanması yapılmıştır. Bunun için *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genine ait 519 bp'lik kısmı çoğaltmaya yarayan *rpoN-ang5'* isimli 5'-GTTC-ATAGCATCAATGAGGAG-3' ileri ve *rpoN-ang3'* isimli 5'-GAGCAGACAATATGTTGGATG-3' geri primerleri kullanılarak (Gonzales ve diğ., 2003) uygulanan PCR yöntemi sonrası oluşan ürünler % 1'lik agaros jele yüklenerek elektroforez ile yürütülmüş ve 519 bp'lik *rpoN* gen parçasının çoğalıp çoğalmadığı incelenmiştir. Görüntülenen jelde DNA ağırlık markırı olarak 50-1500 baz çiftli ladder kullanılmış ve bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen sadece 4 ve 5 no' lu izolatlarda 519 baz çiftli DNA parçasının çoğaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.24). Ayrıca yapılan biyokimyasal testler sonucu *V. anguillarum* olarak izole ve tanımlanmış izolatın ise 519 bazlık gen parçası çoğaltımı yapılamadığı ve bundan dolayı *V. anguillarum* olmadığı tespit edilmiştir.

4.4. LAM AGLÜTİNASYON BULGULARI

İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan ve kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no' lu *V. anguillarum* izolatları yanı sıra bu çalışmadaki hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum* şüpheli 5 adet izolat *V. anguillarum* O1, O2 ve O3 serotiplerini içeren antiserumlar kullanılarak lam aglütinasyon testi gerçekleştirilmiştir. Bu test sonucunda 1, 2 ve 3 no' lu *V. anguillarum* izolatları ve hasta levrek balıklarından izole edilen 4 ve 5 no' lu *V. anguillarum* izolatları; *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş serumla reaksiyona girdiği ve çökelme oluşumu gözlemlendiği ancak incelenen tüm bakterilerin *V. anguillarum* O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilmiş antiserumlarla herhangi bir reaksiyona girmediği görülmüştür. Şekil 4.25'te ise sadece 5 no' lu izolata ait lam aglütinasyon testi sonuçları görülmektedir. 6 numaralı izolat bu çalışmadaki *V. splendidus* I bakterisine aittir.



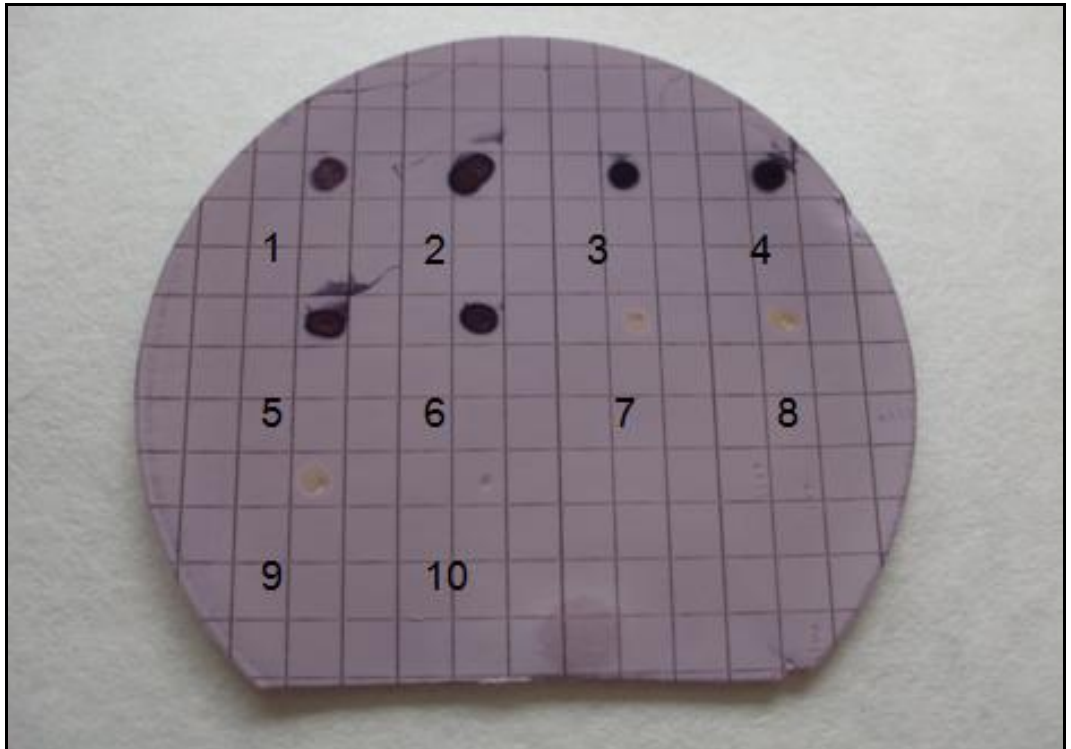
Şekil 4.23: PCR ürünlerinin agaroz jelde analizi (M: 50bp DNA Ladder plus, 1: R82 (+) kontrol, 2: 1 no'lu izolat, 3: 2 no'lu izolat, 4: 3 no'lu izolat, 5: 4 no'lu izolat, 6: 5 no'lu izolat, 7: 6 no'lu izolat, 8: (-) kontrol no' lu suşlara ait sonuçlar).



Şekil 4.24: *V. anguillarum* O1 ve O2 serotiplerine karşı antiserum kullanılarak gerçekleştirilen lam aglütinasyon testinde 5 no' lu izolat tarafından türün O1 serotipi antiserumuna karşı oluşturulan pozitif reaksiyon (okla gösterilmiştir) K: negatif kontrol, O1: *V. anguillarum* serotip O1, O2: *V. anguillarum* serotip O2.

4.5. DOT-BLOT BULGULARI

Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen 4 ve 5 no' lu *V. anguillarum* izolatları ve 9, 10, 17 no' lu izolatlar yanı sıra fakültemizin Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan ve kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no' lu *V. anguillarum* izolatları olmak üzere 5 adet izolata R82 kodlu *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş olan poliklonal serumlar kullanılarak Dot-Blot testi uygulanmıştır. Dot-blot testi sonucunda; levrek balıklarından izole edilen ve PCR ile konfirmasyonu yapılan 4 ve 5 no' lu *V. anguillarum* izolatları ve kültür çipura balıklarından izole edilen 3 adet bakterinin *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş poliklonal serumla reaksiyona girdiği ve pozitif reaksiyonu göstergesi olan nitroselüloz membranda nokta şeklinde mor renk oluşumu (leke) gözlenmiştir (Şekil 4.26). Dot blot tekniği kullanılarak *V. anguillarum* olarak izole ve identifiye edilen bakterilerin konfirmasyonu yapılmasının yanı sıra *V. anguillarum* izolatlarının serotip O1 oldukları tespit edilmiştir.

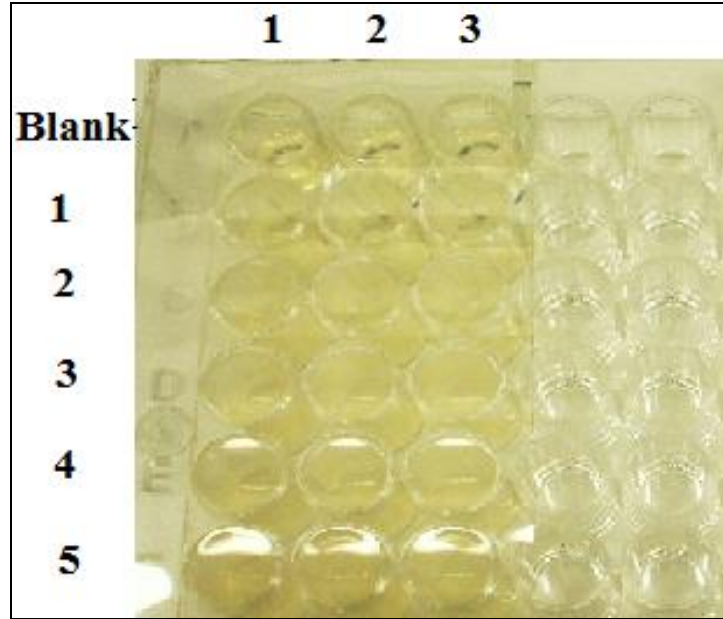


Şekil 4.25: Dot-blot testinde kullanılan nitroselüloz membranda izolatlara ait nokta şeklinde mor renk oluşumu (1: R82 kodlu (+) kontrol, 2: 1 no'lu izolat, 3: 2 no'lu izolat, 4: 3 no'lu izolat, 5: 4 no'lu izolat, 6: 5 no'lu izolat, 7: 6 no'lu izolat, 8: 10 no'lu izolat, 9: 9 no'lu izolat, 10: PBS (-) içeren negatif kontrol).

4.6. BİYOFİLM BULGULARI

İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no' lu *V. anguillarum* suşları ve bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole ve identifiye edilen 2 adet *V. anguillarum* izolatının (4 ve 5 no' lu) biyofilm oluşturma yetenekleri incelenmiştir. 20°C' de inkübe edilen ELISA plakları 2., 3. ve 4. gün sonunda (Şekil 4.26) spektrofotometrede 595 nm'de ölçülen optik yoğunluklarının ortalama değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

Şekil 4.26'deki ELISA plağında görüldüğü gibi sıvı besiyerinde üretilen bakterilerin ilk 3 sütundaki kuyucuklarının tamamının krem renkli olduğu gözlenirken bakteri içermeyen ELISA plağının diğer sütunlarına ait kuyucukların renginin şeffaf olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.26: ELISA plağının 2., 3. ve 4. gündeki görünümü.

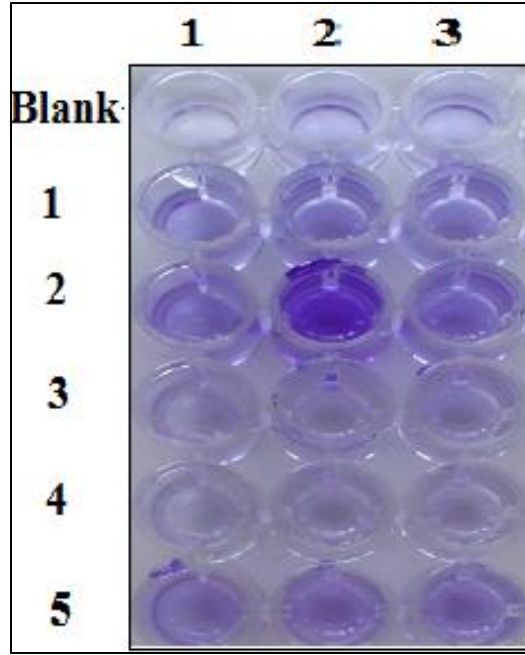
Sıvı besiyerinde üreyen ve ELISA plağında krem renkli görülen bakterilerin 595 nm'deki OD'leri Tablo 4.2'de görüldüğü gibi 2., 3. ve 4. günlerde 0.36 ile 0.45 arasında

değişen değerler gösterirken negatif kontrol örneği olarak kullanılan (Blank) kuyucukların OD değerlerinin ortalama 0.039 olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.2: LB (Luria Bertani Broth) üreyen bakterilerin ELISA plağındaki optik yoğunluk (OD) değerleri

<i>V. anguillarum</i> izolatlarına ait kodlar	2.Gün OD Ortalama	3.Gün OD Ortalama	4.Gün OD Ortalama
Blank	0.043	0.050	0.038
1	0.466	0.455	0.450
2	0.411	0.408	0.363
3	0.419	0.414	0.382
4	0.456	0.393	0.361
5	0.462	0.401	0.374

ELISA plağının kuyucuklarında bulunan bakteri örneklerinin kristal viyole, etanol/aseton karışımlarını içeren protokole maruz kalması sonucu ve mor rengin gözlenmesi (Şekil 4.27) aynı optik yoğunluklarının ortalama değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Yapılan ölçümler sonucu bu protokolün uygulanmasından sonra elde edilen sonuçların (Şekil 4.26) ve Tablo 4.2’ de farklı olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin yüzeye yapışma yeteneğine ve biyofilm oluşturma özelliğine göre bazı kuyucukların renginin daha koyu mor, diğerlerinin ise daha açık renkte olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.27).



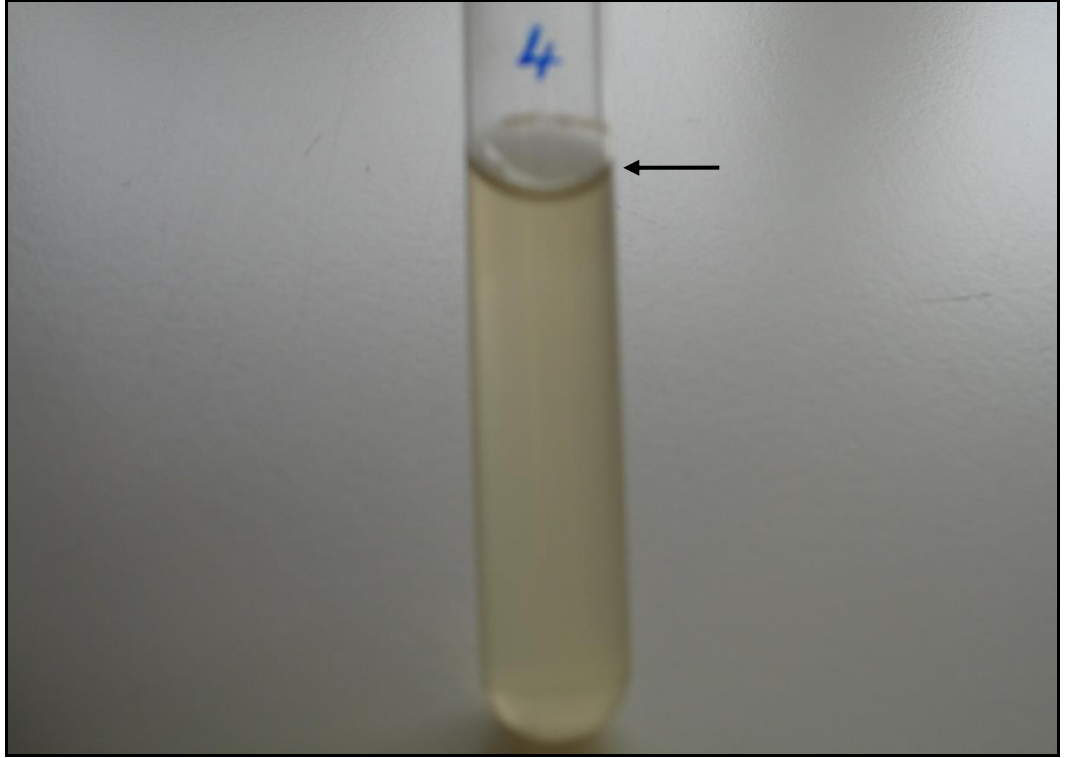
Şekil 4.27: ELISA plağının kristal viyole içeren protokolün uygulanmasından sonraki görünümü.

Tablo 4.3: Kristal Viyole ile renklenen ELISA plağındaki optik yoğunluk (OD) değerleri

<i>V. anguillarum</i> izolatlarına ait kodlar	2.Gün OD Ortalama	3.Gün OD Ortalama	4.Gün OD Ortalama
Blank	0.093	0.068	0.083
1	0.407	0.369	0.223
2	0.492	0.829	0.241
3	0.170	0.180	0.134
4	0.234	0.150	0.119
5	0.305	0.370	0.165

Biyofilm oluşumu ile ilgili yürütülen bu çalışmada ELISA plağının kuyucuklarında bulunan ve kristal viyole ile renklendirilmiş *Vibrio anguillarum* izolatlarının OD değerlerinin 0.11 ile 0.82 arasında değişen değerler gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Ayrıca *V. anguillarum* izolatlarının sıvı-hava ara yüzeyinde biyofilm oluşumunu belirlemek için yapılan pelikül oluşturma yeteneği ile ilgili çalışma sonucunda da yalnızca 5 numaralı (4 kodlu) izolatın pelikül oluşturduğu (Şekil 4.28); İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür koleksiyonlarında bulunan kültür çipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no' lu *V. anguillarum* suşları ve bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole ve identifiye edilen 4 no' lu *V. anguillarum* izolatının ise pelikül oluşturmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.28: 5 no'lu izolata ait pelikül oluşumu (okla gösterilmiştir).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vibriosis, dünya üzerindeki kültürü yapılan levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*) yüksek mortaliteye neden olan en önemli bakteriyel hastalıklardandır ve hastalığa neden olan farklı *Vibrio* türleri mevcuttur (Toranzo ve Barja, 1990; Actis ve diğ., 1999; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2012). Vibriosisin en önemli ve en yaygın patojeni olan *V. anguillarum*'un teşhisinde mikrobiyolojik teknikler yanı sıra günümüzde çeşitli serolojik ve moleküler teknikler kullanılmaktadır (Austin ve Austin, 2012). Yurdumuzdaki hasta kültür levrek balıklarından çeşitli araştırmacılar tarafından *V. anguillarum* (Candan, 1991; Çağırğan, 1993; Tanrıkul ve diğ., 2004; Çağırğan, 2004; Güralp, 2012; Aydın, 2013) ve farklı *Vibrio* türleri (Tanrıkul ve diğ., 2004; Akaylı ve Korun, 2004; Güralp, 2012) biyokimyasal, PCR ve immunohistokimyasal teknikler kullanılarak izole ve identifiye edilmiştir. Bu çalışma ile Ege Bölgesi'nde kültürü yapılan hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum*'un biyokimyasal testler ve PCR ile teşhisi yapılmış, aglütinasyon ve Dot-blot teknikleri ile serotipi belirlenmiş ve biofilm oluşumu incelenmiştir.

2011 yılının ağustos ayında Türkiye'nin Ege Bölgesi'ndeki 2 adet (A ve B işletmesi) farklı levrek balığı işletmesinden temin edilen ve hastalık belirtisi gösteren, boyları 17-22 cm ve ağırlıkları 150-200 g arasında değişen ve bu araştırmada kullanılan kültür levrek balığı örneklerinde diğer araştırmacıların bildirdiği gibi A işletmesindeki hasta levrek balıklarında eksternal olarak görülen vücut üzerinde hemorajiler, deri renginde koyulaşma, baş ve operkulumda görülen küçük hemorajik lezyonlar ve karın içinde sıvı birikimi gibi benzer klinik bulgular gözlenirken (Demircan, 2004; Rodger, 2010; Güralp, 2012; Aydın, 2012; Austin ve Austin, 2012) incelediğimiz balıkların solungaçlarının solgun ve anemik olmadığı aksine hemorajik olduğu dikkati çekmiştir. B işletmesinde ise eksternal olarak yapılan incelemede vücut yüzeyinde seyrek peteşiyal hemoraji ile birlikte aşırı derecede mukus salgısı, pullarda dökülme, gözlerde hafif ekzoftalmus, yüzgeçlerde erime, pelvik yüzgeçlerin diplerinde hemoraji, operkulum üzerinde hemorajik lezyonlar ve abdomende şişkinlik, deri ve yüzgeç diplerinde görülen

hemorajiler de diğer araştırcıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir (Colorni ve diğ., 1981; Actis ve diğ., 1999; Roberts, 2012; Aydın, 2012).

A işletmesindeki hasta balıklarda internal olarak karın içerisinde sıvı birikimi (ascites), karaciğerde yaygın hemoraji ve hipereminin yanı sıra renginin solgun olduğu; hiperemik bağırsak duvarında incelme ve şeffaşlaşma ve dalakta büyüme (hipertrofi) gibi bulgular diğer araştırcıların bulgularıyla benzerlik göstermiştir (Candan 1991; ağırgan, 1993; Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999; LeBretton, 1999; Güralp, 2012; Austin ve Austin, 2012). Demircan (2004) ve Aydın (2012)'nın hasta levrek balıklarında gözlediği bağırsak içinde beyaz, opak ve mukoid madde birikimi ve *Vibrio anguillarum* ile enfekte hasta balıklarda dalak, böbrek ve karaciğer gibi iç organlarda gözlenen hipertrofi (Austin, 2012) incelediğimiz balık örneklerinin sadece dalağında gözlenmiştir.

B işletmesinde internal olarak ise karın içerisinde sıvı birikimi (ascites), karaciğerde solgunluk yanısıra hemoraji, böbreklerde erime, dalakta büyüme (hipertrofi), visceral organlar arasında yağlanma ve bağırsak içinde sarı renkli sıvı birikimi gibi klinik tablolar pek çok araştırmacının bildirdiği tipik vibriosis belirtilerine benzerlik göstermektedir (Candan 1991; ağırgan, 1993; Inglis ve diğ., 1993; Actis ve diğ., 1999; LeBretton, 1999; Demircan, 2004; Aydın, 2012; Güralp, 2012; Austin ve Austin, 2012).

İncelenen hasta levrek balıklarının iç organları olan karaciğer, böbrek ve dalaktan TSA, TCBS ve VAM gibi seçici besiyerlerine yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda balık patojeni olan toplam 9 adet bakteri izolatu incelenmiştir. Bu alışmada 4 (A işletmesi) ve 5 no'lu (B işletmesi) iki izolat, bakteriyolojik ekimler sonrasında % 1,5'luk NaCl içeren TSA besiyerinde sarı-krem renkli koloni oluşturması, O/129'a hassas olmaları, TCBS'de sarı renkli koloniler üretmeleri, kanlı agarda β -hemoliz yapmaları, arjinin pozitif, lizin ve ornitrin negatif, indol, VP ve ONPG test sonuçlarının pozitif olması gibi özellikleri ve diğer araştırcıların bildirdiği sonuçlarla benzerlik göstermiştir (Actis ve diğ., 1999; Noga, 2000; Buller 2004; Noguerola ve Blanch, 2008; Austin ve Austin, 2012). Ancak çoğu araştırcı tarafından pozitif olarak değerlendirilen arabinoz testinin incelediğimiz izolatlarda zayıf reaksiyon verdiği dikkati çekmiştir (Knappskog ve diğ., 1993). Ayrıca Alsina ve diğerlerinin (1994) bildirdiği gibi bu iki bakteri *V. anguillarum*

Medium besiyerlerinde sarı renkli koloniler şeklinde ürediği saptanmıştır. Bu iki izolatın dışındaki A işletmesindeki hasta balıklardan elde edilen 6 adet izolat yapılan bakteriyolojik incelemeler sonucunda *V. splendidus* I, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *V. mediterranei*, *V. alginolyticus* ve *A. schubertii* olarak adlandırılırken B işletmesindeki 12 no'lu izolatta *A. schubertii* olarak izole ve identifiye edilmiştir. Çalışmada incelenen 8 adet hasta levrek balığı örneklerinin tümünden yoğun şekilde ve bazı olgularda birden fazla türde bakteri izole ve identifiye edilerek, Ege bölgesindeki yetiştiriciliği yapılan hasta levrek balıklarından karma enfeksiyonlar teşhis edilmiştir.

Moleküler tekniklerden olan PCR yöntemi, hızlı sonuç vermesi ve biyokimyasal analiz sonuçları birbirine çok benzer türlerin ayırt edilmesinde hassas sonuçlar vermesi nedeniyle balık patojenlerinin tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Hiney ve Smith, 1998; Nielsen ve diğ., 2001; Gonzales ve diğ., 2003). Son yıllarda çeşitli araştırmacılar *Vibrio anguillarum*'a özgü 519 bazlık *rpoN* genini kullanarak bu bakterinin genetik tanısını yapmışlardır (Wiik ve diğ., 1995; Hirono ve diğ., 1996; Gonzales ve diğ., 2003; Liu ve diğ., 2004; Demircan ve Candan, 2006). Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen ve bakteriyolojik yöntemler kullanılarak *Vibrio anguillarum* olarak identifiye edilen izolatların moleküler identifikasyonu için *rpoN* genine ait *rpoN-ang5'* isimli 5'-GTTC-ATAGCATCAATGAGGAG-3' ileri ve *rpoN-ang3'* isimli 5'-GAGCAGACAATATGTTGGATG-3' geri primerleri kullanılarak uygulanan PCR yöntemi sonrası oluşan ürünler % 1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve diğer araştırmacıların (Gonzalez ve diğ., 2003; Demircan ve Candan, 2006; Vaseeharan ve diğ., 2008) bildirdiği gibi 519 bp'lik *rpoN* gen parçasının sadece hasta levrek balıklarından izole edilen 4 ve 5 no'lu izolatlarda 519 baz çiftli DNA parçasının çoğaltığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre yurdumuzdaki levrek balıklarındaki *V. anguillarum*'un genetik tanısında kullandığımız PCR tekniğinin farklı araştırmacıların belirttiği gibi güvenilir ve hızlı bir teknik olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır (Demircan, 2004; Güralp, 2012; Ercan ve diğ., 2013).

V. anguillarum'un 23 farklı serotipi mevcuttur ve bu serotiplerinden daha çok O1, O2 ve O3'ün balıklarda patojen özellik gösterdiği bildirilmektedir (Toranzo ve Barja, 1990; Larsen ve diğ., 1994; Toranzo ve diğ., 1997; Pedersen ve diğ., 1999; Buchholtz ve diğ., 2006; Silva-Rubio ve diğ., 2008). Bu bakterinin serotiplendirmesinde kullanılan

tekniklerden birisi aglütinasyon tekniğidir (Pacha ve Kiehn, 1969; Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve diğ., 1987; Knapsskog ve diğ., 1993). Bu çalışmada gerçekleştirilen lam aglütinasyon testinde *V. anguillarum* olarak adlandırılan pozitif kontrol bakterileri ve hasta levrek balıklarından izole edilen, biyokimyasal testler ve PCR tekniğiyle *V. anguillarum* olarak adlandırılan 4 ve 5 no'lu izolatların *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş olan antiserumla reaksiyona girerek çökelme reaksiyonu oluşturduğu gözlenirken, adı geçen bakterilerin *V. anguillarum* O2 ve O3 serotiplerini içeren antiserumlara karşı herhangi bir reaksiyon göstermemiştir. Bu veriler Santos ve diğ., (1995)'nın da belirtmiş olduğu gibi lam aglütinasyon testinde *V. anguillarum* serotip O1 suşlarının yalnızca kendi antiserumlarıyla reaksiyona girdiği ve çapraz reaksiyona girmediğini bir kez daha göstermiştir. Bu test sonuçlarına göre *V. anguillarum* serotip O1'in sadece salmonid ve kalkan balıklarının (Egidius ve Andersen, 1978; Myhr ve diğ., 1991; Knapsskog ve diğ., 1993; Larsen ve diğ., 1994) patojeni değil aynı zamanda bir deniz balığı türü olan levrek balıklarında da patojen olduğu Tanrikul (2007)'un bildirdiği gibi tespit edilmiştir.

Dot blot tekniği düşük miktarda antiserum ile çok miktarda örnekle çalışılabilmesi, hızlı ve tekrar edilebilirliğinden dolayı bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde ve bakteriyel patojenlerin serotiplendirilmesinde kullanılan serolojik bir yöntemdir (Cipriano ve diğ., 1985; Toranzo ve diğ., 2005; Silva-Rubio ve diğ., 2008). Bu çalışmadaki nitroselüloz membran üzerinde poliklonal antikor uygulanan Dot-Blot testinde; 3 adet farklı *Vibrio* türünün (9, 10 ve 17 no'lu izolatlar) herhangi bir reaksiyon vermediği; 2 adet levrek balığından izole edilen *V. anguillarum* izolatının (4 ve 5 no'lu izolatlar) ve 3 adet pozitif kontrol bakterisinin (1, 2 ve 3 no'lu izolatlar) poliklonal serumla reaksiyona girmesi sonucu nitroselüloz membranda mor renk oluşumu (leke) gözlenmiş ve sonuç olarak bu izolatlar serotip O1 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki veriler göstermiştir ki; dot blot tekniği *V. anguillarum*'un serotiplerinin belirlenmesinde, benzerlik gösteren suşların ayırt edilmesinde ve çok sayıda örneğin tekrarlı bir şekilde incelenmesinde kullanılabilecek hassas bir yöntemdir (Cipriano ve diğ. 1985; Sorensen ve Larsen, 1986; Bolinches ve diğ., 1990; Santos ve diğ., 1995; Silva-Rubio ve diğ., 2008).

Biofilm oluşturma yeteneğine sahip olan Gram-negatif bakteriler besin yokluğu, pH değişiklikleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (Pearson ve diğ., 1995; Hentzer ve diğ., 2004; Defoirdt ve diğ., 2005; Gün ve Ekinci, 2008; Vaseeharan ve diğ., 2008). Bu çalışmada yürütülen biyofilm çalışmasıyla hasta levrek balıklarından izole ve identifiye edilen 2 adet *V. anguillarum* izolatının (4 ve 5 no'lu) ve pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilen, *V. anguillarum* olduğu bilinen 3 adet suşun biyofilm oluşturma yetenekleri için kullanılan ELISA plağında 2., 3. ve 4. gün sonunda öncelikle bakterilerin sıvı besiyerinde üremeleri daha sonra kristal viyole içeren protokole maruz bırakılarak yapılan ölçüm sonucunda da biyofilm oluşumu $0.1 \leq OD_{595} < 1$ değerleri arasında pozitif tespit edilmiş ve $OD_{595} < 0.1$ değerinde olanlar negatif kabul edilmiştir (Wang ve diğ., 2003; Xiano ve diğ., 2009; Abdallah ve diğ., 2009; He ve diğ., 2011). Diğer araştırıcıların (Wang ve diğ., 2003; Defoirdt ve diğ., 2005; You ve diğ., 2007) belirttiği gibi çalışmamızdaki balıklardan izole ve identifiye edilen *V. anguillarum*'un biyofilm yeteneğine sahip olduğu bir kez daha anlaşılmıştır. Dünyada bu etkenin neden olduğu vibriosisin tedavisinde özellikle oksitetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinin sebebinin bakterinin biyofilm özelliğinden kaynaklanan ekstrakromozomal DNA ve direnç plazmidlerinin değerişimine bağlı olarak genetik yapısının değerışmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (You ve diğ., 2007; Lindell, 2012). Yapılan alışmalar sonucunda bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesini önlemek ve bağışıklık sistemini aktif halde tutmak için bakteriler arası iletişim sistemini yani biyofilm oluşumunu bozmak gerektiği fikrine varılmıştır (Pearson ve diğ., 1995; Williams ve diğ., 2000; Hentzer ve diğ., 2002; Lee ve diğ., 2003; Defoirdt ve diğ., 2004, 2005). You ve diğ. (2007), yaptıkları çalışma ile *V. anguillarum*'un Quorum sensing sistemini, virlensini ve biyofilm oluşumunu baskılamak için *Streptomyces albus*'un kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Pelikl oluşumu bakterinin sıvı ortamın yüzeyinde yapışarak oluşturduğu ekstrasellüler biofilm tabakasıdır ve *V. anguillarum*'un serotiplendirilmesinde bakterinin sıvı ortamda pelikül oluşturması da ayırt edici bir özelliktir (Olsen ve Larsen, 1990; Knapsskog ve diğ., 1993). Bu alışmada, *V. anguillarum* izolatlarının sıvı-hava ara yüzeyinde biyofilm oluşumunu belirlemek için yapılan pelikül oluşturma yeteneği ile ilgili yapılan çalışma sonucunda yalnızca 5 no'lu *V. anguillarum* izolatının pelikül oluşturduğu; İ.. Su rnleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı kültür

koleksiyonlarında bulunan kültür ipura balıklarından izole edilen 1, 2 ve 3 no'lu *V. anguillarum* suşları ile bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole ve identifiye edilen 4 no'lu *V. anguillarum* izolatının ise pelikül oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Bu alışma ile A işletmesindeki hasta levrek balıklarından izole edilen 4 no'lu izolat biyokimyasal testler ve PCR sonucuna göre *V. anguillarum* olarak identifiye edilirken, serolojik olarak serotipinin O1 olduğu tespit edilmiş ancak bu bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğinin olmadığı gözlenmiştir. B işletmesindeki hasta balıklardan izole edilen 5 no'lu izolatta kültür yöntemleri ve PCR sonucuna göre *V. anguillarum* olarak identifiye edilmiş, serotipi O1 olarak belirlenmiş ve adı geçen bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada referans kontrol bakterisi olarak kullanılan 1, 2 ve 3 no'lu bakterilerin de serotipinin O1 olduğu ve biyofilm oluşturduğu dikkati çekmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile 2011 yılında Ege Bölgesindeki çiftliklerde yetiştirilen hasta kültür levrek balıklarından yapılan bakteriyolojik ekimler sonucu üreyen bakteriler kültüre dayalı yöntemler ve moleküler yöntemlerden olan PCR tekniğine göre *V. anguillarum* olarak izole ve identifiye edilmiştir. Bu bakterinin aglütinasyon testi ile serotipinin O1 olduğu belirlenirken, Dot-Blot testi ile konfirme edilmiş, bu çalışmadan izole edilen 2 adet *V. anguillarum* izolatının ve referans *V. anguillarum* suşlarının ELISA plağında biyofilm oluşturma yeteneği incelenmiş ve bir izolatın sıvı-hava ara yüzeyinde pelikül oluşturduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., Bakhrouf, A., 2009, Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio Parahaemolyticus*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 394-398.
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, J.H., 1999, *Vibriosis*, Fish Diseases and Disorders, In: Woo, P. T. K. and Bruno, D.W. (ed.), Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, CAB International Publication, UK, ISBN: 0 85199 194 7, 523-558.
- Adams, A., 1992, *Sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect and quantify bacterial pathogens in fish tissue*, Techniques in fish immunology, In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L. and Rowley, A.F. (ed.), Fitc 2, Sos Publication, USA, ISBN-10: 0962550531.
- Ağaçfıdan, A. ve Badur, S., 2002, *Antijen-antikor reaksiyonları ve indirekt tanı yöntemleri*, Tıbbi Mikrobiyoloji, In: Bozkaya, E. (ed.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, ISBN: 9789754202304, 304 sy.
- Akan, M., Yıldız, H., İzgür, M., Atay, D., 1996, A case of Vibriosis caused by *Vibrio anguillarum* in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Journal of Health Sciences of Yüzüncü Yıl University*, 2(1-2), 40-43.
- Akaylı, T., 2001, *Kültür çipura balıklarında (Sparus aurata, L., 1758) Vibriosis'in ELISA ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi*, Doktora tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Akşiray, F., 1987, *Türkiye Deniz Balıkları ve Tayin Anahtarı*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 3490, İstanbul.
- Allison, D. G., 2003, The biofilm matrix, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 19 (2), 139-150.
- Alpbaz, A., 2005, *Su Ürünleri Yetiştiriciliği*, Alp Yayınevi, İzmir, ISBN: 9759705613.
- Alsina, M., Martinez-Picado, J., Jofre, J., Blanch, A. R., 1994, A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (5): 1681-1683.

- Altun, H.U. ve Şener B., 2008, Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39 (2), 82-8.
- Anderson, D.P., 1974, *Fish Immunology*, T.F.H. Publications Inc. Ltd., New Jersey, USA, 0-87666-036-7.
- Anderson, J.W. and Conroy, D.A., 1970, *Vibrio diseases in fishes*, A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes In: Snieszko, S.F. (ed.), Washington, D.C., American Fisheries Society, Special Publication No. 5, ISBN: 19712201378, 266-272.
- Arı, Ş., 2004, *DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması*, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Genişletilmiş 2. baskı, In: Temizkan, G. ve Arda, N. (ed.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, ISBN: 9754203474, 101-117.
- Arkoosh, M.R. and Kaattari, L.S., 1990, *Quantitation of fish antibody to a specific antigen by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*, Fish Immunology Technical Communications-1 (FITC), In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. (ed.), SOS Publication, USA, ISBN: 0-9625505-0-7.
- Athanassopoulou, F., Sabatakou, O., Groman, D., Prapas, T., 1999, First incidence of Rickettsia-like infections in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) in Greece, *European Association of Fish Pathologist 9th International Conference 'Disease of Fish and ShellFish' Abstract Book*, 19-24 September 1999, Rhodes, Greece, 72.
- Austin, B. and Austin, D. A., 2012, *Bacterial Fish Pathogens*, Springer Dordrecht Heidelberg, New York, London, ISBN: 978-94-007-4884-2.
- Austin, B. and Lee, J.V., 1992, *Aeromonadaceae and Vibrionaceae*, Identification methods in applied and environmental microbiology (Technical Series of the Society for Applied Bacteriology), In: Board, R.G., Jones, D. and Skinner, F.A. (ed.), book 29, Blackwell, London, ISBN: 0632033797, 163-182.
- Avcı, H., Birincioğlu, S., Epikmen, E. T., Dereli, M., 2013, Comparative histopathological and immunohistochemical evaluations in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) naturally infected with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164 (2), 72-79.

- Avcı, H., Birincioğlu, Çağırğan, H., 2012, Pathological and immunohistochemical investigations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) experimentally infected with *Vibrio anguillarum*, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 163 (1), 31-39.
- Avendano Herrera, R., Magarinos, B., Lopez-Romalde, S., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 2004, Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes, *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 1-8.
- Avsever, M. L., Onuk, E. E., Türk, N., Tunalıgil, S., Eskiizmirli, S., İnçoğlu, Ş., Yabanlı, M., 2012, Ege bölgesinde kültüre edilen levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipuralardaki (*Sparus aurata*) Pasteurellozis vakaları ve bu vakalardan izole edilen diğer bakteriler. *Bornova Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34 (48), 9-16.
- Aydın, B., 2012, *Kültür balıklarında Vibrio anguillarum'un immunohistokimyasal yöntemlerle teşhisi*. Yüksek Lisans Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Barnabe, G., 1990, Rearing bass and gilthead bream, *Aquaculture*, 2 (4), 647-686.
- Belas, M. R. and Colwell, R. R., 1982, Scanning electron microscope observation of the swarming phenomenon of *Vibrio parahaemolyticus*, *Journal of Bacteriology*, 150 (2), 956.
- Berthe, F.C.J., Michel, C., Bernardet, J.F., 1995, Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France, *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 151-155.
- Bolinches, J., Lemos, M. L., Fouz, B., Cambra, M., Larsen, J. L., Toranzo, A. E., 1990, Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains, *Journal of Aquatic Animal Health*, 2 (1), 21-29.
- Bolinches, J., Toranzo, A.E., Silva, A., Barja, J.L., 1986, Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in Northwestern Spain, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 6, 1-4.
- Breuil, G. and Haffner, P., 1989, A field report on *Vibrio* disease of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the South of France, *Advances in Tropical Aquaculture*, 9, 161-169.

- Buchholtz, C., Nielsen, K. F., Milton, D. L., Larsen, J. L., Gram, L., 2006, Profiling of acylated homoserine lactones of *Vibrio anguillarum* in vitro and in vivo: Influence of growth conditions and serotype, *Systematic and Applied Microbiology*, 29 (6), 433–445.
- Buller, N., 2004, *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*, CABI Publishing, Oxford, İngiltere, ISBN: 0-85199-738-4.
- Bullock, A.M, 1978, *Laboratory Methods*, Fish Pathology, In: Roberts R.J. (ed.), 12, Wiley-Blackwell, London, ISBN: 1444332821, 235-267.
- Candan, A., 1991, *Çipura (Sparus aurata L. 1758) yetiştiriciliğinde mevsimsel olarak görülen hastalık etkenlerinin tespit ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Candan, A., 2002, The first report on the diagnosis of infectious pancreatic necrosis (IPN) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in Turkey, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 22 (1), 41-43.
- Candan, A., Küçüker-Anğ, M., Karataş, S., 1996, Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 16 (5), 195-196.
- Cipriano, R.C., Pyle, J.B., Starliper, C.E., Pyle, S.W., 1985, Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by dot blot assay, *Journal of Wildlife Diseases*, 21, 211-218.
- Colorni, A., 1992, A systemic mycobacteriosis in the European seabass *Dicentrarchus labrax* cultured in Eilat (Red Sea). *Israeli Journal of Aquaculture*, 44 (3), 75-81.
- Colorni, A., 2004, Diseases of Mediterranean fish species: problems, research and prospects, *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, 24 (1), 22-32.
- Colorni, A., Ankaoua, M., Diamant, A., Knibb, W., 1993, Detection of mycobacteriosis in fish using the polymerase chain reaction technique, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 13 (6), 195-198.

- Colorni, A., Diamant, A., Eldar, A., Kvitt, H., Zlotkin, A., 2002, *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes, *Diseases of Aquatic Organisms*, 49 (3), 165-170.
- Colorni, A., Paperna, I., Gordin, H., 1981, Bacterial infections in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) cultured at Elat, *Aquaculture*, 23 (1), 257-267.
- Colorni, A., Ucko, M., Knibb, W., 1996, Epizootiology of *Mycobacterium* spp. in sea bass, sea bream and other commercial fish, *Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects, handbook of contributions and short communications presented at the International Workshop on seabass and seabream culture: problems and prospects*, 16-18 October 1996, Verona, Italy, 259-261.
- Colwell, R.R., 2006, A global and historical perspective of the genus *Vibrio*, *American Society for Microbiology Press*, Washington, DC, USA, 3-11.
- Colwell, R.R. and Grimes, D. J., 1984, *Vibrio* diseases of marine fish populations, *Helgoland Marine Research*, 37 (1-4), 265-287.
- Comps, M., Raymond, J.C., Plassiart, G.N., 1996, *Rickettsia*-like organism infecting juvenile seabass *Dicentrarchus labrax*, *Bulletin European Association Fish Pathology*, 16 (1), 30-33.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H. M., 1995, Microbial biofilms, *Annual Review of Microbiology*, 49 (1), 711-745.
- Cunningham, C.O., 2002, Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control, *Aquaculture*, 206 (1-2), 19-55.
- Çağırğan, H., 1993, *Kültürü yapılan çipura (Sparus aurata L. 1758) ve levrek (Dicentrarchus labrax) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhisi ve tedavisi üzerinde bir araştırma*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çağırğan, H., 2004, Levrek yavrularında (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) vibriosise karşı aşı geliştirilmesi, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21, (3-4), 271-274.
- Çağırğan, H. ve Yüreklitürk, O., 1996, Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma, *Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 21, 113-122.

- Çanak, Ö., 2011, *Kültür çipura (Sparus aurata, L. 1758) balıklarından izole edilen bazı patojen bakterilerin protein profillerinin tespiti*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çeliker, S.A., 2007, Çipura-levrek, *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü*, 9 (16), 1-4.
- Çelikkale, M.S., 1994, *İçsu balıkları ve yetiştiriciliği*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Balıkları Fakültesi, Cilt-1, 2. baskı, TRABZON.
- Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E., Okumuş, D., 1999, Türkiye su ürünleri sektörü potansiyeli, mevcut durumu, sorunları ve çözüm önerileri, İstanbul Ticaret Odası, Yay. No. 1999-2, İstanbul, 975-512-321-0.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2005, The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*, *Environmental Microbiology*, 7 (8), 1239–1247.
- Demircan, D. ve Candan, A., 2006, Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 305-310.
- Demircan, M.D., 2004, *Deniz balıklarında vibriosis'e neden olan Vibrio anguillarum'un PCR yöntemi ile tanısı*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Diamant, A., Banet, A., Ucko, M., Colorni, A., Knibb, W., Kvitt, H., 2000, Mycobacteriosis in wild rabbittish *Siganus rivulatus* associated with cage farming in the gulf of Eilat, Red Sea, *Diseases Aquatic Organisms*, 39, 211-219.
- Douglas-Helders, M., Carson, J., Howard, T., Nowak, B., 2001, Development and validation of a new dot blot test for the detection of *Paramoeba pemaquidensis* (Page) in fish, *Journal of Fish Diseases*, 24 (5), 273-280.
- Doukas, V., Athanassopoulou, F., Karagouni, E., Dotsika, E., 1998, *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and Puntazzo puntazzo Cuvier from the Aegean Sea. *Journal of Fish Diseases*, 21 (4), 317-320.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W., 2002, Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Review*, 15, 167-193.

- Durmaz, R., 2001, *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, Adana.
Fingerman, M. and Nagabhushanam, R. (ed.), Science Publishers, Inc.,
Plymouth, UK, ISBN: 9785010122003, 253-310.
- Ellis, A.E., 1999, Immunity to bacteria in fish, *Fish and Shellfish Immunology*, 9, 291-308.
- Ellis, A.E., 1989, *The immunology of teleost*, Fish Pathology, In: Ellis, A.E., Roberts, R.J. and Tytler P. (ed.), Second Edition, London, Bailliere Tindall, ISBN: 9781444332827, 135-153.
- Engelsen, A.R., Sandlund, N., Fiksdal, I.U., Bergh, O., 2008, Immunohistochemistry of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* expermentially challenged with *Vibrio anguillarum*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 80,13-20.
- Ercan, M. D., Karataş, S., Turgay, E., Kolukirik, M., Ince, O., Ince, B., 2013, Changes in transferrin gene expression in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) challenged with *Vibrio anguillarum*, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37, 141-146.
- Fırat, K. ve Saka, Ş., 2003, Levrek (*Dicentrarchus labrax*) balığının biyolojisi ve yetiştirme teknikleri, <http://akualojistik.com/tr/levrek-baliginin-biyolojisi-ve-yetistirme-teknikleri>, [Ziyaret Tarihi 6 Kasım 2013].
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) [Online]: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en [Ziyaret Tarihi 6 Nisan 2006].
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) [Online]: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en [Ziyaret Tarihi 8 Kasım 2008].
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) [Online]: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en [Ziyaret Tarihi 16 Mayıs 2011].
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) [Online]: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en [Ziyaret Tarihi 7 Temmuz 2013].

- Gildberg, A. ve Mikkelsen, H., 1998, Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*, *Aquaculture*, 167, 103-113.
- Fugua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P., 1994, Minireview: Quorum Sensing in bacteria: the *luxR-luxI* family of cell density-responsive transcriptional regulators, *Journal of Bacteriology*, 176 (2), 269-275.
- Giorgetti, G., 1999, The cost of disease eurofish, *The Fish Veterinary Services Page*, 40-41.
- Gonzalez, S.F., Osorio, C.R., Santos, Y., 2003, Development of a PCR based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples, *Diseases of Aquatic Organisms*, 55, 109-115.
- Gün, İ. ve Ekinçi, F.Y., 2009, Biyofilmler: Yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34 (3), 165-173.
- Güneş, H.V., 2003, *Moleküler Hücre Biyolojisi*, Kaan kitabevi, İstanbul, 1. baskı, ISBN: 975.6787.05.8.
- Güralp, H., 2012, *Deniz kültür balıklarında görülen bakteriyel patojenlerin teşhisi ve antibakteriyel maddelere duyarlılıklarının belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., Simms, J., 2001, The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Research*, 35, 4063-4071.
- He, Y., Xu, T., Fossheim, L.E., Zhang, X-H., 2012, FliC, a flagellin protein, is essential for the growth and virulence of fish pathogen *Edwardsiella tarda*, *Plos One*, 7 (9), 1-7.
- Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B., Parsek, M.R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Høiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M., 2002, Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, *Microbiology*, 148, 87-102.
- Hiney, M.P. and Smith, P.R., 1998, Validation of polymerase chain reaction-based techniques for proxy detection of bacterial fish pathogens: framework, problems and possible solutions for environmental applications (review), *Aquaculture*, 162, 41-68.

- Hirono, I., Masuda, T., Aoki, T., 1996, Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*, *Microbial pathogenesis*, 21, 173-182.
- Hjeltnes, B. and Roberts, R.J., 1993, Vibriosis, *Bacterial Diseases of Fish*, First edition, 107-122.
- Hoff, K. A., 1989, Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities, *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (7), 1775-1786.
- Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R., 1993, *Bacterial Diseases of Fish*, Blackwell Scientific Publications, London, 978-0-6320-3497-0.
- Janssen, W.A. and Surgalla, M.J., 1968, Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*), *Journal of Bacteriology*, 96 (5), 1606-1610.
- Karakaş, H.H. ve Türkoğlu, H., 2005, Su ürünlerinin Dünya'daki ve Türkiye'deki Durumu, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 21-28.
- Karataş, S., Candan, A., Demircan, D., 2005, A typical *Aeromonas* infection in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black sea, *The Israeli Journal of Aquaculture –Bamidgeh*, 57 (4), 255-263.
- Kimberley, A.W. and Macnair, N.G., 2004, *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: techniques and procedures*, Iowa State Press, Iowa, USA, ISBN: 0-8183-1952-0.
- Knappskog, D.H., Rodseth, O.M., Slinde, E., Endersen, C., 1993, Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from Vibriosis, *Journal of Fish Diseases*, 16, 327-338.
- Korun J. ve Timur, G., 2008, Marine vibrios associated with diseased sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Journal of Fisheries Science*, 2 (1), 66-76.
- Korun, J., 2004. *Kültür levrek balıklarında (Dicentrarchus labrax, L.) vibriosis ve pasteurellosis'in bazı diagnostik kitler ve laboratuvar yöntemleri ile teşhisi üzerine bir çalışma*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Korun, J., 2008, A study on extracellular virulence factors of *Vibrio alginolyticus* strains. *Turkish Journal of Biochemistry*, 33, 166-167.

- Korun, J. ve Akaylı, T., 2004, Kültür levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında parazitik bir isopod: *Ceratothoa oestroides* ve sekonder infeksiyonlar olgusu. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 31 (2), 123-132.
- Korun, J., Akgün-Dar, K., Yazıcı, M., 2009, Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured European sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160 (11), 532-536.
- Korun, J., Olgac, V., Akgün-Dar, K., Colorni, A., Diamant, A., 2005, Mycobacteriosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. cultured in Turkey, *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57 (4), 215-222.
- Korun, J. ve Timur, G., 2005, The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at low marine water temperature in Turkey, *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57 (3), 198-207.
- Krantz, G.E., Reddecliff, J.M., Heist, C.E., 1963, Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout, *Journal of Immunology*, 91, 757-760.
- Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W., 2003, *Microbial biofilms (Vol. 5)*, Cambridge University Pres, Cambridge, UK, ISBN: 0 521 45412 3, 1-301.
- Larsen, J.L., Pedersen, K., Dalsgaard, I., 1994, *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish, *Journal of Fish Diseases*, 17, 259–267.
- Le Breton, A.D., 1999, Mediterranean finfish pathologies: Present status and new developments in prophylactic methods, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 19 (6), 250-253.
- Lee, Y. K., Kwon, K. K., Cho, K. H., Kim, H. W., Park, J. H., Lee, H. K., 2003, Culture and identification of bacteria from marine biofilms, *Journal of Microbiology-Seoul-*, 41 (3), 183-188.
- Lindell, K., 2012, *Cell-to-Cell communication and virulence in Vibrio anguillarum*, Thesis (PhD), Umea University, Sweden.
- Liu, Q., Ma, Y., Wu, H., Shao, M., Lui, H., Zhang, Y., 2004, Cloning, identification and expression of an *entE* homologue *angE* from *Vibrio anguillarum* serotype O1, *Archive Microbiology*, 181, 287-293.

- Mandrell, R.E. and Zollinger, W.D., 1977, Lipopolysaccharide serotyping of *Eisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition, *Infection and Immunity*, 16 (2), 471-475.
- McDowell, M.T. and Colwell, R.R., 1985, Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation for two new genera *Listonella* and *Shewanella*, *Systematic Applied Microbiology*, 6, 171-182.
- Memiş, D., 2010, *Deniz balıkları yetiştiriciliği*, Filiz Kitabevi Basım Yayın Dağıtım, İstanbul, ISBN: 987-975-368-328-9.
- Merrick, M., 1993, In a class of its own – the RNA Polymerase Sigma Factor σ^{54} (σ^N), *Molecular Microbiology*, 10, 903-909.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastri, R., 1999, Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream, Vol.1, *FAO*, Italy, 92-5-104380-9.
- Muroga, K., 1975, Studies on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillicida* infections, *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry*, Hiroshima University, 14, 101-105.
- Myhr, E., Larsen, J. L., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M., Hastein, T., 1991, Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (9), 2750-2757.
- Nagata, E. F. and Eguchi, M., 2003, Survival of *Vibrio anguillarum*, a fish pathogen, in freshwater by forming biofilms, *Microbes Environments*, 18 (4), 196-202.
- Newton, C.R. and Graham, A., 1994, *The Introduction to biotechniques-PCR*, Billington D., UK, BIOS Scientific Publishers.
- Nielsen, M.E., Hoi, L., Schmidt, A. S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., 2001, Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang province of China, *Diseases of Aquatic Organisms*, 446, 23-29.
- Noga, E.J., 2010, *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Second Edition, Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-0697-6.

- Noguerola, I. and Blanch, A. R., 2008, Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys, *Journal of Applied Microbiology*, 105 (1), 175-185.
- O'toole, G., Kaplan, B.H., Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- Olsen, J.E. and Larsen, J.L., 1990, Restriction fragment length polymorphism of the *Vibrio anguillarum* serovar O1 virulence plasmid, *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (10), 3130-3132.
- Pacha, R.E. and Kien, E.D., 1969, Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish: physiology, serology and epidemiology, *Journal of Bacteriology*, 100 (3), 1242-1247.
- Paperna, I., Colorni, A., Gordin, H., Kissil, G. W., 1977, Diseases of *Sparus aurata* in marine culture at Elat, *Aquaculture*, 10 (3), 195-213.
- Paperna, I., Colorni, A., Ross, B., Colorni, B., 1981, Diseases of marine fish cultured in Eilat mariculture project based at the gulf of Aqaba, Red sea, *European Mariculture Society Special Publication*, 6, 81-92.
- Pearson, P.J., Passadori, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P., 1995, A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 92, 1490-1494.
- Pedersen, K., Grisez, L., Van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., Larsen, J. L., 1999, Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups, *Current Microbiology*, 38, 183-189.
- Picado, J.M., Anicet, R.B., Jofre, J., 1994, Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (2), 732-737.
- Plumb, A.J. and Bowser, R.P., 1983, *Microbial fish disease laboratory manual*, Auburn University, Alabama Agricultural Experiment Station, Brown Printing Company, Montgomery, Alabama, 95.
- Rabb, L., Cornick, J.W., McDermott, L.A., 1964, A macroscopic-slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish, *The Progressive Fish-Culturist*, 118-120.

- Reed, A.P. and Francis-Floyd, R., 1996, *Vibrio infections of fish*, Edis, University of Florida, [http: www//edis.ifas.ufl.edu](http://edis.ifas.ufl.edu), [Ziyaret tarihi: 6 Kasım 2012].
- Roberson, B.S., 1990, *Bacterial agglutination*, Fish Immunology Technical Communications-1 (FITC), In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. (ed.), SOS Publication, USA, ISBN: 0-9625505-0-7.
- Roberts, R.J., 2012, *Fish pathology*, 4th Edition, Wiley-Blackwell Publishing Ltd., Fourth Edition, USA. 978-1-4443-3282-7.
- Rodger, H.D., 2010, *Fish Disease Manual*, BVMS, PhD, Vet-Aqua International, Oranmore, Co. Galway, Ireland.
- Romalde, J.L. and Toranzo, A.E., 1999, Streptococcosis of marine fish., In: Olivier, G. (ed.), *ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish*, International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark, No. 56, 1 –8.
- Romalde, J.L. and Toranzo, A.E., 2002, *Molecular approaches for the study and diagnosis of salmonid streptococcosis*, , In: Cunningham C.O. (ed.), *Molecular diagnosis of salmonid diseases*, Kluwer Academic Publication, Netherlands, 211 –223.
- Romalde, S.L., Magariños, B., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., 2003, Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*, *Veterinary Microbiology*, 94 (4), 325-333.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandín, I., Toranzo, A. E., 1995, Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (7), 2493-2498.
- Sechi, L.A., Colorni, A., Dupre, I., Molicotti, P., Fadda, G., Zanetti, S., 2002, Strain variation in Mediterranean and Red sea *Mycobacterium marinum* isolates, *Microbiologica*, 25, 351-356.
- Shimada, T., Arakawa, A.E., Itoh, K., Okitsu, T., Matsushima, A., Asai, Y., Yamai, S., Nakazato, T., Nair, G.B., Albert, M.J., Takeda, Y., 1994, Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*, *Current Microbiology*, 28, 175-178.

- Silva-Rubio, A., Avendaño-Herrera, R., Jaureguiberry, B., Toranzo, A.E., Magariños, B., 2008, First description of serotype O3 in *Vibrio anguillarum* strains isolated from salmonids in Chile, *Journal of Fish Diseases*, 31 (3), 235–239.
- Simidu, U. and Tsukamoto, K., 1985, Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family *Vibrionaceae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (4), 781-790.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G., 1964, *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tide water areas, *Journal of Bacteriology*, 88 (6), 1814-1815.
- Sorensen, U.B.S. and Larsen, J.L., 1986, Serotyping of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51(3), 593-597.
- Sorscher, D.H., 1997, *DNA amplification techniques*, Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian, In: Coleman, W.B. and Tsongalis, G.J. (ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, ISBN: 0-89603-373-2.
- Steiropoulos, N.A., Yüksel, S.A., Thompson, K.D., Adams, A., Ferguson, H.W., 2002, Detection of *Rickettsia*-like organisms (RLOs) in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by immunohistochemistry, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22, 338–343.
- Stevenson, R.M.W. and Daly, J.G., 1982, Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*, *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science*, 39, 870-876.
- Stickney, R.R., 2005, *Aquaculture : An Introductory Text*, CABI Publishing, Texas Sea Grant College Programme, Texas A and M University, Texas, USA, ISBN: 0-85199-081-9.
- Şahrikoğlu, L. ve Candan, A., 2002, Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L.) balıklarında *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonu üzerinde bir araştırma, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 14, 59-70.
- Şen, E., 2007, *Levrek (Dicentrarchus labrax) balıklarında Flexibacter maritimus enfeksiyonu üzerine bir araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Tanrikul, T.T., Çağırğan, H., Tokşen, E., 2004, Identification of isolated *Vibrio* sp. from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) using API 20E system, *Ege University Faculty of Fisheries Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21, 243-247.
- Tanrikul, T.T., 2007, Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (10), 1733-1737.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2008, *Molekuler Biyolojide Kullanılan Yöntemler 3. Baskı*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, ISBN: 9789754205831.
- Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J., 2006, *The Biology of Vibrios*, ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, USA, ISBN: 1-55581-365-8.
- Timur, G., Timur M., Karatas S., Akaylı, T., 1999, *Ichtyophonus hoferi* ile infekte olmuş kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) görülen pasteurellosis hastalığı üzerinde bir çalışma. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, Özel Sayı , 447-453.
- Timur, G. ve Timur, M., 2003, *Balık Hastalıkları*, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No. 5, İstanbul, ISBN: 975-404-699-9.
- Timur, G., Timur, M., Akaylı, T., Korun, J., 2007, Survey study of pathologies affecting farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) and marine cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *13th International Conference of the EAFP "Diseases of Fish and Shellfish"*, 17-22 September 2007, Grado-Italy, 308.
- Timur, G., Timur, M., Akaylı, T., Korun, J., Thompson, K.D., 2005, First observation of rickettsia-like organisms in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25 (5), 196-202.
- Timur G., Erkan M., Yardımcı R., Ercan M., Çanak Ö., Ürkü Ç., 2013, Light and electron microscopic study of *Rickettsia*-like organisms causing systemic granulomas in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 65, 874-880.
- Toranzo, A.E., Baya, A.M., Roberson, B.S., Barja, J.L., Grimes, D.J., Hetrick, F.M., 1987, Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens, *Aquaculture*, 61, 81-97.

- Toranzo, A.E. and Barja, J.L., 1990, A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Northwest of Spain, *Diseases of Aquatic Organisms*, 9, 73– 82.
- Toranzo, A.E., Magarinos, B., Romalde, J.L. 2005, A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture*, 246, 37– 61.
- Toranzo, A.E., Santos, Y., Barja, J.L., 1997, *Immunization with bacterial antigens: Vibrio infections*, Fish Vaccinology, In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F. (ed.), Karger, Basel, Switzerland, 93-105.
- Trust, T., 1986, Pathogenesis of the infectious diseases of fish, *Annual Review of Microbiology*, 40, 479-502.
- TUİK, 2012, *Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK)*, www.tuik.gov.tr [Ziyaret Tarihi 6 Kasım 2013].
- TUİK, 2013, *Türkiye İstatistik Kurumu (TUİK)*, www.tuik.gov.tr [Ziyaret Tarihi 9 Temmuz 2013].
- Türk, N., 2006, Fish Disease, Flexibacteriosis, *Aquaculture and Fisheries*, 2 (5), 53-54.
- Ucko, M., Colorni, A., Kvitt, H., Diamant, A., Zlotkin, A., Knibb, W.R. 2002, Strain variation in *Mycobacterium marinum* fish isolates, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5281-5287.
- Uçal, O. ve Benli, H.A., 1993, Levrek balığı ve yetiştiriciliği, *Bodrum Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, 9.
- Vaseeharan, B., Raffiq Hussian, M., Chen, J. C., 2008, RpoN gene, RAPD profile, antimicrobial resistance and plasmids of *Vibrio anguillarum* isolates from vibriosis infected *Penaeus monodon*, *Letters in Applied Microbiology*, 47 (5), 380-385.
- Wang, Y.S., Lauritz, J., Jass, J., ve Milton, D.L., 2003, Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation, *Microbiology*, 149, 1061–1071.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002, Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, <http://www.sciencemag.org>, [Ziyaret tarihi: 2 Ekim 2012].

- Wiik, R., Stackebrandt, E., Valle, O., Daae, F.L., Rodseth, O.M., Andersen, K., 1995, Classification of fish pathogenic *Vibriosis* based on comparative 16S rRNA analysis, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (3), 421-428.
- Winton, J.R., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1983, *Bacterial and viral diseases of cultured salmonids in the Pacific Northwest*, Bacterial and Viral Diseases of Fish: Molecular Studies, In: Crosa, J.H. (ed.), Seattle, Washington Sea Grant Communications, 1-20.
- Woo, P.T.K., and Bruno, D.W., 1999, *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, CABI publishing, New York, ISBN: 0 85199 194 7.
- Woodward, M.J., Marcjanna, S., Siprigings, A.K., Humphrey, T.J., 2000, The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces, *Journal of Medical Microbiology*, 49, 481-487.
- Xiao, J., Wang, Q., Liu, Q., Xu, L., Wang, X., Wu, H., Zhang, Y., 2009, Characterization of *Edwardsiella tarda* rpoS: effect on serum resistance, chondroitinase activity, biofilm formation, and autoinducer synthetases expression, *Applied Microbiology Biotechnology*, 83, 151–160.
- Yardımcı, E., 2011, *Kültür levrek balıklarından (Dicentrarchus labrax L.) Tenacibaculum maritimum'un identifikasyonunda diyagnostik tekniklerinin karşılaştırılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- You, J.L., Xue, X.L., Cao, L.X., Lu, X., Wang, J., Zhang, L.X., Zhou, S.N., 2007, Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66, *Applied Microbiology Biotechnology*, 76, 1137-1144.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Mehmet DURNA
Uyruğu	T. C.
Doğum tarihi, Yeri	06.04.1985, İSTANBUL
Telefon	0 530 609 64 44
E-mail	memot_61@hotmail.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı / Hastalıklar Programı	2014
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi / Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi	2008
Lise	Pendik Süper Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)	2003