

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE
EDİLEN HAREKETLİ *Aeromonas* TÜRLERİNDE BULUNAN VİRULANS
GENLERİN TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Evrin Beyhan ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2012

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE
EDİLEN HAREKETLİ *Aeromonas* TÜRLERİNDE BULUNAN VİRULANS
GENLERİN TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Evrin Beyhan ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE
EDİLEN HAREKETLİ *Aeromonas* TÜRLERİNDE BULUNAN VİRULANS
GENLERİN TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA**

Evrin Beyhan ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 2010.02.0121.030 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE
EDİLEN HAREKETLİ *Aeromonas* TÜRLERİNDE BULUNAN VİRULANS
GENLERİN TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Evrım Beyhan ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

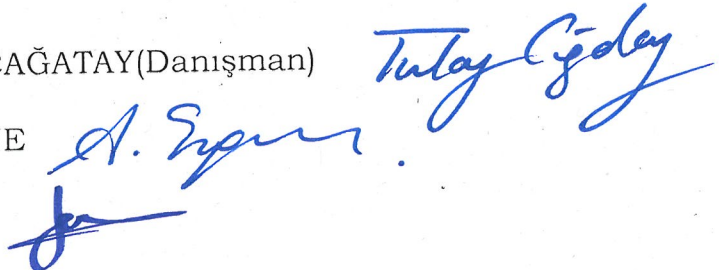
SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 14/02/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (.40) not takdir edilerek Oybirligi/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY(Danışman)

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Doç.Dr. Jale Korun



ÖZET

GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDAN (*Oncorhynchus mykiss*) İZOLE EDİLEN HAREKETLİ *Aeromonas* TÜRLERİNDE BULUNAN VİRULANS GENLERİN TESPİTİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Evrin Beyhan ŞEN

Yüksek lisans Tezi, Su Ürünleri Ana Bilim Dalı

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY
Ocak 2012, 69 Sayfa**

Bu çalışmada, iç su balıkları yetiştiriciliğinin en yoğun yapıldığı bölgelerden biri olan Muğla'nın Fethiye bölgesindeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinde en sık karşılaşılan hastalıklardan biri olan Hareketli *Aeromonas* Septiseminin etkeni olan *Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin gen bölgelerine bakılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile tespiti amaçlanmıştır.

Alabalık çiftliklerinden hastalık belirtisi gösteren balık örnekleri hastalık olduğunda, steril ortamlarda ve soğuk zincir koşullarına uyularak laboratuara getirilmiştir. Balıkların farklı dokularından örnek alınmış ve besiyerlerine ekilmiştir. Hem ekilen hem de direk alınan örneklerden hastalıkla alakalı genlerin tespiti için bakteriyel DNA izolasyonu yapılmıştır. Bakterilerin belirlenmesi için seçilen gen bölgeleri *A. hydrophila* için *Aero ve OmpTS*, *A. veronii* için *tet*, *A.sobria* için *AH* ve *A. caviae* için *F3-B3* gen bölgeleridir. Bu bölgeleri belirlemek için uygun PCR protokolleri seçilmiş ve her bir örnek için uygulanmıştır. PCR uygulaması sonucuda örnekler elektroforezde yürütülmüş ve incelenmiştir.

Bu çalışmanın sonucu olarak hastalık belirtisi gösteren balıkların karaciğer ve böbreklerinden izole edilen *A. hydrophila*, *A.caviae*, *A. veronii*, ve *A. sobria* bakterileri ile referans bakterilerin PCR yöntemi ile çoğaltılması sonucu elde edilen görüntüler eşleşmiştir. Klinik bulgularla desteklenen PCR bulgusu bize Hareketli *Aeromonas* Septisemi' yi doğrulamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Gökkuşığı alabalığı, PCR, Hareketli *Aeromonas* Septisemi.

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. İ. Tülay ÇAĞATAY(Danışman)

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Doç. Dr. Jale Korun

ABSTRACT

DETECTION OF VIRULENCE GENES CAUSE BY MOTILE AEROMONAS SPP. IN RAINBOW TROUT

Evrım Beyhan ŞEN

M. Sc. Thesis in Fisheries and Aquaculture Engineering

Adviser: Assist. Prof. Dr. I.Tulay AĐATAY

January 2012, 69 Pages

In this thesis, we have studied bacterial fish disease as Motile Aeromonas Septicemia caused by *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* and *A. sobria* in Rainbow trout at Muğla (Fethiye) region.

Fish samples have been collected and carried out in cold and sterile conditions from rainbow trout farm as the fish shows symptoms of diseases. The bacterial samples have been collected from different tissues and incubated in steril medium. DNA isolates was made from those samples to detect pathogen gene related to Motile Aeromonas Septicemia. We have selected Aero gene and OmpTS gene from *A. hydrophila*, *tet* gene from *A. veronii*, *F3-B3* gene from *A. caviae* and *AH* gene from *A. sobria* to detect bacteria. PCR was optimised and samples were electrophoresed.

As a result of this study, *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* and *A. sobria* has seen as positive PCR results in liver and kidney tissue.

KEY WORDS: Rainbow trout, PCR, Motile *Aeromonas* Septicemia

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. I. Tulay CAGATAY(Danışman)

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Assoc. Prof. Dr. Jale Korun

ÖNSÖZ

2010 yılı su ürünleri üretimi bir önceki yıla göre %4,83 artarak yaklaşık 653 bin ton olarak gerçekleşmiştir. Üretimin yaklaşık % 61,20'si deniz balıklarından, %7,05'i diğer deniz ürünlerinden, % 6,16'ı iç su ürünlerinden ve %25,59' u iç su yetiştiriciliğinden elde edilmiştir.

2010 yılı itibariyle yaklaşık 68 bin ton Alabalık üretimiyle (TUIK, 2009) Avrupa' da ilk sıralarda yer alan ülkemizde, etkili hastalık kontrolü ve patojenlerin hızlı tayini önem taşımaktadır. Patojenlerin tespitinde farklı geleneksel mikrobiyolojik yöntemler kullanılmaktadır.

Tez konumda iç su balıkları yetiştiriciliğinde en büyük paya sahip olan gökkuşuğu alabalıklarında görülen ve büyük ekonomik kayıplara yol açan Hareketli *Aeromonas* Septisemi hastalığı seçilmiş ve *Aeromonas* türlerinde bulunan virulans genlerin tespiti üzerine bir çalışma yapılmıştır.

Tezim süresince benden yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İ.Tülay ÇAĞATAY' a teşekkür ederim. Öğrencilik sürecinde her fırsatta eğitimimize katkıları olan fakültemizin tüm değerli hocalarına teşekkürlerimi sunmak isterim.

Çalışmamın her aşamasında desteklerini gördüğüm Sayın Uzman Türker BODUR ve Sayın Arş. Gör. Mesut YILMAZ' a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonuna, çalışmalarım süresince imkânlarından yararlandığım Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı Başkanlığına ayrıca her zaman maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan canımdan çok sevdiğim annem, babam ve çalışmalarım süresince bana destek olan tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Türkiye'deki Alabalık Yetiştiriciliği.....	3
2.2. Gökkuşuğu Alabalığı'nın (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Biyolojisi.....	7
2.2.1. Gökkuşuğu alabalığı'nın (<i>O.mykiss</i>) sistematigi.....	8
2.2.2. Gökkuşuğu alabalığı'nın (<i>O.mykiss</i>) morfolojisi ve yetiştiricilik özellikleri.....	8
2.2.3. Gökkuşuğu alabalığı'nın yetiştiriciliğinde karşılaşılan sorunlar.....	11
2.2.4. Gökkuşuğu alabalığı'nda görülen bazı önemli bakteriyel hastalıklar.....	15
2.2.4.1. Furunkulosis.....	16
2.2.4.2. Bakteriyel soğuk su hastalığı	16
2.2.4.3. Enterik Kızık Ağız Hastalığı (Yersiniozis).....	17
2.2.4.4. Bakteriyel böbrek hastalığı.....	18
2.2.4.5. Tuberculosis (Mycobacteriosis).....	19
2.2.4.6. Hareketli aeromonas sepsisemi hakkında genel bilgi.....	20
2.2.4.7. Hareketli aeromonas türlerinin insan sağlığındaki rolü.....	24

2.2.5.	Bakteriyel hastalıkların moleküler teşhisi.....	25
2.3.	<i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın Biyolojisi.....	26
2.3.1.	<i>A. hydrophila</i> 'nın sistematığı.....	26
2.3.2.	<i>A. hydrophila</i> 'nın morfolojisi.....	26
2.4.	<i>Aeromonas veroni</i> 'nin biyolojisi.....	27
2.4.1.	<i>A. veroni</i> 'nin sistematığı.....	27
2.4.2.	<i>A. veroni</i> 'nin morfolojisi.....	27
2.5.	<i>Aeromonas sobria</i> 'nın biyolojisi.....	27
2.5.1.	<i>A. sobria</i> 'nın sistematığı.....	27
2.5.2.	<i>A. sobria</i> 'nın morfolojisi.....	28
2.6.	<i>Aeromonas veroni</i> 'nin biyolojisi.....	28
2.6.1.	<i>A. veroni</i> 'nin sistematığı.....	28
2.6.2.	<i>A. veroni</i> 'nin morfolojisi.....	28
3.	MATERYAL VE METOT.....	29
3.1.	Materyal.....	29
3.1.1.	Araştırmanın yürütüldüğü yer.....	29
3.1.2.	Balık materyalinin temin edildiği yer.....	29
3.1.3.	Hasta balık materyalinin temini.....	29
3.1.4.	Referans bakteri suşlarının temini.....	29
3.1.5.	Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	29
3.1.5.1.	Tripton soy agar besiyeri (TSA).....	29
3.1.5.2.	Tripton soy broth (TSB).....	30
3.1.5.3.	Kanlı agar.....	30
3.1.6.	DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	30
3.1.6.1.	PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar....	32
3.1.6.2.	PCR amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için kullanılan agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler.....	32
3.1.6.3.	Yararlanılan alet ve ekipmanlar.....	32
3.2.	Metot.....	33
3.2.1.	Hasta balık materyallerinin laboratuara getirilmesi.....	33
3.2.2.	Hasta balık materyallerinden alınan	

bakteri izolasyon.....	33
3.2.3. Çalışmada kullanılan referans bakterilerin üretimi.....	34
3.2.4. Bakteriyel DNA izolasyonu.....	34
3.2.5. Bakteriyel DNA'nın kalitatif tayini.....	35
3.2.6. Bakteriyel DNA'nın kantitatif spektrofotometrik tayini....	35
3.2.7. Primerlerin hazırlanması.....	36
3.2.8. Primerlerin Tm sıcaklıklarının hesaplanması.....	37
3.2.9. PCR reaksiyonu ve optimizasyonu.....	37
3.2.9.1. Tez Çalışmasında Kullanılmış Olan Primerlerin PCR Protokolleri.....	39
3.2.10. PCR Amplifikasyon Ürünlerini Görüntülemek İçin Kullanılan Jel Elektroforezi, Boyama ve Görüntüleme....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. Hasta Balık Materyallerinin Klinik Bulguları.....	43
4.2. Referans Bakterilerin Suşlarının Üretimi.....	43
4.3. Hasta Balık Materyallerinden Bakteri İzolasyon Bulguları.....	45
4.4. Referans Bakterilerden Elde Edilen Genomik DNA Ekstraksiyonuna İlişkin Bulgular.....	46
4.5. Balık Materyallerinden İzole Edilen Bakterilerin Genomik DNA Ekstraksiyon Bulguları.....	47
4.6. PCR Uygulamalarına İlişkin Bulgular.....	48
4.6.1.Referans bakterilerin PCR bulguları.....	48
4.6.2.Hasta balık materyalinden izole edilen bakterilerin PCR bulguları.....	51
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ.....	59
7. KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
pH	Hidrojen potansiyeli
gr	Gram
cm	Santimetre
°C	Santigrad derece
rpm	Döngü sayısı
dk	Dakika
Mg	Miligram
bp	Baz Çifti
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 Yetiştiricilik üretiminin türlere göre dağılımı.....	5
Şekil 2.2 İç Su Balıklarının İllere Göre Yetiştiriciliği.....	6
Şekil 2.3. Fethiye haritası.....	7
Şekil 2.4. Gökkuşuğu Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	9
Şekil 4.1. Referans <i>A. hydrophila</i> suşunun TSA Besiyerindeki görüntüsü...43	
Şekil 4.2. Referans <i>A. sobria</i> suşunun TSA Besiyerindeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.3. Referans <i>A. veronii</i> suşunun TSA Besiyerindeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.4. Referans <i>A. caviae</i> suşunun TSA Besiyerindeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. Hasta balık örneğinin böbreğinden alınan bakterilerin petri kabındaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.6. Hasta balık örneğinin karaciğerinden alınan bakterilerin petri kabındaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.7. İzole edilen DNA peleti.....	46
Şekil 4.8. Referans bakterilerden elde edilen genomik DNA izolasyonlarının %1' lik agaroz jelde görüntüleri.....	47
Şekil 4.9. Hasta balık materyallerinden izole edilen bakterilerin elde edilen Genomik DNA ekstraksiyonu bulgularının agaroz jeldeki görüntüsü.....	48
Şekil 4.10. <i>A. hydrophila</i> 'nın <i>OmpTS</i> primeri ile PCR sonucu.....	49
Şekil 4.11. <i>A. hydrophila</i> 'nın <i>Aero</i> primeri ile PCR sonucu.....	49
Şekil 4.12. <i>A. veronii</i> 'nin tet primeri ile PCR sonucu.....	50

Şekil 4.13. <i>A. caviae</i> 'nin tet primeri ile PCR sonucu.....	50
Şekil 4.14. <i>A. sobria</i> 'nın AH primeri ile PCR sonucu.....	51
Şekil 4.15. Hasta balık materyalinin yüzeyi ve iç organlarından alınan örneklerin OmpTS primeri ile PCR reaksiyonu sonucu.....	52
Şekil 4.16. Hasta balık materyalinin yüzeyi ve iç organlarından alınan örneklerin Aero primeri ile PCR reaksiyonu sonucu.....	52
Şekil 4.17. Hasta balık materyalinin yüzeyi ve iç organlarından alınan örneklerin Tet primeri ile PCR reaksiyonu sonucu.....	53
Şekil 4.18. Hasta balık materyalinin yüzeyi ve iç organlarından alınan örneklerin F3-B3 primeri ile PCR reaksiyonu sonucu	53
Şekil 4.19. Hasta balık materyalinin yüzeyi ve iç organlarından alınan örneklerin AH primeri ile PCR reaksiyonu sonucu	54

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Türkiye'nin su ürünleri üretim alanları.....	3
Çizelge 2.2. Dünya' da ve Türkiye' de su ürünleri tüketimi.....	4
Çizelge 2.3. Gökkuşığı Alabağı'nın Sistematığı.....	8
Çizelge 2.4. Alabalık yetiştiriciliğinde çeşitli su parametreleri sınır değerleri.....	14
Çizelge 2.5. <i>A.hydrophila</i> 'nın sistematığı.....	26
Çizelge 2.6. <i>A.veroni</i> 'nin sistematığı.....	27
Çizelge 2.7. <i>A.sobria</i> 'nın sistematığı.....	27
Çizelge 2.8. <i>A.caviae</i> 'nin sistematığı.....	28
Çizelge 3.1 SET Tuz Solüsyonu	31
Çizelge 3.2 KİA.....	31
Çizelge 3.3 TAE.....	31
Çizelge 3.4 TE.....	31
Çizelge 3.5 TBE.....	32
Çizelge 3.6 Agaroz jel hazırlanışı	32
Çizelge 3.7. Spektrofotometrik karışım.....	36
Çizelge 3.8. Bakterilerin Primer Listesi.....	36
Çizelge 3.9. Primer Tm sıcaklıklarının Hesaplanması	37
Çizelge 3.10. Tetracilin (tet) geni için PCR optimizasyonu.....	37
Çizelge 3.11. Dış Membran Protein Transfer Geni (OmpTS) için PCR optimizasyonu.....	38
Çizelge 3.12. Aero (Aerosin) geni için PCR optimizasyonu.....	38

Çizelge 3.13. AH geni için PCR optimizasyonu.....	39
Çizelge 3.14. F3-B3 geni için PCR optimizasyonu.....	39
Çizelge 3.13. Tetracilin (tet) geninin PCR protokolü	39
Çizelge 3.14. F3-B3 geni için PCR optimizasyonu.....	39
Çizelge 3.15. Tetracilin (tet) geninin PCR protokolü	40
Çizelge 3.16. Dış Membran Protein Transfer Geni (OmpTS) (Outer Membran Protein Transplant System Gene) geninin PCR protokolü.....	40
Çizelge 3.17. Aero (Aerosin) geninin PCR protokolü.....	40
Çizelge 3.18. Çizelge 3.18. AH geninin PCR protokolü.....	41
Çizelge 3.19. F3-B3 geninin PCR protokolü.....	41
Çizelge 3.20. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41

1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, FAO tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak belirlenmiştir. Yetiştiricilikle üretilen su ürünleri miktarı 1980'de 7,4 milyon tondan 1990'da 16,8 milyon tona ve 2002 yılında ise 40 milyon tona ulaşmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık %30' unu karşılamakta ve yılda %10'dan fazla artarak büyümektedir. Yetiştiriciliği tehdit eden en önemli faktörlerden biri balık hastalıklarıdır. Bizim çalışmamızda Alabalık yetiştiriciliğinde önemli hastalık etkeni olan *Aeromonas* türleri tespitine yönelik bir araştırma yapılmıştır (Alpbaz 2005, Civaner 2004, Karakaş ve Türkoğlu 2005).

Aeromonas hydrophila'nın, birçok kültür ve doğadaki tatlısu balıklarından özellikle gökkuşuğu alabalıklarından (*Onchorhynchus mykiss*), sazanlardan (*Cyprinus carpio*), yayın balıklarından (*Silurus glanis*), Japon balıklarından (*Carrasius auratus*), yılan balıklarından (*Anguilla anguilla*), akvaryum balıklarından, tilapiadan ve deniz balıklarından hastalık etkeni olarak izole edildiği bildirilmiştir. (Snieszko ve Axelrod 1971, Bach vd 1978, Hazen vd 1978, Rahim vd 1985, Doukas vd 1998, Şahrikoğlu ve Candan 2002, Aydın ve Ciltas 2004, Güvener ve Timur 2005).

Aeromonas hydrophila çeşitli nedenlerle stres altında kalan balıklarda hemorajik septisemi hastalığına neden olan ve tüm dünyada yaygın olarak görülen bir balık patojenidir. Tatlı su, tuzlu su, ılık ve soğuk sularda bulunan bütün balıklar *Aeromonas hydrophila*'nın neden olduğu hastalığa karşı hassastır (Austin ve Austin 1987, Roberts 1993, Aoki 1999, Austin ve Austin 1999, Timur ve Timur 2003).

Balıklarda bakteriyel enfeksiyonların teşhisinde geleneksel bakteriyolojik yöntemlerin yanında, daha kısa sürede sonuç veren aglütinasyon, floresan antikör teknikleri, ELISA gibi serolojik testler ile restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) ve rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) gibi moleküler yöntemler de

kullanılmaktadır (Lewis ve Allison 1971, Lewis ve Savage 1972, Schneider ve Rheinheimer 1988, Koneman vd 1992, Miyata vd 1995, Aoki 1999, Akaylı 2001, Korun ve Timur 2001, Tanaka vd 2001, Lee vd 2002, Aydın ve Ciltas 2004, Chu ve Lu 2005, Nawaz vd 2006, Khushiramani vd 2006, Wei vd 2008).

Klasik laboratuvar tanı yöntemlerinden mikroskopinin özgüllük ve duyarlılığının düşük olması, kültür yöntemlerinin ise uzun zaman alması nedeniyle moleküler yöntemler mikrobiyoloji laboratuvarlarına hızlı bir şekilde giriş yapmış ve farklı uygulama alanları bulmuştur (Caetano-Anolles 1993, Pepper vd 1995, Fang vd 2004, Gonzales vd 2004, Ewart vd 2005, Nawaz vd 2006).

Moleküler biyolojik çalışmaların DNA molekül yapısını tanımlamasına dayanmaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu özellikle diğer moleküler yöntemlerden farklı olarak taşıdığı potansiyel nedeniyle daha yaygın kullanım alanı bularak hemen hemen her moleküler laboratuvarına girmiştir. Moleküler yöntemler, özellikle mikroskopi ile görülmesi, kültürde üretilmesi uzun zaman alan, zor veya olanaksız mikroorganizmaların saptanmasında önemli rol oynamaktadır (Grinsted ve Bennett 1988, Caetano-Anolles 1993, Pepper vd 1995, Perry ve Staley 2000).

Bu çalışmada, Fethiye bölgesindeki çiftliklerde gökkuşağı alabalığında görülen hemorajik septisemiye neden olan *Aeromonas hydrophila*, *A.sobria*, *A.veronii* ve *A.caviae* 'nın teşhisinde kullanılan ve fazla zaman alıcı olan klasik bakteriyolojik teşhis yöntemleri yerine hızlı ve duyarlı olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile analiz yöntemi kullanılarak bu *Aeromonas* türlerinin çok daha kısa bir sürede identifikasyonu hedeflenmiştir.

Bu hedefe ulaşmak için 4 bakteriden 5 farklı gen bölgesi (*Aero*, *OmpTS*, *tet*, *F3-B3*, *AH*) çalışmamızda araştırılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Türkiye'deki Alabalık Yetiştiriciliği

Türkiye, 8333 km deniz kıyısı ve su ürünleri üretim alanı olarak kullanılabilir 178.000 km uzunluğunda akarsu, yüzey alanları 200 bin hektarın üzerinde olan yaklaşık 200 adet doğal göl ve 3442 km² genişliğinde baraj gölüne sahiptir (Çizelge 2.1.) (Çelikkale vd 1999, Alpbaz ve Hoşsucu 2002, Civaner 2004, Karakaş 2005).

Çizelge 2.1. Türkiye'nin su ürünleri üretim alanları

Üretim Yeri	Yüzölçümü (ha)	Sayı (adet)
Akdeniz, Karadeniz, Ege ve Marmara Denizi	24.600.000	4
Doğal göller	1.000.000	200
Baraj gölleri	340.000	206
Gölet	10.000	953
Akarsu	200.000	33
Toplam	26.150.000	1.396

Dünyada kişi başı balık tüketimi ortalama 11-12 kg. iken, Japonya 70-80 kg. ile ilk sırada yer almaktadır. Portekiz 60 kg., Norveç ise 50 kg. ile en çok balık tüketen ülkeler arasında üst sıralarda yer almaktadır (Çizelge 2.2.) (Alpbaz ve Hoşsucu 2002).

Avrupa Birliği ülkeleri arasında Türkiye'nin balık üretimi 7. sırada iken, tüketimi son sıralarda yer almaktadır. Dünyada su ürünleri kişi başı tüketimi 15 kg., AB ülkelerinde 22 kg. Türkiye'de ise 6-7 kg. dır (Aydın vd 2005, Alpbaz 2005).

Su ürünleri yetiştiriciliği hayvansal üretim çalışmalarında en hızlı gelişmekte olan üretim alanıdır.

Çizelge 2.2. Dünya’da ve Türkiye’de su ürünleri tüketimi

ÜLKE	SU ÜRÜNLERİ TÜKETİMİ Kg/yıl
Japonya	88
Portekiz	63
Filipinler	54
Norveç	49
İspanya	37
Peru	23
Fransa	22
İngiltere	24
Türkiye	7

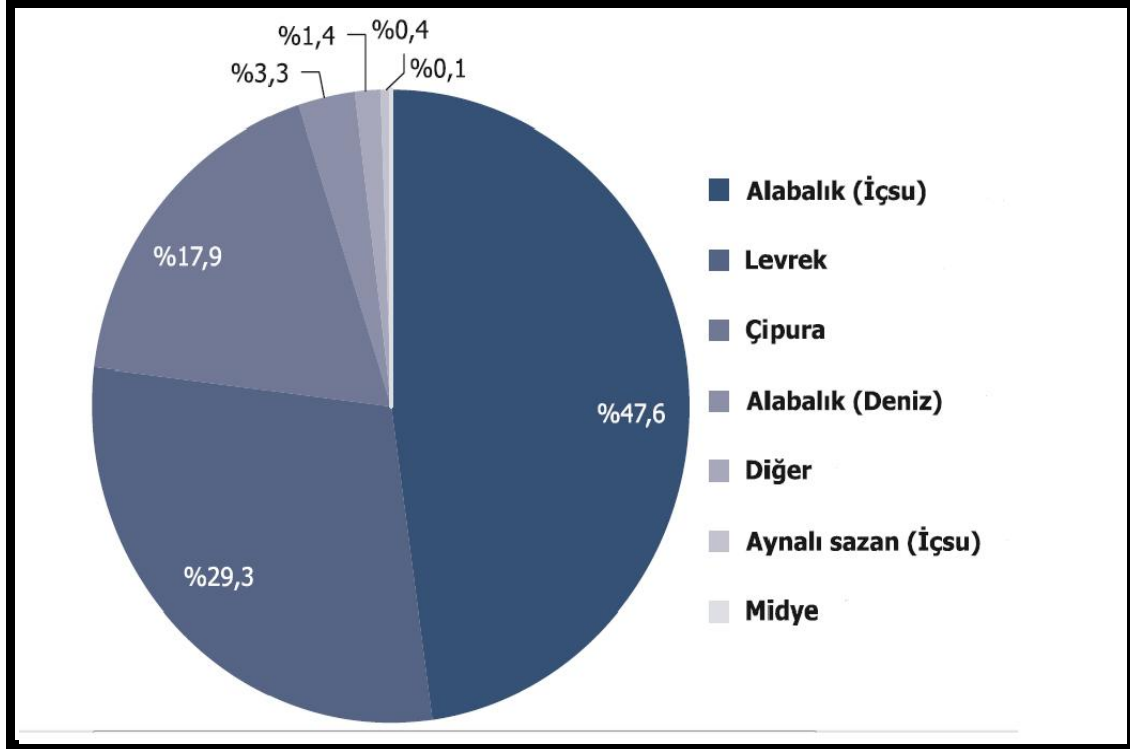
Balıkların aşırı avlanması, küresel ısınmadan dolayı meydana gelen iklim değişiklikleri, denizlerin ve doğal su kaynaklarının bilinçsizce kullanılması ve kirletilmesi gibi birçok nedenden dolayı su ürünleri yetiştiriciliğinin her geçen gün artmaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliği balık, su bitkileri, yumuşakçalar ve kabuklu yetiştiriciliğini kapsamaktadır (Aydın 2005).

FAO, su ürünleri yetiştiriciliğini en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak belirlemiştir. Su ürünleri yetiştiriciliği dünya çapındaki ihtiyacın %30’unu karşılamaktadır ve yılda %10’dan fazla büyümektedir. 1980’de 7.4 milyon ton, 1990’da 16.8 milyon tona ulaşan üretim miktarı 2002 yılında 40 milyon tona ulaşmıştır (Civaner 2004, Karakaş 2005, TÜİK 2009).

Ülkemizde iç sularda genellikle alabalık yetiştiriciliği, denizlerde ise çipura (*Sparus auratus*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliği yapılmaktadır. İlk alabalık çiftliği 1970’lerde, çipura ve levrek yetiştiriciliği yapan işletme ise 1985 yılında kurulmuştur (Alpbaz 2005).

Kültür balıklarının türlere göre dağılımında en yüksek yetiştiriciliği yapılan balık, iç sulardaki alabalık miktarı olup, toplam su ürünleri yetiştiriciliğinin %47,6'nı oluşturmaktadır. Bunu % 29,3 ile levrek, %17,9 ile çipura takip etmektedir. Alabalık (deniz), aynalı sazan (iç su) ve midye üretimleri de diğerlerini takip etmektedir (Şekil2.1) (Alpbaz 2005, TÜİK 2009).

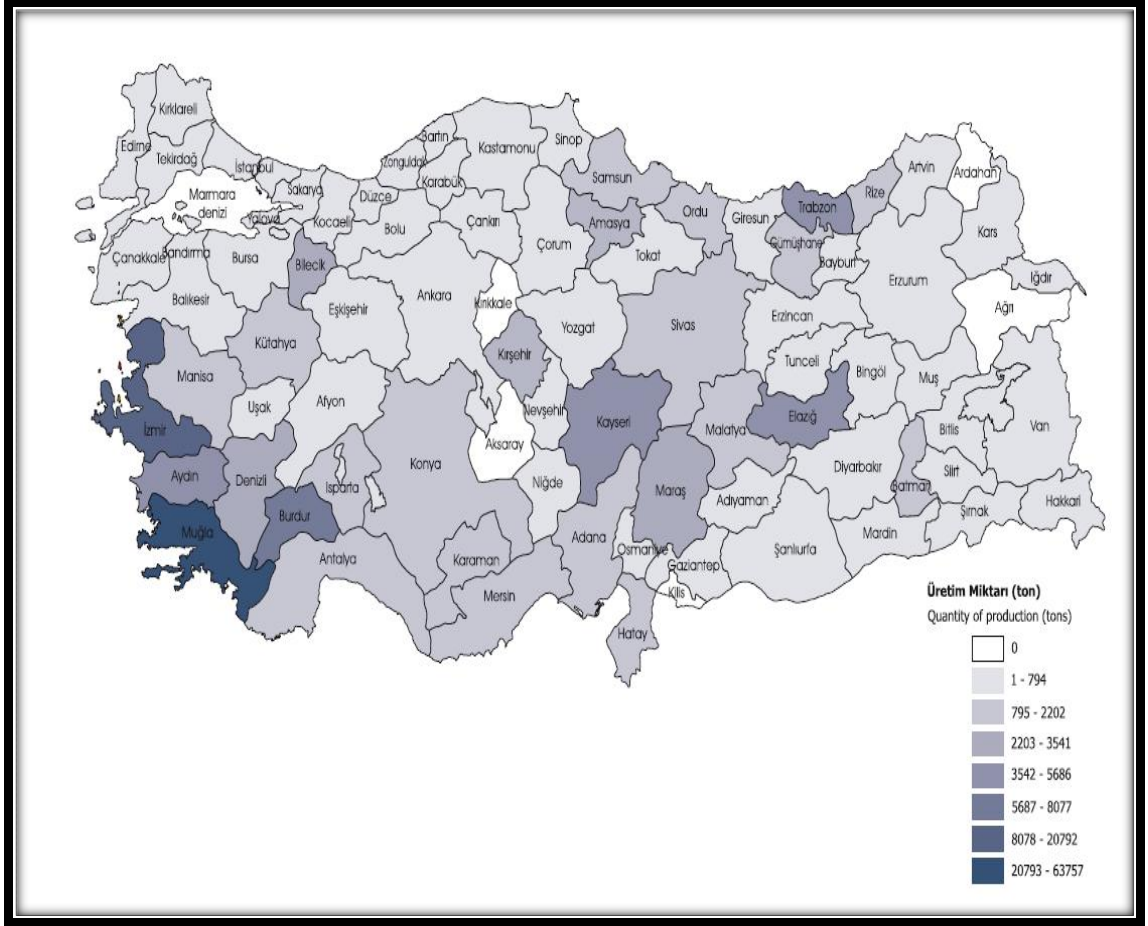


Şekil 2.1. Yetiştiricilik üretiminin türlere göre dağılımı, (2009 TÜİK)

Ülkemizde başarıyla uygulanan alabalık yetiştiriciliği ilk olarak 1970'li yıllarda çalışılmaya başlamıştır. Bu dönemde alabalık yetiştiriciliğini ilk kez deneyen işletmeler pek çok zorlukla karşılaşmışlardır. Ancak bugün Avrupa çapında ün yapmış ve yılda 1000 tondan fazla üretim yapan işletmelerimiz mevcuttur (Aydın 2005).

TÜİK 2009 verilerine göre Türkiye'nin iç su yetiştiriciliğinin en kapsamlı üretimini yapan Muğla ilinde 12462 ton üretim yapılmıştır. Burdur 8030 ton, Kayseri 5685 ton ve Elazığ 5500 ton ile en çok üretim

yapan illerdendir. Bingöl 4 ton ve Nevşehir 9 ton en az üretimin gerçekleştiği illerdendir (TUİK 2009) (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. İç Su Balıklarının İllere Göre Yetiştiriciliği, (2009 TUİK)



Şekil 2.3. Fethiye haritası

Çalışmada örneklerin temin edildiği Eşen çayı, Muğla ilinde Fethiye sınırları içerisinde ve Fethiye İlçe Merkezi' nin doğusunda yer almaktadır. Fethiye Ovası ve Eşen Çayı Vadisi' ndeki tarım alanlarının sulanması için Eşen Çayı üzerinde DSI' nce Örenköy Regülatörü ve 31.200 m uzunluğunda 12 metre küp saniye kapasiteli olarak inşa edilmiştir. Burada 12462 ton kapasiteyle üretim yapılmaktadır (Şekil 2.3.) (<http://www.hesiad.org.tr/FETASFETHIYEBILGI.htm>).

2.2. Gökkuşacağı Alabalığı'nın (*Oncorhynchus mykiss*) Biyolojisi

Çalışmamızda balık materyali olarak ekonomik değeri yüksek, yetiştiriciliğe en uygun türlerden biri olan Gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) tercih edilmiştir.

2.2.1. Gökkuşığı alabalığı'nın (*Onchorhynchus mykiss*) sistematığı

Gökkuşığı Alabalığı'nın *O. mykiss*'in sistematığı Çizelge 2.3. deki gibidir.

Çizelge 2.3. Gökkuşığı Alabalığı' nin Sistematığı

Alem:	Animalia
Şube:	Chordata
Sınıf:	Actinopterygii
Takım:	Salmoniformes
Familya:	<i>Salmonidae</i>
Cins:	<i>Oncorhynchus</i>
Tür:	<i>O. mykiss</i>

2.2.2. Gökkuşığı alabalığı'nın (*Onchorhynchus mykiss*) morfolojisi ve yetiştiricilik özellikleri

Dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği en yaygın tür olan gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Amerikan kaynaklı alabalıklardandır. 10-12 ay içerisinde 200-300 gr.'a ulaşabilmektedir. Yaşabildiği sıcaklık aralığı 14-17°C'dir. Türkiye'de alabalık yetiştiriciliği yapmak isteyen işletmecilerin tercih edeceği ilk türdür. Uygun kültür şartlarında 1 yılda ortalama 250gr. ağırlığa ulaşırlar. 12 yıl kadar yaşarlar (Lucas ve Soutgate 2003, Moksness vd 2004, Alpbaz 2005).

Baş ve vücut şekli dere alabalığına benzer. Kuyruk yüzgeci çatallı, ağız açıklığı gözün arka kısmına kadar ulaşır. Renk değişken olup, koyu yeşilden kahve yeşile kadar değişkenlik gösterir. Yanlar daha açık, karın gümüş beyazlığındadır. Yan hat boyunca geniş, kırmızı ve pembe gökkuşığı renginde bir bant bulunur. Gökkuşığı alabalığı ismini bu banttandır. Üreme döneminde erkek balıklarda bu bant çok daha göz alıcı olur. Baş kısmı, vücudun yan tarafları, sırt, kuyruk ve yağ yüzgeçlerinde küçük siyah birçok benek bulunur (Çelikkaya vd 1988, Tekelioğlu 2005).

Türün orjinal ismi olan *Onchorhynchus mykiss*, 1792 yılında Johann Julius Walbaum tarafından verilmiştir. Daha sonra aynı tür 1836 yılında Richardson tarafından *Salmo gairdneri* olarak isimlendirilmiştir. Gökkuşığı alabalığı kökenini Kuzey Amerika'nın Pasifik bölgesinden alır. Kalifornia'nın dağlık nehirlerinde yaşayan ve denize göç etmeyen Shasta (*Salmo irideus*) ile denize göç eden ve Kuzey Amerika'nın kıyı şeridindeki nehirlerde yaşayan Çelikbaş alabalığı (*Salmo gairdneri*)'nin çaprazlanması sonucu kültür koşullarına adapte ettirilmiş bir türdür (Moksness vd 2004, Alpbaz 2005).



Şekil 2.4. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Torpil veya füze şekilli olan vücutları yanlardan hafifçe yassılaştırmış ve ince yapılı sikloid pullarla örtülmüştür. Ağız yapısı büyük ve terminal konumdadır (Şekil 2.4.) (Alpbaz ve Hoşsucu 2002, Geldiay vd 2007).

Yumurtaların çapları 4-7 mm. arasında değişen alabalık yumurtaları diğer balık türlerine göre daha büyüktür. Omur sayısı 51-62, yanal çizgideki pul sayıları 100-150 arasındadır. Popülasyonları Atlas ve Pasifik Okyanuslarının kuzey kısımlarında ülkemiz de ise Akdeniz ve Karadeniz'e sahili olan bölgelerin iç sularında görülmektedirler (Tekelioğlu 2005, Geldiay 2007).

Yetiştiriciliği yapılan alabalık türleri dünyada Avrupa ve Amerika alabalıkları olarak ayrılırken ülkemizde yerli ve kültür alabalıkları olarak ayrılmaktadır. Gökkuşuğu Alabalıkları Amerikan kökenli alabalık türlerinden olup, ülkemizde yetiştiriciliği en yaygın olan alabalık türüdür. Kuzey Amerika'ya ait bir tür olan (*Oncorhynchus mykiss*) Avrupa'ya 1880 yıllarında getirilmiştir (Aydın 2005).

Türkiye'de en çok yetiştiriciliği yapılan alabalık türü Gökkuşuğu Alabalığıdır (*Oncorhynchus mykiss*). Evcilleştirilmiş, yani insanın üretimini, yetiştiriciliğini yapabildiği bu nedenle doğadaki hemcinslerine oranla daha iyi gelişebildiği gökkuşuğu alabalığı daha iyi yem değerlendirebildiğinden çok iyi verim alınabilmektedir. Uygun yetiştiricilik koşulları sağlandığında 1 yılda 250-300 gr. ağırlığa ulaşabilmektedir (Tekelioğlu 2005, Geldiay 2007).

Çevre koşullarına da çok iyi uyum sağlayabilen bu tür özellikle suyun sıcaklığının yükselmesine karşı yüksek tolerans göstermektedir. Ayrıca daha yüksek ilkbahar sıcaklığında diğer alabalıklara nazaran daha kısa kuluçka evresine sahip olması da yetiştiricilik ve ekonomik kazanç açısından üreticinin bu türü tercih etmesine yol açmaktadır (Aydın ve Ciltas 2005, Alpbaz 2005).

Sağım, yumurta alımı, yavruların yapay yemlerle beslenmesi ve büyütme işlemlerinin daha kolay olması türün yetiştiricilik açısından daha çok tercih edilmesini ve üreticinin gözünde ekonomik değerinin artmasını sağlamaktadır (Alpbaz vd 2005, Tekelioğlu 2005, Geldiay 2007).

Tüm bunların yanında, yetiştiriciliğinin 100 yılı aşkın zamandan beri yapılması nedeniyle yetiştiricilik sorunlarının çözülmüş olması üretimin kolaylığı açısından yarar sağlamaktadır (Alpbaz 2005, Tekelioğlu 2005).

Alabalık yetiştiriciliğinde su kaynağı olarak göller, yer altı suları ve akarsular kullanılabilir. Bunların içinde kaynak suları en uygun olanıdır. Balık için genelde berrak su olması istenir. İçilebilecek özellikte temiz sular tercih nedenidir (Alpbaz 2005).

2.2.3. Gökkuşluğu alabalığı'nın yetiştiriciliğinde karşılaşılan sorunlar

Alabalıklar da diğer canlılar gibi yaşadıkları çevre ile doğrudan etkileşim altında olan canlılardır. Soğukkanlı olmaları nedeniyle ortam sıcaklığından çok çabuk etkilenirler. Ortamın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliği balık sağlığını doğrudan etkileyen faktörlerdir (Timur ve Timur 2003).

Kirli çevre, konak ve patojenin birleştiği yerde hastalık oluşumu için uygun bir ortam oluşturur. Sucul ortamlar balıklar dışında birçok organizmanın ve mikroorganizmaların bulunduğu ortamlardır. Bu organizmaların birçoğu doğrudan veya dolaylı olarak balık sağlığını etkiler (Austin ve Austin 1992, Timur ve Timur 2003, Karataş vd 2010).

Kültür balıkları yetiştiriciliğinde balıkların birbirleriyle yakın temasta bulunmaları, suların çabuk kirlenmesi ve su kalitesinin (fiziksel, kimyasal, biyolojik ve diğer fizyolojik parametrelerinin) uygun değerlerin dışına çıkması gibi nedenlerle balıkların bulunduğu ortamda hastalıkların kolayca ortaya çıkması söz konusudur. Böylesi durumlar başta balığın sağlığını etkilediği gibi, işletmenin ekonomisine ve geleceğine de olumsuz yönde etki etmektedir (Snieszko ve Axelrod 1971, Alpbaz 2005).

Yukarıda belirtilenlerin dışında su sıcaklığı, oksijen yetersizliği, ışık seviyesi, sudaki gazların bileşimi, su kirliliği, stok yoğunluğu ve

hastalıklar yetiştiricilikte karşılaşılan sorunlardandır (Austin ve Austin 1999, Lucas 2003, Timur ve Timur 2003, Alpbaz 2005, Cengizler 2006).

Alabalık suyun sıcaklığından direkt olarak etkilenir. Su sıcaklığı büyümeyi ve yem değerlendirme oranını etkilediği gibi üreme faktörünü de etkiler (Lucas 2003, Moksness vd 2004).

Alabalıklar yüksek ve düşük sıcaklık tolerans limitine, büyüme, yumurta inkübasyonu, yem değerlendirme ve özel bazı hastalıklara karşı optimum sıcaklık derecesine sahiptirler. Bu optimum sıcaklık derecesi, türlere göre farklı olduğu gibi oksijene, basınca ve suyun pH'sı gibi diğer parametrelere göre de değişiklik gösterebilir. Suyun sıcaklığı arttığında, suda eriyen gazların suda erime kabiliyeti azalırken suda çok az eriyen pestisit, ham petrol gibi toksik bileşiklerin erimesi artar (Timur ve Timur 2003).

Su sıcaklığındaki dalgalanmalar alabalık çiftliklerindeki balıklar için önemlidir. Gökkuşaağı alabalığının yaşayabildiği optimum sıcaklık değeri 15-16 °C'dir. 25 °C'de geçici bir süre hayatta kalırlar fakat bu sıcaklık balıklar için zararlıdır (Lindhorst-Emme 1990, Lucas 2003, Moksness vd 2004, Alpbaz 2005, Geldiay 2007).

Kuluçkahaneler için sıcaklık derecesi büyük balıklardan biraz daha düşüktür. 10-12 °C yumurta ve fry için uygundur. Alabalık çiftliklerinde suyun sıcaklığı 10 °C'nin altına düşmemesi gerektiği gibi 18 °C'nin üzerine de çıkmaması gerekir (Lindhorst-Emme 1990, Lucas 2003, Alpbaz 2005).

Oksijen yetersizliği işletmelerde çeşitli nedenlerden kaynaklanır. Bu nedenler arasında tanklarda veya havuzlarda tüketilmemiş çürüyen yemlerin etkisi, toprak havuzlarda çok miktarda bitki bulunması, su sıcaklığının yükselmesi, havuzlara gelen suyun kesilmesi,

havalandırmanın durması gibi çeşitli etkenler bulunur (Moksness vd 2004, Tekelioğlu 2005).

Suda çözülmüş oksijen balıklarda hayatın devamı için başlıca gerekli elementtir. Çözünmüş oksijen, havuzların taşıma kapasitesini belirler. Genel olarak salmonid balıklar için kabul edilebilir oksijen limiti 5 mg/l'dir (Lindhorst-Emme 1990, Timur ve Timur 2003, Lucas 2003).

Doğal sularda ekstensif kültür sistemlerinde ve intensif kültür sistemlerinde ışık seviyesi balıkların büyüme ve olgunlaşmasında önemli olduğu için yetiştiricilikte önemli faktörlerden biridir (Timur ve Timur 2003, Moksness vd 2004).

Suda eriyen gazlarda alabalık yetiştiriciliğinde önemli etkenlerdendir. Azot, oksijen, CO₂ ve amonyum gazları özel bir öneme sahiptir. Azot, derin kuyu ve artezyen kuyularında aşırı doymuş seviyede bulunabilir. Suyun herhangi bir gaz ile aşırı doymuş hali gaz kabarcığı hastalığını oluşturur. Suyun havalandırılması gerekir (Lindhorst-Emme 1990, Lucas 2003, Karataş 2010) .

Doğal asidite, karbonat alkalinitesi ve pH, balık sağlığı için akuatik çevrenin kalitesinin belirlenmesinde çok önemlidir. Tatlı suların pH değerleri geniş aralık içerisinde dalgalanma gösterir. Balıklar genellikle 5-9 pH aralığında yaşarlar. Salmonid balıklar pH değerinin altında tutulursa plazmalarındaki sodyum ve klorür konsantrasyonlarını ayarlama kabiliyetlerini kaybederler. pH'nın devamlı olarak 5'in altında tutulması halinde plazmadaki sodyum klorürü seviyesi düşer ve vücut hareketlerinin kontrolü kaybedilir. pH 6 – 6.5 aralığında bile salmonid balıklarda büyüme oranının azaldığı bildirilmektedir (Lindhorst-Emme 1990, Tekelioğlu 2005).

Doğal sularda genellikle karbondioksit seviyesi 6 mg/litreyi geçmez. Karbon dioksit seviyesinin yükselmesi balıklarda solunumu

azaltır. Tatlı sularda normal olarak 2 mg/1 CO₂ balıklar bulunur. Suda 12 mg/1 seviyesinin üstündeki karbon dioksit seviyesi balık büyümesinde negatif etkiye sahiptir (Çizelge 2.4.) (Lindhorst-Emme 1990; Timur ve Timur 2003).

Çizelge 2.4. Alabalık yetiştiriciliğinde çeşitli su parametreleri sınır değerleri (Lindhorst-Emme 1990).

Parametre	Sınır Değeri
Sıcaklık	20 °C'a kadar
Oksijen	7 mg/lt'nin üzerinde
pH	5,5-8,5
Asit Bağlama Kapasitesi (SBV)	1,5 Vol/m ³ 'ün üstünde
Ammonium	1,0 mg/lt'e kadar
Demir, toplam	0,5 mg/lt'e kadar
Nitrit	0,2 mg/lt'e kadar
Nitrat	10 mg/lt'e kadar
Potasyumpermanganat tüketimi (KmnO ₄)	40 mg/lt'e kadar
Kimyasal oksijen gereksinimi	40 mg/lt'e kadar
Biyokimyasal oksijen gereksinimi	15 mg/lt'e kadar
Oksijen tüketimi	6 mg/lt'e kadar
Serbest CO ₂ (Larvalar için)	15 ppm/lt'nin altında
Serbest CO ₂ (Sofralık balıklar için)	30 ppm/lt'nin altında

Amonyum balıkların başlıca boşaltım ürünü olup çevresel hastalıklar için başlıca potansiyeli oluşturur. Akuatik sistemlerde protein metabolizmasının son ürünü olarak meydana gelir. Balıklar amonyumu solungaçları ile atarlar. Amonyum miktarındaki artış balıklarda çevreden kaynaklanan solungaç hastalığı gelişmesine ve

büyüme oranı düşmesine neden olur (Lindhorst-Emme 1990, Timur ve Timur 2003).

Alabalık yetiştiriciliğinde bir önemli faktörde su kaynaklarındaki kirlenmedir. Sulardaki kirlenme; termal, metal, evsel ve endüstriyel atıklar ve petrol gibi çeşitli kirleticilerden kaynaklanabilir. Bu kirleticilerin birçoğu balıklar için toksik etki yapar ve balıklarda yüksek mortaliteye sebep olabilir. Bunun yanında balık frylarında solungaçların tıkanması sonucu boğulmalara ve yumurtaların üstünün örtülmesiyle oksijensiz kalmalarına neden olabilir (Lucas 2003, Timur ve Timur 2003).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıklar, üretim ve ticareti sınırlayan en önemli etken olarak bilinir. Su ürünleri yetiştiriciliğinin hızlı büyüme sürecinde çevresel etkileşimlerle birlikte bakteriyel, viral, fungal ve paraziter hastalıklar da artış meydana gelmiştir (Scienszko ve Axelrod 1971, Roberts ve Shepherd 1986, Austin ve Austin 1992, Lucas 2003, Timur ve Timur 2003, Alpbaz 2005, Tanrıkul 2007, Karataş 2010).

Yüksek stoklama yoğunluğu ile birlikte strese yol açan çevresel faktörler salgın hastalıkların ortaya çıkmasına, kültür ve doğal ortam arasında su değişimi yoluyla bu hastalıkların doğal türlere bulaşmasına yol açabilmektedir (Timur ve Timur 2003, Lucas 2003, Moksness vd 2004, Karataş 2010).

2.2.4. Gökkuşığı alabalığı'nda görülen bazı önemli bakteriyel hastalıklar

Gökkuşığı Alabalığı'nda görülen bakteriyel hastalıkların başında furunkulozis, yersinozis, bakteriyel soğuk su hastalığı, gökkuşığı alabalığı fry mortalite sendromu, bakteriyel böbrek hastalığı, tuberculosis ve hareketli motil aeromonas sepsisi (MAS) gelmektedir.

2.2.4.1. Furunkulosis

Salmonid balıklarda *Aeromonas salmonicida* adı verilen bakterinin neden olduğu öldürücü epizootik bir hastalıktır. Bu bakteri özellikle, ekonomik değeri yüksek salmonid balıklarda hastalığa neden olmaktadır. Furunkulozis adı, insan furunkulosis'ine analog olarak bazı vakalarda salmonid balıkların vücudunda *furunkul* adı verilen çıban benzeri klinik lezyonlardan gelmektedir (Timur ve Timur 2003, Beaz-Hidalgo vd 2008).

Salmonid balıkların doğa ve kültür stoklarındaki bu hastalık başlıca kayıp nedenlerindedir. Genellikle yüksek su sıcaklığı, düşük oksijen ve aşırı stoklama yoğunluğuna bağlı olarak her yaş grubundaki salmonid balıklarda görülmektedir. Bu hastalığa karşı gökkuşağı alabalığı salmonid balıklar içinde en dayanıklı, Atlantik salmonu ise en hassas olanıdır (Snieszko ve Axelrod 1971, Çolak 1982, Del Cerro vd 2002, Ewart vd 2005,).

Hastalığın etkeni olan *Aeromonas salmonicida* araştırmacılar tarafından bildirilen en eski balık patojenidir. Gram negatif, fakültatif anaerobik, hareketsiz, çomak şekilli 1,3-2x0,8 – 1,8 mikron boyutlarında bir basildir. Trypticase soy agar (TSA) gibi katı besi yerlerinde konveks, kenarları düzgün yuvarlak ve parlak koloniler oluşturur. Besiyerleri ve koloniler zaman geçtikçe kahverengiye dönerler (Çolak 1982, Austin ve Austin 1992, Timur ve Timur 2003, Beaz-Hidalgo vd 2008).

2.2.4.2. Bakteriyel soğuk su hastalığı

Soğuk su hastalığı uzun yıllar boyunca salmonid balıklarda eyerli sırt hastalığı olarak da bildirilmiştir. Son yıllarda yüksek mortalite ile seyreden ve “gökkuşağı alabalığı fry mortalite sendromu” olarak isimlendirilir (Korun ve Timur 2001, Timur ve Timur 2003).

Gökkuşığı alabalıklarında kuyruğa yakın bölgede veya kuyruk üzerinde karakteristik açık lezyonlar gözlenmiş ve bu nedenle bu hastalığa aynı zamanda pedunkul hastalığı adı da verilmiştir. İlerlemiş lezyonlarda kuyruk yüzgecinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu lezyonlar balıkların boğaz bölgesinde ve dorsal yüzgecin anteriör'ünde de gözlenmiştir (Austin ve Austin 1992, Timur ve Timur 2003).

Hastalığın etkeni patojen tür *Flavobacterium psychrophilum* olarak bilinir. Cytophage agar da sarı pigmentli, yayılmayan koloniler oluşturur. *F. psychrophilum* 15 – 18 °C'de 3 – 5 gün inkübe edildiğinde parlak sarı renkli koloniler oluşturur. Bu bakteriler ortası kabarık ve konveks bir merkeze ve ince yayılan bir kenara sahip tavada yumurta olarak tarif edilen bir koloni morfolojisine sahiptirler. *F. psychrophilum* aerobik, Gram negatif, ince, uzun esnek çomaklar olup katı yüzeylerle temas halinde olduklarında kayma hareketi yapabilen bakterilerdir (Timur ve Timur 2003).

2.2.4.3. Enterik Kızıl Ağız Hastalığı (Yersiniozis)

ERM hastalığı ilk kez 1950 yılında ABD'de bir alabalık işletmesinde bulunmuştur. Hastalık daha sonra Kanada, Danimarka, İngiltere, Fransa, Almanya, İtalya, Norveç, Avusturalya, Yunanistan ve Türkiye' ye yayılarak geniş bi coğrafya içerisinde salmonid balıklarda ölümlere neden olmuştur. Bu hastalık salmonid balıklarda özellikle gökkuşığı alabalığı yetiştiren işletmelerde önemli kayıplara neden olan septisemik, kontagiyöz bakteriyel bir enfeksiyondur (Timur ve Timur 2003, Cengizler 2006).

Hastalığın etkeni olan enterik bakteri *Yersinia ruckeri* Gram negatif, hafif kıvrık, 1,0 x 2,0 – 3,0 µm büyüklüğünde çomaklardır. Sahip olduğu 7-8 adet peritrik flagelası ile hareketli bir bakteridir.

ERM hastalığı subakut ve akut bir sistemik enfeksiyondur. Adını subcutaneus (deri altı) hemorajilerin sebep olduğu ağız ve operkulumun

kırmızılaşmasından almaktadır. Hastalığın adı olan enterik kızıl ağız, bu hastalığın semptomlarını tarif etmektedir. Başlıca belirtileri ağız ve boğaz kısmında kızarıkların oluşmasıyla beraber diğer belirtileri deri renginin koyulaşması, bilateral ekzoftalmus, hiper pigmentasyon, yüzgeçlerin dip kısımlarında ve göz çevrelerinde hemorajiler, bağırsaklarda sarı renkli bir sıvının bulunması, istahsızlık ve hareketlerde yavaşlama şeklindedir (Austin ve Austin 1992, Timur ve Timur 2003).

Yetiştiricilik koşullarında balıklarda stresle ilişkili olarak ortaya çıkan bu hastalık akut ve kronik olarak seyreder. Gökkuşuğu alabalıklarında ERM en çok 7,5 cm. uzunluğundaki balıkları etkiler. Hastalığın şiddeti suyun sıcaklığı 15 – 18 °C'ye çıktığı zaman en yüksek noktaya ulaşırken, 10 °C'ye düştüğünde hastalığın hızı da düşer.

Suda birkaç ay yaşayabilen patojen, kuşların dışkısında, memelilerde ve insanda bulunmuştur (Timur ve Timur 2003).

2.2.4.4. Bakteriyel böbrek hastalığı

Bakteriyel böbrek hastalığı (BKD), salmonid böbrek hastalığı gibi ismiyle anılan hastalığın etkeni *Renibacterium salmoninarum'* dir. Bu hastalık ilk önce 1930 yılında İskoçya'da Dee ve Spray Nehirlerindeki salmon balıklarında görülmüştür (Timur ve Timur 2003).

Hastalığın etkeni olan bu basil küçük (0,3 – 0,5 µm x 0,1 – 1,5 µm), Gram pozitif, hareketsiz, aside-dirençli olmayan çomaklar olup, genellikle çiftler halinde oluşurlar. Bu bakteri sadece konakçı balık içinde çok yavaş olarak böbrek, dalak, kalp ve kas dokularında çoğalırlar. Bakteri çok küçük olup, kültürde büyümesi zordur. Çünkü laboratuvar vasatlarında üremesi için özel besleyici maddelere ihtiyaç vardır (Austin ve Austin 1992, Timur ve Timur 2003, Cengizler 2006).

Hasta balıklar genellikle koyu renkli ve ara sıra ekzoftalmus gösterirler. Pektoral yüzgeçlerinde küçük hemorajiler görülür. Kültür alabalıklarında balığın vücudunun yan tarafında küçük kabarıklıklar oluşabilir. Hasta balıklar da ekzoftalmi, bazen gözün birinde kayıp, korneada bulutlanma ve yanal çizgi boyunca küçük yaralar, opercular lezyonlar kanlı pektoral yüzgeçler ve yüzgeçlerde içi kan dolu kabarcıklar ve ülserler görülür. İnternal olarak kanlı ascites (karın boşluğunda kanlı sıvı toplanması), görülür. Otopside lezyonlar genellikle böbrekte bulunmuştur (Austin ve Austin 1992, Çolak 2006).

BKD'nin ilk teşhisi bilindiği gibi histolojik olmuştur. Organizmanın kültür vasatlarında (KDM-2 agar) çok yavaş üremesi (15 °C'de 6 – 8 hafta veya daha fazla bir sürede) hastalığın teşhisi ile uğraşanların dikkatini serolojik metodlar üzerine yöneltmiştir. *Renibacterium salmoninarum* KDM-2 agarda çeşitli büyüklükte, yuvarlak, konveks beyaz-krem rengi koloniler oluşturur. Primer izolasyonlarda optimal sıcaklık derecesi 15 – 16 °C olup, 5 – 6 hafta sonra gözle görülebilir koloniler ortaya çıkar (Austin ve Austin 1999, Timur ve Timur 2003).

Günümüzde en hızlı identifikasyon metodu ELİZA testidir. Bu test 45 dakika gibi bir sürede yapılabilir. İmmunofloresan yöntemi bir gün alır. Tahmini identifikasyon hareketsiz, aside-dirençli olmayan, Gram pozitif koko-basillerin yaş ezme preparatlarda görülmesi ile yapılır. Tahmini teşhisin kesinleşmesi (konfirmasyonu) patojenin 6-8 hafta veya daha fazla sürede özel vasatta (KDM-2 agarda) üremesi ile sağlanır (Timur ve Timur 2003).

2.2.4.5. Tuberculosis (Mycobacteriosis)

Balıklarda kronik olarak gelişen ve zayıflama, deride inflamasyon, ekzoftalmus, açık lezyon ve ülser gibi eksternal semptomlar ile

balıkların çeşitli organ ve dokularında küçük tüberküllerin oluşması ile beliren bulaşıcı ve kronik bir hastalıktır. Bu enfeksiyon salmonid balıklarda, deniz levreğinde, çipura, çizgili levrek, uskumru, morina balığı, tilapia ve akvaryum balıklarında bildirilmiştir (Timur ve Timur 2003).

Hasta balıklar kaşektik (çok zayıflamış) ve koyu renkli olup, abdomende şişkinlik vardır. İnternal olarak çeşitli organlarda grimsi beyaz nodüller (granülomatöz lezyonlar) oluşur.

Balıklardan izole edilen mycobacteria, Gram pozitif, aside dirençli, hareketsiz (non-motile) 1,5 – 2,0 µm x 0,25 – 0,35 µm büyüklüğündeki basillerdir. Balıklardan *Mycobacterium fortuitum*, *M.piscium*, *M.platypoecilus* ve *M.salmoniphilum* türleri izole edilmiştir. Balık tüberküloz basilleri yumurtalı vasatlarda düzgün, ıslak, parlak ve krem renkli koloniler oluşturur (Austin ve Austin 1992, Timur ve Timur 2003).

2.2.4.6. Hareketli aeromonas septisemi (MAS)

Tatlı su, tuzlu su, ılık ve soğuk sularda bulunan bütün balıklar bu hastalığa hassastır. Tüm dünyada yaygın olarak görülür. Havuzlarda kültürü yapılan sazan, Japon balığı, yayın balıklarının tipik bir hastalığıdır. Hareketli Aeromonas Septisemi etkenleri olarak *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas cavie*, *Aeromonas sobria* ve *Aeromonas veronii* türleri bilinmektedir (Lucas ve Soutgate 2003, Aoki 1999, Aydın ve Ciltas 2004, Bach vd 1978, Buchanan ve Palumbo 1985, Dwivedi vd 2008, Wei vd 2008, Hickman-Brenner ve Macdonald 1987).

A. hydrophila onun sinonimleri olan *A.formicans*, *A.liquefasciens*, *A.punctata* balıklarda hemorajik septiseminin etkeni olarak tanınmıştır. Buna ek olarak hareketli aeromonadlar kurbağalar, kaplumbağalar ve yılanlarda hastalık oluşturur. Bunun da ötesinde, hareketli

aeromonadlar insanlarda gastro-enteritis, yara enfeksiyonları ve sepsisemi vakalarında rol alırlar (Timur ve Timur 2003).

Tatlı sularda özellikle organik maddece zengin sular normal olarak *A. hydrophila*'nın habitatu olarak kabul edilmektedir. Fakat son zamanlardaki bulgular balıklarda barsak florasında da bulunabileceğini göstermektedir (Timur ve Timur 2003).

Hareketli Aeromonadlardan *A. cavie*, *A. veronii* ve *A. sobria*'nın da ara sıra hasta balıklardan izole edildiği bildirilmektedir. Eski ve spesifik bir isim olmayan bakteriyel hemorajik sepsisemi adı bu gün bütün Gram negatif bakterilerin balıklarda neden olduğu sistemik enfeksiyonlar için kullanılmaktadır. Hareketli aeromonad sepsisemisi adı, yakın bir geçmişte ilk olarak 1982 yılında kültür yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*) kullanılmıştır. Bu isim genel olmayıp, kesin ve tarif edici bir isim olmuştur (Buchanan ve Palumbo 1985, Dwivedi vd 2008, Hickman-Brenner ve Macdonald 1987, Wei vd 2008).

Bakteriyel sepsiseminin klinik bulgularını gösteren balıklarda *A. hydrophila*, *A. cavie* ve *A. sobria* izole edilmiştir. Fakat bunlardan en çok izole edilen *A. hydrophila* olmuştur. Bu organizma *Rhabdovirus carpio* enfeksiyonundan veya parazitik enfestasyona uğramış sazan balıkların da ve üreme döneminde ölen salmonid balıklarda sekonder enfeksiyon etkeni olarak bulunmuştur. Bu nedenle hareketli aeromonadların primer patojen olup olmadıkları konusunda şüphe edilmektedir. Ancak, bu enfeksiyon etkeni hangi sebeple olursa olsun primer viral veya primer parazitik enfeksiyondan sonra konakçıyı istila edip şartları derhal kötüye götürerek ölümün baş sorumlusu olmaktadır (Austin ve Austin 1992, Çolak 1982, Fang vd 2004, Miyata vd 1995).

Klinik bulgular tipik olmayıp, hasta balıklarda genel olarak bakteriyel sepsisemide görülen hemorajik ve ülseratif deri ve kas lezyonları, yüzgeçlerde nekrotik lezyonlar, ekzoftalmus ve abdominal genişleme (*ascites*) görülür. Pullar gevşeyip düşebilir. Per akut

vakalarda eksternal belirtiler görülmeden ani ölümler görülebilir. Akut vakalarda, solungaçlarda ve anal bölgede hemorajikler, kronik vakalarda apse ve ülserler görülür. Bu ülserler daha sonra akuatik mantarlarla (*Saprolegnia*) ko-enfeksiyona neden olabilir. Internal olarak, iç organlarda hemoraji ve karın boşluğunda kanlı sıvı bulunur. Dalak ve böbrekler genişlemiştir (Snieszko ve Axelrod 1971, Çolak 1982, Parker 2002, Timur ve Timur 2003, Moksness vd 2004).

A. hydrophila genellikle çeşitli nedenlerle stres altında kalan balıklarda hemorajik septisemi ile seyreden hastalığa neden olur. Etken kuyruk ve yüzgeçlerde erime ve hemorajik septisemi dahil çeşitli bozukluklara neden olur. Hasta balıklar genellikle stres altındadır (Aoki vd 1999, Aydın ve Ciltas 2004, Bach vd 1978, Doukas vd 1998, Fang vd 2004).

Renklerinde koyulaşma ve vücut yüzeyinde geniş alanlarda ve yüzgeç diplerinde kızarıklığa neden olan hemorajiler, yüzgeçler ve kuyrukta nekroz veya vücudun yan taraflarını ve sırt kısmını kaplayan geniş ülserasyon gibi farklı eksternal lezyonlar görülebilir (Timur ve Timur 2003). Pulların dökülmesine neden olan küçük veya büyük yüzeysel lezyonların oluşumu; özellikle solungaç ve anal bölgedeki lokal hemorajiler, ülserler, ekzoftalma ve abdominal genişleme, anal prolapsus gibi çeşitli karakteristik özellikler bu hastalıkta gözlenebilir. Ülserler genellikle derin değildir. 0,5 cm çapındaki benekler şeklinde çok sayıda olabildiği gibi 2-3 tane büyük lezyonlar şeklinde siyah sırtlı beyaz kenarlı, parlak kırmızı hemorajik yüzeyler şeklinde görülebilirler. Ülser yüzeyi nekroze olarak kahverengine dönüşebilir. Düşük sıcaklıklarda genellikle *Saprolegnia diclina* ile sekonder olarak enfekte olur (Hazen vd 1978, Miyata vd 1995, Moksness vd 2004).

İnternal olarak klinik dropsy'de abdominal boşlukta çok miktarda kanlı sıvı bulunur. Birçok vakada başlıca post mortem bulgu, mesenterium ve iç (viseral) organlar, visceral peritonda hiperemi ve

hemorajidir. Ağır vakalarda bütün viseral organlar parlak kırmızı renkte ve fibrinoz yapışmalar görülebilir. Dalak gözle görülebilir şekilde genişlemiş, yuvarlaklaşmış ve kiraz kırmızı renktedir. Fokal olarak kas nekrozu (*myonecrose*) olabilir. Ancak nadiren furunkulosis'de olduğu gibi kasa dokusuna kadar iner. Kasların nekrozu yüzeysel olup ülser şeklindedir. Bazen rektal prolapsus görülebilir (Snieszko ve Axelrod 1971, Timur ve Timur 2003, Parker 2002).

Hasta balığı halsiz ve kayıtsız yüzmesinden dolayı kolayca tanımak mümkündür. Genellikle havuzların, tankların kenar kısımlarında durma eğilimi gösterirler. Çoğunlukla suda serbest halde yüzen yangılı intestinal mukus parçaları görülür (Timur ve Timur 2003).

Histolojik olarak bu durum yaygın fokal nekrotik lezyonlara neden olan septisemi şeklinde karakterize edilir. Yaygın hiperemi ve kapillar hemoraji ve çok sayıda makrofajın ve diğer lökositlerin kapillar damarlardan dokulara göçü görülür. Lezyonlar genellikle akut fokal liquefactive nekroz odakları veya zonları şeklindedirler. Özellikle dalak ve böbreklerdeki haemopoietik doku balıkta tamamen tahrip olur. Böbreklerde tübül epitelyum hücreleri genellikle lumene dökülür ve böbrek dokusunda çoğunlukla nekrotik tübüller ve haemopoietik doku ile sarılmış glomeruluslar kalır. Intestinal kapillar damarlar da congestion ve makrofaj ve lenfosit bakımından zengin submukozada ödem görülür. Barsakları örten mukoza genellikle nekrotik olup geniş bir alanda sindirim kanalı lumenine dökülmüştür. Kalp kasında, karaciğer, gonad ve pankreasta fokal nekroz görülür. Deri ülserasyon ve en son olarak da kasa kadar inen hemorajik nekroz görülür. Ancak lezyonlar genellikle vibriosis'de gözlenen lezyonlardan daha yüzeyseldir (Austin ve Austin 1987, Timur ve Timur 2003).

Etkenin tatlı sulara yaygın bir şekilde bulunduğu bildirilmektedir. Hareketli aeromonadlara bağlı olarak gelişen çeşitli

sendromlar hastalığı başlatan uyarıcıya bağlı çok değişiklik gösterir (Alpbaz 2005, Austin ve Austin 1992, Çolak 1982).

A. hydrophila'nın antibiyotik tedavisinde birçok diğer bakteriyel enfeksiyonlarda olduğu gibi en büyük problem hemen antibiyotiklere karşı direncin oluşmasıdır (Timur ve Timur 2003).

2.2.4.7. Hareketli aeromonas türlerinin insan sağlığındaki rolü

Hareketli *Aeromonas* türlerinin 20 yıldan uzun bir süredir potansiyel gıda kaynaklı patojenler olduğu bilinmektedir (Isonhood e Drake 2002).

Yapılan çalışmalar, kanatlı etlerinin hareketli *Aeromonas* türleri ile %28-100 arasında kontamine olduğunu, bu durumun halk sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturduğu bildirilmiştir (Kirov 1990, Khurana ve Kumar 1997, Palumbo 2000).

Hareketli *Aeromonas* türleri buzdolabı sıcaklığında üreyebilen ve halk sağlığı açısından önem taşıyan gıda kökenli enfeksiyon etkenleridir. Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda, özellikle sıcak bölgelerde, *Aeromonas* türlerinin insanlarda diyare etkeni olarak izole edildiği ve diğer klasik enterit etkenleri olan *Salmonella* ve *Shigella* gibi önemli olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda etkenin kanatlı eti ve ürünlerinde yüksek oranda kontaminasyon yarattığını ortaya konmuştur (Burke 1984, Buchanan ve Palumbo 1985, Sachan ve Agarwal 2000).

Hareketli *Aeromonas* türleri gıda enfeksiyonları yanında ölümle sonuçlanabilen septisemilere, yara enfeksiyonlarına, nekrozlara, akciğer, pleura, endokard ve diğer iç organ yangılarına sebep olabilmektedir. Meydana gelen diyareler akut olabildiği gibi; kanlı ve koleral formda da tüm yaş gruplarını etkileyebilmektedir (Janda 1991).

Bununla birlikte immun sistemi zayıflamış olanlar ve beş yaş altı çocuklar özellikle risk altındadırlar. *Aeromonas* gastroenteritlerinin

semptomları çok komplekstir. Diyare sulu, kanlı, sümügümsü olabileceği gibi bulantı, karın ağrısı, kusma ve ateş gibi belirtilerde görülebilmektedir (Waites 1991).

2.2.5. Bakteriyel hastalıkların moleküler teşhisi

2008 yılı itibariyle yaklaşık 65 bin ton alabalık üretimiyle (TUİK, 2008) Avrupa' da ilk sıralarda yer alan ülkemizde, etkili hastalık kontrolü ve patojenlerin hızlı tayini önem taşımaktadır.

Her türlü ortam ve şartlarda herhangi bir canlıya ihtiyaç duymadan yaşamını sürdürebilen patojen bakterilere karşı balıkların çoğu dayanıksızdır. Özellikle ekonomik değeri olan alabalık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde hastalıklardan dolayı ölümler ciddi maddi kayıplara neden olabilmektedir. Başta insan ve çevre sağlığının güvenliği ve bunun yanında ciddi ekonomik kayıpların önlenmesi açısından hastalık etkeninin varlığının kısa zamanda belirlenmesi, hastalık yapan gen bölgelerinin karakterize edilmesi, konakçı ve patojenite üzerine çalışmalar yapılması ve bunların sonunda gerekli tedavi yoluna gidilmesi önem taşımaktadır.

Son yıllarda hastalığa neden olan bakterinin tespiti konusunda moleküler biyolojik yöntemler de kullanılmaktadır (Del Cerro vd 2002, Fang vd 2004, Gonzales vd 2004, Ewart vd 2005, Şen 2005, Wei vd 2008).

Bu amaçla çalışma kapsamında 4 *Aeromonas* türü DNA-temelli yöntemlerle tespit edilerek hastalıkla ilişkili olan gen bölgelerinin (tet, ompTS, Aero, F3, B3, AH) genetik karakterizasyonu yapılmıştır.

2.3. *Aeromonas hydrophila*'nın Biyolojisi

2.3.1. *A. hydrophila*'nın Sistematığı

A. hydrophila'nın sistematığı Çizelge 2.5. deki gibidir.

Çizelge 2.5. *A. hydrophila*'nin Sistematığı

Alem:	Bacteria
Şube:	Gammaproteobacteria
Sınıf:	Aeromonadales
Cins:	<i>Aeromonas</i>
Tür:	<i>A. hydrophila</i>

2.3.2. *A. hydrophila*'nın Morfolojisi

A. hydrophila en fazla 0,8-1 x 1,0 – 3,5 mikron boyutlarında Gram negatif, fermantatif çomaklardır. Tek, polar flagellaları sayesinde hareket eden basillerdir. Çoğu izolatları 37°C'de üreme özelliğine sahiptir. Selektif olmayan TSA besiyerinde 20–25 °C'de 24–48 saat inkübe edildiklerinde krem rengi, yuvarlak, hafif kabarık 2–3 mm çapında koloniler gelişir.

Gram negatif bakterilerden olan *A. hydrophila* amfibiler, sürüngenler, kuşlar ve memelileri içeren geniş bir konakçı kitlesini enfekte eder. Ancak en çok balık patojeni olarak bilinir (Şekil 2.5.). Dünya çapında tatlı su balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde büyük ekonomik kayıpla sonuçlanan Hareketli Aeromonad Septisemi (MAS) hastalığına neden olur.

Günümüzde *A. hydrophila*'nın neden olduğu hastalıklar antibiyotik ile tedavi edilebilmektedir (Fang vd 2003).

2.4. *Aeromonas veronii*' nin Biyolojisi

2.4.1. *A.veronii*' nin Sistematığı

A.veronii' nin sistematığı Çizelge 2.6. daki gibidir.

Çizelge 2.6. *A.veroni*' nin sistematığı

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gammaproteobacteria
Takım:	Aeromonadales
Familya:	Aeromonadaceae
Cins:	<i>Aeromonas</i>
Tür:	<i>A. veronii</i>

2.4.2. *A.veronii*' nin Morfolojisi

A. veronii Gram negatif çubuk şekilli bir bakteridir. Soğuk sularda bulunur ve insanlar için patojen olabilmektedir. *A. veronii* insanlarda yara enfeksiyonlarından ishale kadar birçok değişik hastalığa sebep olabilir (Hickman-Brenner ve Macdonald 1987).

2.5. *Aeromonas sobria*' nın Biyolojisi

2.5.1. *A.sobria*' nın Sistematığı

A.sobria' nın sistematığı Çizelge 2.7. deki gibidir.

Çizelge 2.7. *A.sobria*' nin sistematığı

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gammaproteobacteria
Takım:	Aeromonadales
Familya:	Aeromonadaceae
Cins:	<i>Aeromonas</i>
Tür:	<i>A. sobria</i>

2.5.2. *A.sobria*'nın Morfolojisi

A. sobria, Aeromonadaceae familyasına ait Aeromonas cinsi içinde bulunan, Gram negatif, hareketli, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerob, asidorezistans olmayan çomak biçiminde bir bakteridir.

2.6. *Aeromonas caviae*' nın Biyolojisi

2.6.1. *A.caviae*' nın Sistematığı

A. caviae' nın sistematığı Çizelge 2.8. deki gibidir.

Çizelge 2.8. *A.caviae*' nın Sistematığı

Alem:	Bacteria
Şube:	Proteobacteria
Sınıf:	Gammaproteobacteria
Takım:	Aeromonadales
Familya:	Aeromonadaceae
Cins:	<i>Aeromonas</i>
Tür:	<i>A. caviae</i>

2.6.2. *A.caviae*' nın Morfolojisi

A. caviae en fazla 0,8-1 x 1,0 – 3,5 mikron boyutlarında Gram negatif, fermantatif çomaklardır. Tek, polar flagellaları sayesinde hareket eden basillerdir. 37°C'de üreme özelliğine sahiptir. Selektif olmayan TSA besiyerinde 20–25 °C'de 24–48 saat inkübe edilir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmanın yürütüldüğü yer

Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1.2. Balık materyalinin temin edildiği yer

Araştırmada kullanılacak balık örnekleri Muğla ili Fethiye bölgesindeki özel alabalık işletmelerinden (Çobanlar Alabalık, Selina Su Ürünleri, Gümüşdoğa Su Ürünleri, Aksoylar Su Ürünleri ve Başar Alabalık) elde edilmiştir.

3.1.3. Hasta balık materyalinin temini

Balık materyali Fethiye bölgesindeki özel alabalık yetiştiriciliği yapan işletmelerden hastalık görülen dönemlerde temin edilmiştir. Steril koşullarda alınan balık örnekleri aseptik koşullarda laboratuvara getirilmiştir.

3.1.4. Referans bakteri suşlarının temini

Referans olarak *A.hydrophila*, *A.veroni* ve *A.sobria* suşları ticari yollarla özel firmalardan satın alınmıştır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan besiyerleri

3.1.5.1. Tripton soy agar besiyeri (TSA)

Aeromonas sp. üretiminde genel katı besiyeri olarak kullanılır. Bileşiminde kazein peptonu 15,0 g/L; Soya besiyeri peptonu 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; Agar-agar 15,0 g/L. bulunur.

Dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve

sarımsı kahve renktedir. Sterilizasyon sonrası 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

3.1.5.2. Tripton soy broth besiyeri (TSB)

Aeromonas sp. üretiminde genel sıvı besiyeri olarak kullanılır. Bileşimi kazein peptonu 17,0 g/L; soya besiyeri peptonu 3,0 g/L; D(+) Glukoz 2,5 g/L; Sodyum Klorid 5,0 g/L; Potasyum-2-Hidrojen Fosfat 2,5 g/L. bulunur.

Dehidre besiyeri, 30,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde gerekirse ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtılır ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Hazırlanmış besiyeri berrak sarımsı renkte olup, 25 °C'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

3.1.5.3. Kanlı agar

Aeromonas sp. üretimi gibi başta zor gelişenler olmak üzere mikroorganizmaların geliştirilmesi ve hemoliz reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla Kanlı Agar ve Kaynamış (Çikolata) Kanlı Agar hazırlanması için kullanılan katı besiyeridir. Bileşiminde Nutrient substrat (kalp ekstraktı ve peptonlar) 20,0 g/L; Sodyum Klorid 5,0 g/L; Agar-agar 15,0 g/L. bulunur.

Dehidre besiyeri 40,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde ısıtılarak damıtık su içinde eritilir ve otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir. Otoklav çıkışında 45-50 °C'a soğutulur, %5 oranında defi brine koyun kanı ilave edilir, karıştırılır ve Petri kutularına 12,5'er mL dökülür. Bazal besiyeri berrak, sarımsı kahverengindedir ve 25 °C'da pH'sı 6,8±0,2'dir. Kan ilave edilmiş besiyeri buzdolabında en çok 3 ay depolanabilir.

3.1.6. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

DNA izolasyonunda; SET tuz solüsyonu (Çizelge 3.1.), KİA (kloroform: isoamilalkol) (Çizelge 3.2.), TAE (Tris asetik asit EDTA) (Çizelge 3.3.), TE (Tris-EDTA) (Çizelge 3.4.), TBE (Tris Boric asit EDTA)

solüsyonları (Çizelge 3.5.), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Çizelge 3.6.), proteinaz K (10 mg/ml), Kloroform, İzoamil alkol, Etanol, Sodyum asetat, Lizozim enzimi kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. SET Tuz Solüsyonu

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon (pH=8,0)
NaCl	0.44 gr
EDTA	0.85 gr
Tris	0.24 gr
dH ₂ O	100 ml'ye tamamlanmıştır

Çizelge 3.2. KİA (kloroform:isoamilalkol)

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon (pH=8,0)
Kloroform	24 ml
İzoamilalkol	1 ml

Çizelge 3.3. TAE (Tris asetik asit EDTA) Tampon Çözeltisi

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon (pH=8,0)
Tris base	108 gr.
Boric asit	55 gr.
EDTA	40 ml.
dH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanmıştır

Çizelge 3.4. TE (Tris-EDTA) Tampon Çözeltisi

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon (pH=8,0)
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Çizelge 3.5. TBE (tris boric asit EDTA) Tamponu

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon (pH=8,0)
Tris base	108 gr.
Boric asit	55 gr.
EDTA	40 ml.
dH ₂ O	1000 ml'ye tamamlanmıştır

3.1.6.1. PCR amplifikasyonunda kullanılan kimyasallar

PCR uygulamalarında; Tag DNA polimeraz enzimi, dNTP karışımı, PCR tamponu, MgCl₂, Primerler ve Steril dH₂O (steril) kullanılmıştır.

3.1.6.2. PCR amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için kullanılan agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Elektroforezde; Agaroz, EtBR(10mg/ml), 1xTAE, DNA işaretleyici (100 bp-1000 bp) ve Yükleme tamponu (BFB; Brom Fenol Blue) kullanılmıştır.

Çizelge 3.6. Agaroz jel hazırlanışı

Kimyasalın Adı	Son Konsantrasyon (pH=8,0)
Agaroz	0.3 gr
dH ₂ O	30 ml

3.1.6.3. Yararlanılan alet ve ekipmanlar

Laboratuvarda yapılan işlemler sırasında; Thermal Cycle (Techne), UV Görüntüleme Sistemi, Yatay elektroforez, Etüv, Otoklav, Derin Dondurucu, Santrifüj, Saf Su Cihazı, Elektronik Teraziler, Vorteks, Manyetik karıştırıcı, pH metre, Otomatik pipetler, PCR tüpleri, Plastik tüp ve değişik boyutlarda cam malzemeler kullanılmıştır.

3.2. Metot

Tüm çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.2.1. Hasta balık materyallerinin laboratuara getirilmesi

Klinik bulguları gözlemlenen hasta balıklar ve doku örnekleri Muğla yöresindeki Alabalık İşletmelerinden (Çobanlar Alabalık, Selina Su Ürünleri, Gümüşdoğa Su Ürünleri, Aksoylar Su Ürünleri ve Başar Alabalık) toplanarak ve soğuk şartlarda laboratuara transfer edildi.

Hasta balıkların ağırlıkları ve uzunlukları ölçülüp kaydedilmiştir. Her balık örneğinden steril pamuklu çubukla sürüntü alınıp çubuğun uç kısmı kesilmiştir. Bu kısım 1ml. TSB besiyeri içeren ependorf tüplerine konulmuş daha sonra DNA izolasyonu ve bakteri izolasyonu için saklanmıştır. Ayrıca her balığın karaciğerinden ve böbreğinden alınan örneklerden besiyerlerine ekim yapılmıştır. Bu besiyeri de daha sonraki işlemler için saklanmıştır.

3.2.2. Hasta balık materyallerinden alınan bakteri izolasyonu

İncelemek için örnek olarak hastalık belirtisi gösteren balıklar seçildi. Seçilen hasta balık örneğinin dış yüzeyi alkolle dezenfekte edildi. Daha sonra steril diseksiyon seti kullanılarak balık, anüsten operkuluma kadar kesilerek açıldı. Alevde kızarıncaya kadar ısıtarak steril edilen bir öze yardımıyla karaciğerden ve böbrekten örnekler alınıp, TSA, TSB ve Kanlı Agar'a ekimler yapıldı (Çolak 1982).

Bakterileri izole edebilmek için farklı organlardan alınan örnekler, Trypticase Soy Agar (TSA), Tryptone Soy sıvı besiyeri (TSB) ve Kanlı Agar besiyerine ayrı ayrı ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri etüvde uygun sıcaklıkta uygun sürelerde inkübe edildi (Timur ve Timur 2003, Austin ve Austin 2007).

3.2.3. Çalışmada kullanılan referans bakterilerin üretimi

Referans bakteri olarak *A. hydrophila* ATCC 19570, *A. caviae* ATCC 15468, *A.veronii* ATCC 35624 ve *A. sobria* ATCC 43979 kullanıldı. Bu bakteriler Tripton Soy Agar (TSA), Tripton Soy Broth (TSB) ve Kanlı Agar besiyerinde 22-25 °C’ de 24-48 saat üretildi(Austin ve Austin 1992). Daha sonra üretilen bakterilerden DNA izolasyonu yapıldı.

3.2.4. Bakteriyel DNA izolasyonu

Standart bakteri olan *A. hydrophila* ATCC 19570, *A. caviae* ATCC 15468, *A.veronii* ATCC 35624 ve *A. sobria* ATCC 43979 ve hasta balıktan izole edilen bakteri örneklerinin DNA’sı Miriam vd 1992 ve Lucangeli vd 2000 metodları modifiye edilerek saflaştırılmıştır.

1. Numaralandırılmış örneklerden 2 ml sıvı alınmış, her biri 16.000 Xg’de soğutmalı ultra santrifüj cihazında santrifüj edildikten sonra süpernatant ve çökmüş partiküller ayrılmıştır.

2. Çökmüş hücre ve tüm atık partiküller PBS tamponu ile iyice berraklaşınca kadar 2-3 kez yıkanıp 3500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiştir.

3. Hazırlanan set solüsyonundan 500µl, lizis tamponundan ise 100 µl eklenmiş ve 37°C’deki su banyosun da 30 dk. bekletilmiştir.

4. Üzerine 100 µl SDS, 50 µl proteinaz K eklenmiş ve 55 °C ‘deki su banyosunda 2 saat bekletilmiştir.

5. Bunun üzerine 200 µl NaCl eklenmiş ve el ile hafifçe karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 500 µl 24:1 Kloroform/ izoamil alkol konulmuş ve yine el ile 30 dk. boyunca karıştırılmıştır. Bu karışım 3500 rpm’de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatantlar yeni bir tüpe boşaltılmıştır.

6. Süpernatantların üzerine 1 ml. saf etanol eklenmiş ve 3500 devirde 15 dk. santrifüj edilmiştir.

7. %70’lik etonolden 500 µl eklenmiş ve 1000 devirde 3 dk. santrifüj edilmiştir.

8. Çıkan tüplerdeki süpernatantlar boşaltılıp tüplerin kapakları açık bir biçimde kurutma kağıdının üzerinde yaklaşık 30 dk. bekletilmiştir.

9. Alkol kokusu giden örneklerin üzerine en son olarak 100 µl TE tamponu eklenmiş ve DNA'lar kullanıma hazır hale getirilmiştir.

İzole edilen DNA'lar derin dondurucu da -20' °C saklanmıştır.

3.2.5. Bakteriyel DNA'nın kalitatif tayini

DNA'ların izolasyonunun son aşamalarında %70' lik alkol çözeltisi eklendiğinde tüp içerisinde çok yoğun olmayan bir pelet gözlenmiştir.

3.2.6. Bakteriyel DNA'nın kantitatif spektrofotometrik tayini

DNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbansların oranıyla (A_{260}/A_{280}) belirlemek mümkündür. Absorbsiyon spektrumunun şekli aynı zamanda ekstraksiyon katsayısı, bazların doğasıyla değişiklik arz eder. Şöyle ki, saf DNA için $A_{260}/A_{280}=1,8$ 'dir. Saf bir RNA'nın ki ise 2,0 civarındadır. Protein doğal olarak $\lambda_{max}=280$ olduğu için 260/280 oranı 1'den küçüktür (gerçekte $\approx 0,5$). Buna göre bir DNA örneğinde A_{260}/A_{280} değeri 1,8'den büyük ise RNA kontaminasyonuna 1,8'den küçük ise protein veya fenol kontaminasyonuna işaretir. A_{260}/A_{280} 1,5-1,8 arasında olması DNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir (Turner vd 2004).

260 nm dalga boyundaki 1 Optik Dansitite (OD);

Çift zincir DNA için 50 ng/ul DNA

Tek zincir DNA için 20-33 ng/ul DNA

RNA molekülü için 40 ng/ul RNA anlamına gelmektedir.

Buna göre izole edilen DNA'ların kantitatif tayini için spektrofotometrede 260 ve 280 nm de absorbansları ölçülmüştür (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7. Spektrofotometrik Karışım

Kimyasalın Adı	Hacim
dH ₂ O	999 µl
DNA	1 µl

3.2.7. Primerlerin hazırlanması

A. hydrophila ATCC 19570, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* ATCC 35624 ve *A. sobria* ATCC 43979 (Wei vd 2008) için ileri ve geri primer setleri hazırlanmıştır (Çizelge 3.8.) ve ticari şirketlerden sağlanmıştır (Nawaz vd 2006, Khushiramani vd 2007, Chu ve Lu 2005).

Çizelge 3.8. Bakterilerin Primer Listesi

	GEN BÖLGESİ	PRİMER DİZİSİ	GENOM BOYU
<i>A. veronii</i>	tetAF	5-GCTACATCCTGCTTGCCTTC-3	211 bp
	tetAR	5-GCATAGATCGCCGTGAAGAG-3	
<i>A. hydrophila</i>	ompTS-F	5-GCAGTGGTTTATGACAAAGACG-3	1008 bp
	ompTS-R	5-TTAGAAGTTGTATTGCAGGGC-3	
<i>A. hydrophila</i>	Aero1-F	5'-CTCAGTCCGTGCGACCGACT-3'	462 bp
	Aero2-R	5'-GATCTCCAGCCTCAGGCCTT-3'	
<i>A. caviae</i>	F3	5-AAGTCGTTACCCAATTCAGAG-3	292 bp
	B3	5-CCCTGTTACCGCCGTGAAAG-3	331 bp
<i>A. sobria</i>	AH1	5-GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA-3	685 bp
	AH2	5-CGTGCTGGCAACAAAGGACAG-3	

3.2.8. Primerlerin Tm sıcaklıklarının hesaplanması

Kullanılan primerlerin Tm sıcaklıkları Oligo Analyzer 3.0 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.9. Primer Tm sıcaklıklarının Hesaplanması

TmF primer=57,3 °C	TmR primer= 58,8 °C
Tmort= (TmF primer + TmR primer) /2= 58,05 °C	

3.2.9. PCR reaksiyonu ve optimizasyonu

PCR için bu primer setleri ve saflaştırılmış genomik DNA, PCR master karışımına (Fermantas, Kanada) ilave edilmiştir ve PCR için hazır hale getirilmiştir. Bu işlemde kullanılan PCR karışımı Çizelge 3.10., 3.11 ve 3.12' de verilmiştir.

Çizelge 3.10. Tetracilin (tet) geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12 µl
Mg+2	8 µl
Geri primer	8 µl
İleri primer	8 µl
dNTP'ler	16 µl
Tag polimeraz	4 µl
Steril distile su	56 µl
TOPLAM	112µl

Oluşan karışım 4 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 3 tüpün içine 2 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cycler' a yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.11. Dış Membran Protein Transfer Geni (OmpTS) (Outer Membran Protein Transplant System Gene) için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12 µl
Mg+2	8 µl
Geri primer	8 µl
İleri primer	8 µl
dNTP'ler	8 µl
Tag polimeraz	4 µl
Steril distile su	64 µl
TOPLAM	112µl

Oluşan karışım 4 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 3 tüpün içine 2 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cycler' a yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.12. Aero (Aerosin) geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12 µl
Mg+2	8 µl
Geri primer	8 µl
İleri primer	8 µl
dNTP'ler	16 µl
Tag polimeraz	4 µl
Steril distile su	56 µl
TOPLAM	112

Oluşan karışım 4 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 3 tüpün içine 3 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cycler' a yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.13. AH geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12 µl
Mg+2	8 µl
Geri primer	8 µl
İleri primer	8 µl
dNTP'ler	16 µl
Tag polimeraz	4 µl
Steril distile su	56 µl
TOPLAM	112

Oluşan karışım 4 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 3 tüpün içine 3 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cyclers' a yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.14. F3-B3 geni için PCR optimizasyonu

Kimyasalın adı	Hacim
10x buffer	12 µl
Mg+2	8 µl
Geri primer	8 µl
İleri primer	8 µl
dNTP'ler	8 µl
Tag polimeraz	4 µl
Steril distile su	64 µl
TOPLAM	112µl

Oluşan karışım 4 tane PCR tüpüne eşit olarak paylaşılır. Bir tanesi negatif kontrol olarak kalmak üzere 3 tüpün içine 3 µl DNA koyulmuştur ve PCR uygulaması için thermal cyclers' a yerleştirilmiştir.

3.2.9.1. Tez çalışmasında kullanılmış olan primerlerin pcr protokolleri

Her bir gen bölgesi için kullanılmış olan PCR protokolleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir (Çizelge 3.13., 3.14., 3.15., 3.16. ve 3.17.).

Çizelge 3.15. Tetracilin (tet) geninin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94°C	10dk.	1
95°C	0,5dk.	30
60°C	0,5dk.	30
72°C	0,5dk.	30
72°C	5dk.	-

Çizelge 3.16. Dış Membran Protein Transfer Geni (OmpTS) (Outer Membran Protein Transplant System Gene) geninin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95°C	10dk.	1
95°C	1dk.	30
60°C	1dk.	30
72°C	1dk.	30
72°C	10dk.	-

Çizelge 3.17. Aero (Aerosin) geninin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94°C	5dk.	1
94°C	2dk.	30
62°C	2dk.	30
72°C	2dk.	30
72°C	10dk.	-

Çizelge 3.18. AH geninin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
95°C	10dk.	1
95°C	1dk.	30
60°C	1dk.	30
72°C	1dk.	30
72°C	10dk.	-

Çizelge 3.19. F3-B3 geninin PCR protokolü

Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
94°C	5dk.	1
94°C	2dk.	30
62°C	2dk.	30
72°C	2dk.	30
72°C	5dk.	-

3.2.10. PCR amplifikasyon ürünlerini görüntülemek için kullanılan jel elektroforezi, boyama ve görüntüleme

Belirlenen gen ürünlerinin her biri mini elektroforez tankında ethidium bromide boyası ile hazırlanmış %1'lik agaroz jelde 240 Volt, 80 amper' de 1 saat yürütülmüş ve UV lambası altında incelenmiştir. Fotoğraf makinesiyle resimleri çekilmiş ve bulgulara eklenmiştir.

Çizelge 3.20. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde Adı	Hacim
Agaroz	0,30 gr
1xTBE Tamponu	30 ml
EtBr (10 mg/ml)	5,5 µl
BFB	2 µl
DNA	10 µl

DNA'nın kontrolü için %1'lik agaroz jeli hazırlanmıştır. Çizelge 3.16' da hacimleri belirtilmiş olan agaroz ve 1xTBE tamponu mikrodalga fırında 30 sn kadar kaynatıldıktan sonra üzerine EtBr konulmuş ve elle hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. Daha sonra elektroforez küveti içine dökülmüştür. Yaklaşık 10-15 dk. da donan agaroz jeline örnek yüklenecek kuyucuklar oluşturulmuştur. Her bir kuyuya, teker teker 2 µl BFB ile boyanmış 10 µl DNA örneği yüklenmiştir. Daha sonrada 115 Volt'da 20 dk. yürütülmüştür.

4. BULGULAR

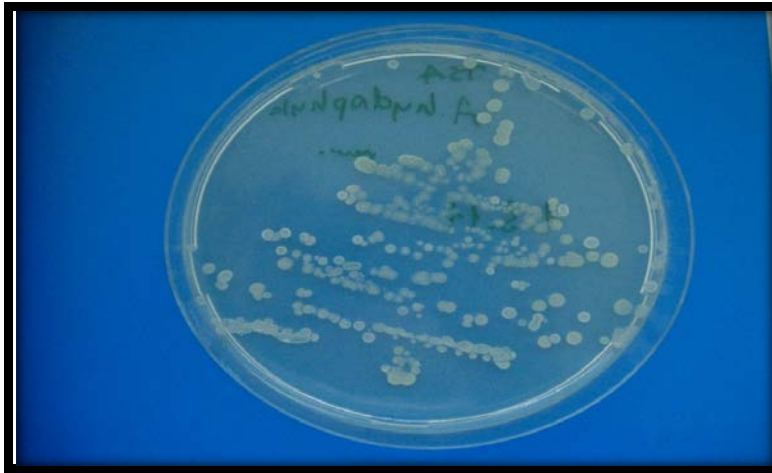
Çalışma 2010-2011 tarihleri arasında Muğla ilinin Fethiye ilçesinin Ören bölgesindeki Alabalık Yetiştirme Çiftliklerinden hastalık görüldüğü dönemlerde alınan hasta balık örneklerinin incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

4.1. Hasta Balık Materyallerinin Klinik Bulguları

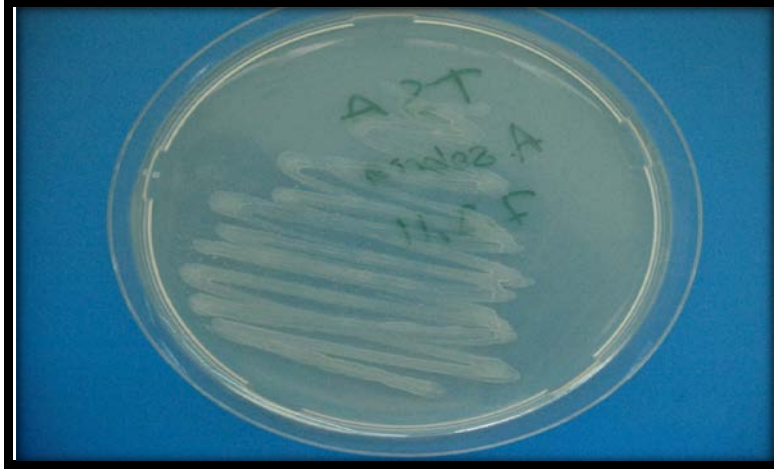
Hasta balık materyali aseptik koşullarda laboratuara getirilmiştir. Balık örnekleri klinik bulguları gözlemlendikten sonra fotoğrafları çekilmiştir. Hasta balıkların renginde ve karın kısmında koyulaşma, beneklerinde silikleşme ve büyümesinde yavaşlama şeklinde gözlemlenmiştir.

4.2. Referans Bakterilerin Suşlarının Üretimi

Çalışmada referans bakteri olarak kullanılan *A. hydrophila* 19570, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* ATCC 3562 ve *A. sobria* ATCC 43979 uygun besiyeri ortamında (TSA, TSB, Kanlı Agar) ve uygun koşullarda (22-25 °C' de 24-48 saat) üretilmiştir. DNA izolasyonu yapıncaya kadar besiyeri ortamlarında saklanmıştır ve petri kaplarında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4.).



Şekil 4.1. Referans *A. hydrophila* suşunun TSA besiyerindeki görüntüsü



Şekil 4.2. Referans *A. sobria* suşunun TSA Besiyerindeki görüntüsü



Şekil 4.3. Referans *A. veronii* suşunun TSA Besiyerindeki görüntüsü



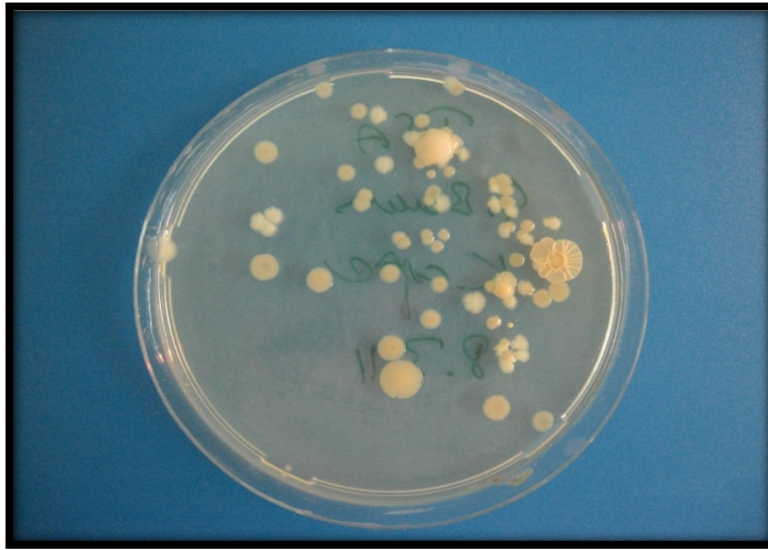
Şekil 4.4. Referans *A. caviae* suşunun TSA besiyerindeki görüntüsü

4.3. Hasta Balık Materyallerinden Bakteri İzolasyon Bulguları

Hasta balıkların yüzeyinden steril çubuk yardımıyla sürüntü alınmıştır, iç organlardan öze yardımıyla TSA, TSB ve Kanlı Agar' a ekim yapılmıştır. Uygun koşullarda inkübe edilip üretilen izolatlar fotoğraflanmıştır (Şekil 4.5. ve 4.6.). Petri kaplarındaki bu izolat bakteriler, hastalık etkeni bakterinin varlığını tespit edinceye kadar için soğuk koşullarda saklanmıştır.



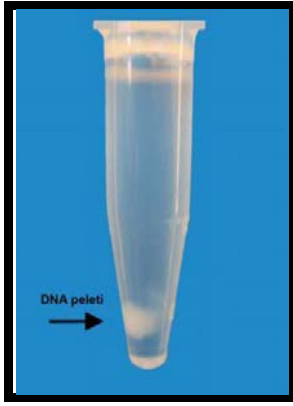
Şekil 4.5. Böbrekten alınan bakterilerin petri kabında görüntüsü



Şekil 4.6. Hasta balık örneğinin karaciğerinden alınan bakterilerin petri kabında görüntüsü

4.4. Referans Bakterilerden Elde Edilen Genomik DNA Ekstraksiyonuna İlişkin Bulgular

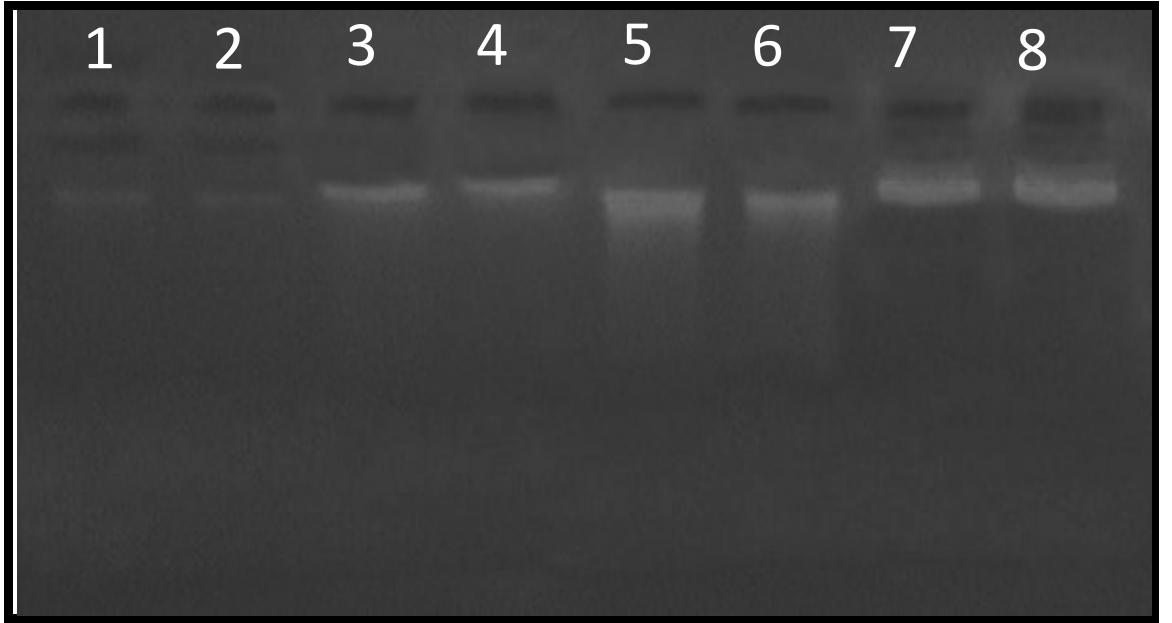
Çalışmada referans bakteri olarak kullanılan *A. hydrophila* (ATCC 19570), *A. caviae* (ATCC 15468), *A. veronii* (ATCC 35624) ve *A. sobria* (ATCC 43979)' dan ekstre edilmiştir. Genomik DNA tüp içerisinde beyaz renkli bir yumak şeklinde oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu da DNA izolasyonunun gerçekleştiği anlamına gelmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İzole edilen DNA peleti

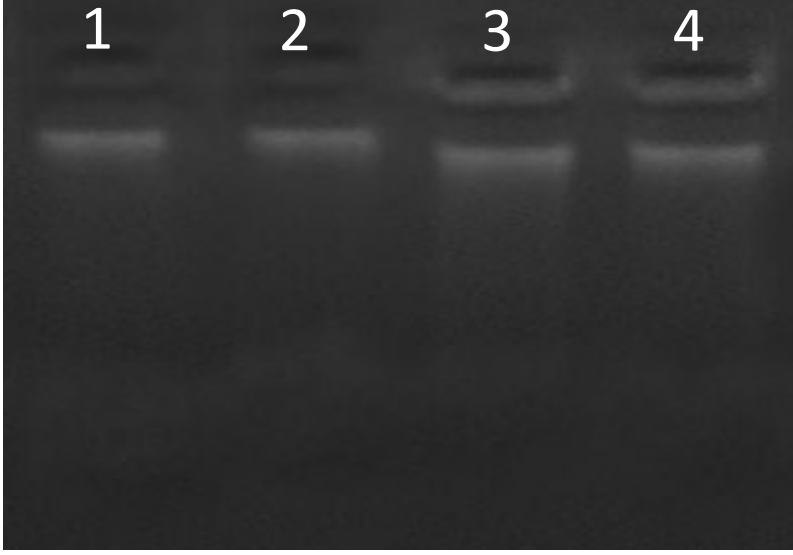
4.5. Balık Materyallerinden İzole Edilen Bakterilerin Genomik DNA Ekstraksiyon Bulguları

Şekil 4.8.' de Referans bakterilerden DNA izolasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri görülmektedir. DNA izolasyonunda tek ve ışıklı bir bant deseni DNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir.



Şekil 4.8. Referans bakterilerden elde edilen genomik DNA izolasyonlarının %1' lik agaroz jelde görüntüleri.1,2 *A.hydrophila* DNA'sı, 3,4 *A.sobria* DNA' sı 5,6 *A.veronii* DNA' sı 7,8 *A.caviae* DNA' sı.

Şekil 4.9.' da hasta balık materyallerinden izole edilen bakterilerin DNA izolasyonu sonrasında agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri görülmektedir.



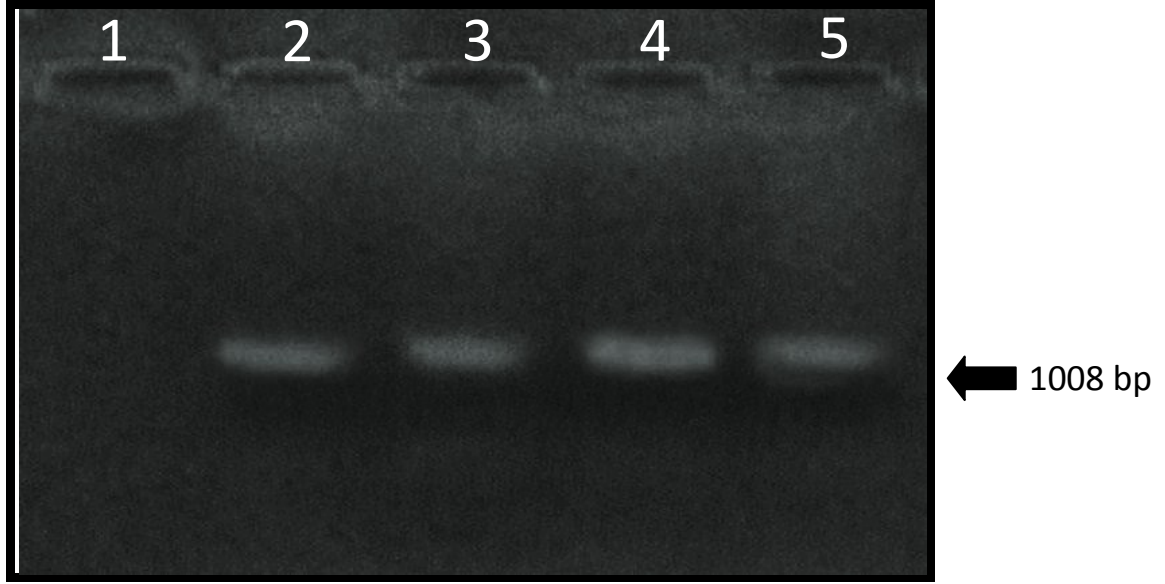
Şekil 4.9. Hasta balık materyallerinden izole edilen bakterilerin elde edilen Genomik DNA ekstraksiyonu bulgularının agaroz jeldeki görüntüsü 1,2. Karaciğer izolat DNA'sı, 3,4. Böbrek izolat DNA'sı.

4.6. PCR Uygulamalarına İlişkin Bulgular

4.6.1. Referans bakterilerin PCR bulguları

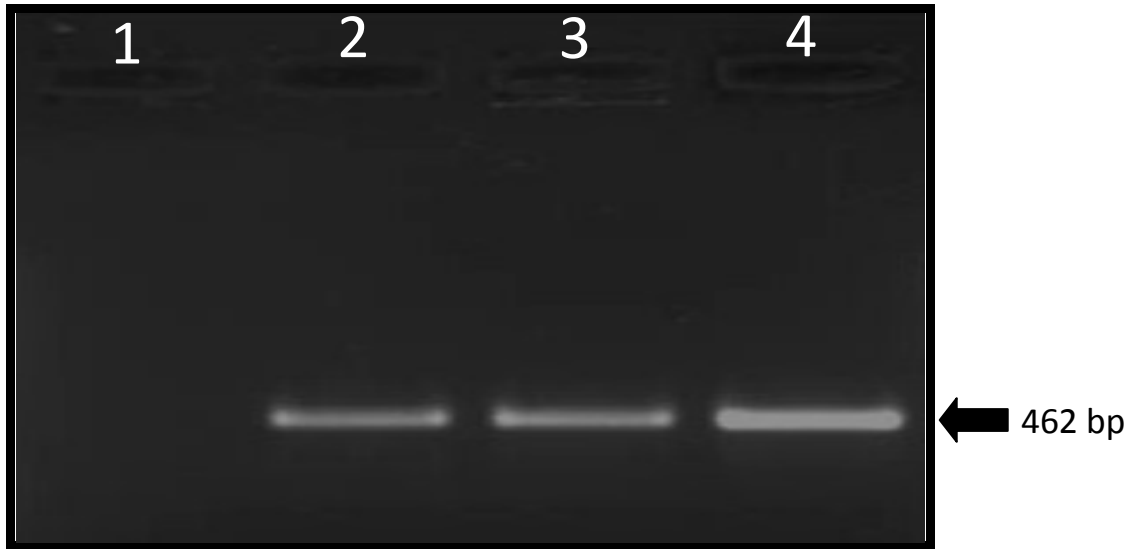
Çalışmamızda referans bakterilerin gen bölgelerini belirlemek üzere 4 bakteri (*A. hydrophila* ATCC 19570, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* ATCC 35624 ve *A. sobria* ATCC 43979) ve 5 gen bölgesi (tet, ompTS, Aero, F3 ve B3) ile 20 adet PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.10., 4.11., 4.12, 4.13., 4.14.' de görüntülenmiştir.

Referans bakterilerden *A. hydrophila*'nın 1.gen ürünü olan OmpTS geni ürünü 1008 bp büyüklüğünde bir bant vermiştir.



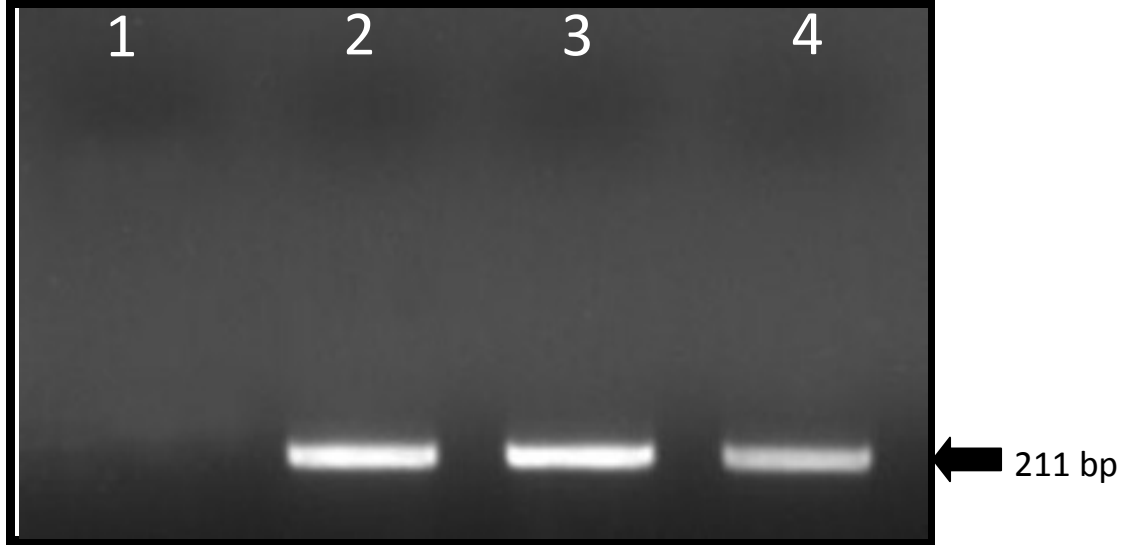
Şekil 4.10. *A.hydrophila*'nın OmpTS primeri ile PCR sonucu 1. Negatif kontrol grubu, 2.3.4.5. *A.hydrophila*'nın PCR sonuçları

Referans bakterilerden *A. hydrophila*'nın 2. gen bölgesi Aero geni ürünü 462 bp büyüklüğünde bir bant vermiştir.



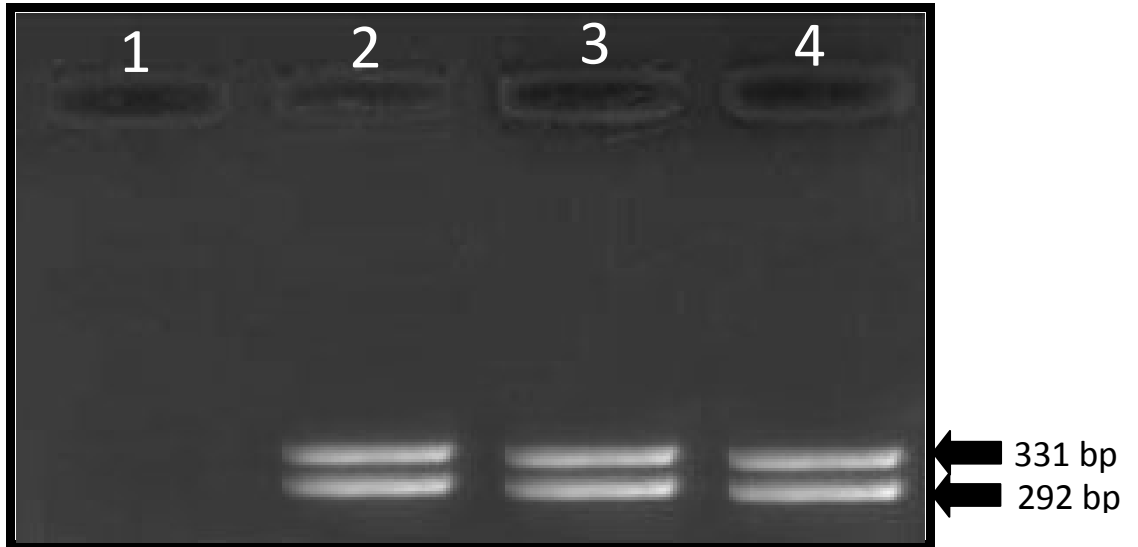
Şekil 4.11. *A.hydrophila*'nın Aero primeri ile PCR sonucu 1. Negatif kontrol grubu, 2.3.4. *A.hydrophila*'nın PCR sonuçları

Referans bakterilerden *A.veronii*' nin tet geni ürünü 211 bp büyüklüğünde bir bant vermiştir.



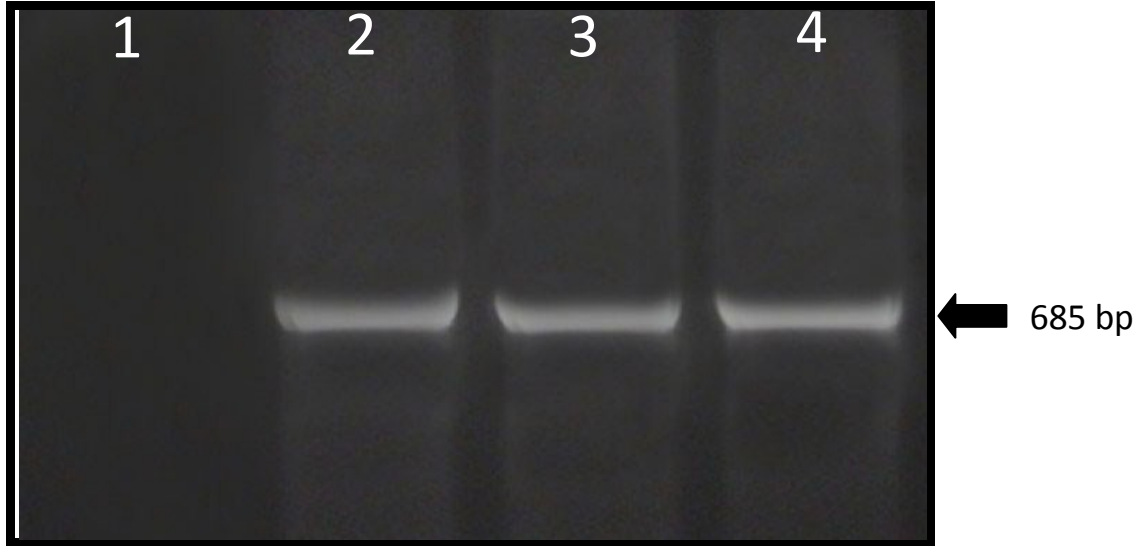
Şekil 4.12. *A.veronii*'nin tet primeri ile PCR sonucu 1. Negatif kontrol grubu, 2.3.4. *A.veronii*'nin PCR sonuçları

Referans bakterilerden *A.caviae*' nin F3-B3 geni ürünü 292-331 bp büyüklüğünde bir bant vermiştir.



Şekil 4.13. *A.caviae*'nin tet primeri ile PCR sonucu 1. Negatif kontrol grubu, 2.3.4. *A.caviae*'nin PCR sonuçları

Referans bakterilerden *A.sobria*'nın AH geni ürünü 685 bp büyüklüğünde bir bant vermiştir.



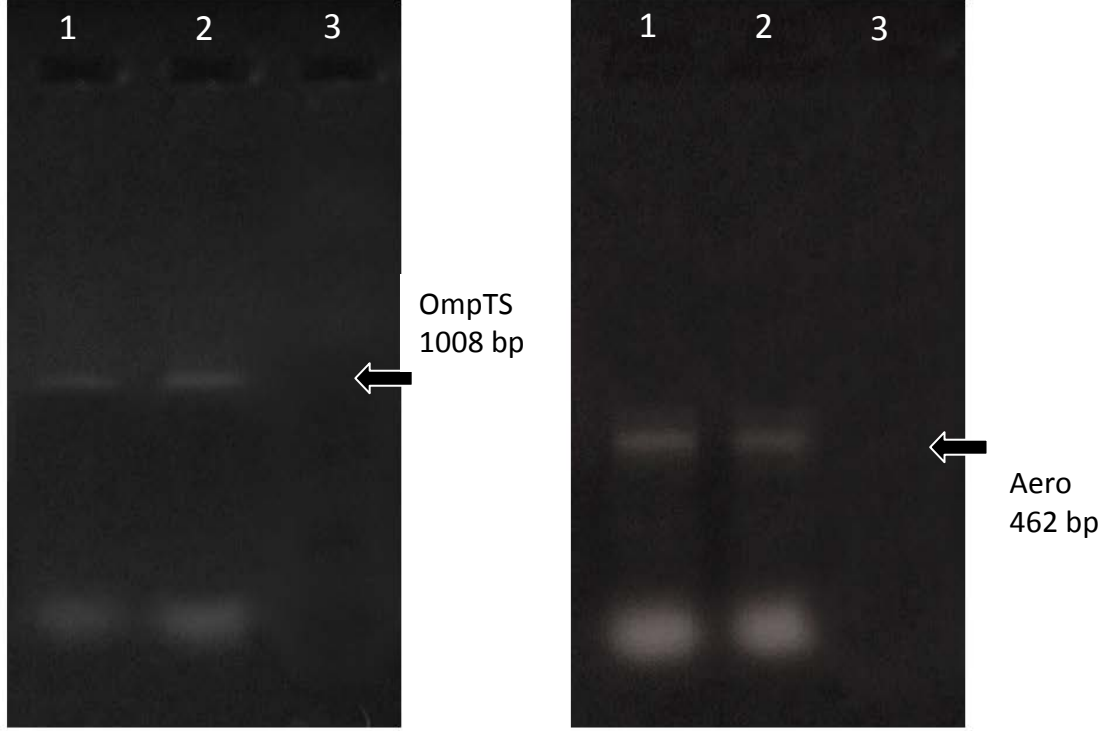
Şekil 4.14. *A.sobria*'nın AH primeri ile PCR sonucu 1. Negatif kontrol grubu, 2.3.4. *A. sobria*'nın PCR sonuçları

4.6.2. Hasta balık materyalinden izole edilen bakterilerin PCR bulguları

Hasta balıkların iç organlardan öze yardımıyla TSA, TSB ve Kanlı Agar' a ekim yapılmıştır. Uygun koşullarda inkübe edilip üretilen izolatlardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra hastalık etkeni bakterinin varlığını tespit edilmesi amacıyla örnek alınan tüm dokular (böbrek, karaciğer) tüm primerler (Aero, OmpTS, Tet, F3-B3 ve AH) ile PCR reaksiyonuna girmiştir. Çıkan sonuçlar %1' lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin OmpTS gen bölgesiyle PCR reaksiyonu sonucunda böbrek ve karaciğerinde 1008 bp büyüklüğünde bant görülmüştür (Şekil 4.15).

Aero gen bölgesiyle PCR reaksiyonu sonucunda ise; böbrek ve karaciğerinde 462 bp büyüklüğünde bant görülmüştür (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15.(soldaki) Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin OmpTS primeri ile PCR reaksiyonu sonucu

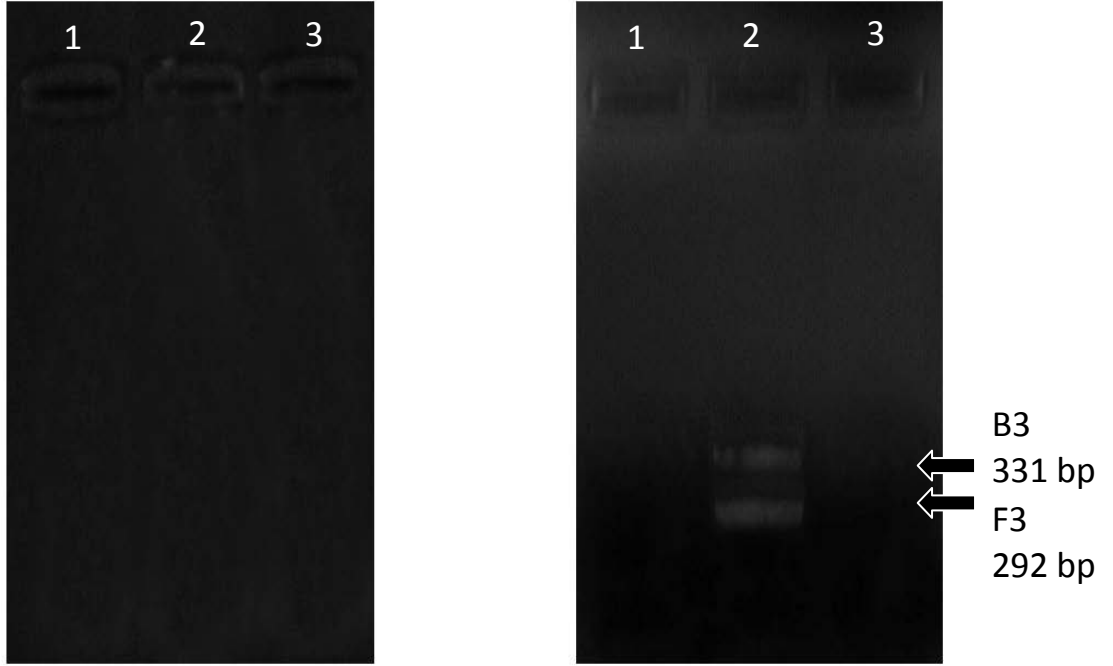
1. Böbrek PCR sonucu, 2. Karaciğer PCR sonucu, 3. Negatif kontrol PCR sonucu.

Şekil 4.16.(sağdaki) Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin Aero primeri ile PCR reaksiyonu sonucu

1. Böbrek PCR sonucu, 2. Karaciğer PCR sonucu, 3. Negatif kontrol PCR sonucu.

Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin tet gen bölgesiyle PCR reaksiyonu sonucunda 211 bp büyüklüğünde bant oluşturması beklenirken herhangi bir sonuç görülmemiştir. (Şekil 4.17.).

F3-B3 gen bölgesiyle PCR reaksiyonu sonucunda ise; karaciğerde 292-331 bp büyüklüğünde bantlar görülmüştür (Şekil 4.18).



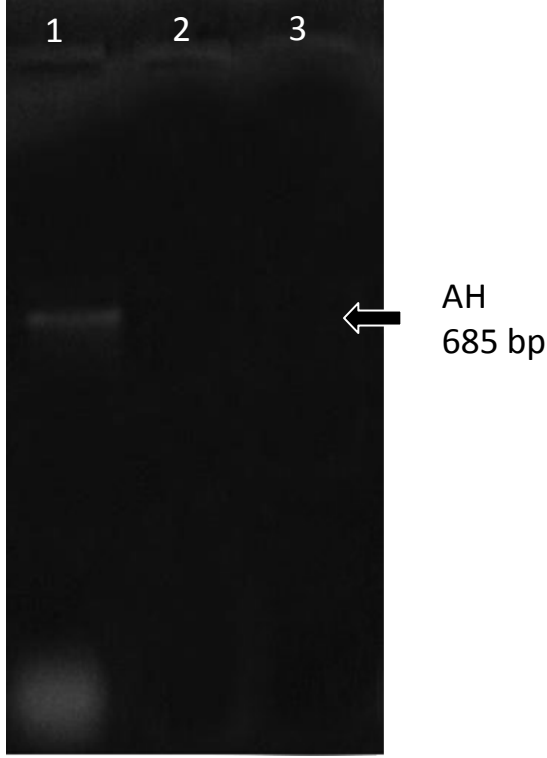
Şekil 4.17.(soldaki) Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin Tet primeri ile PCR reaksiyonu sonucu

1. Böbrek PCR sonucu, 2. Karaciğer PCR sonucu, 3. Negatif kontrol PCR sonucu.

Şekil 4.18.(sağdaki) Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin F3-B3 primeri ile PCR reaksiyonu sonucu

1. Böbrek PCR sonucu, 2. Karaciğer PCR sonucu, 3. Negatif kontrol PCR sonucu.

Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin AH gen bölgesiyle PCR reaksiyonu sonucunda böbrekte 685 bp büyüklüğünde bant görülmüştür (Şekil 4.19.).



Şekil 4.19. Hasta balık materyalinin iç organlarından alınan örneklerin AH primeri ile PCR reaksiyonu sonucu

1. Böbrek PCR sonucu, 2. Karaciğer PCR sonucu, 3. Negatif kontrol PCR sonucu.

5. TARTIŞMA

Günümüzde dünya nüfusunda meydana gelen artış ile beraber gıda kaynakları giderek yetersiz hale gelmektedir. Özellikle bedensel ve zihinsel gelişim açısından önemli olan protein ihtiyacının karşılanmasında ortaya çıkan zorluklar, yeni sektörlerin doğmasına neden olmuştur. Kültür balıkçılığı da bu sektörlerin başında gelmekte ve son yıllarda ülkemizde hızlı bir gelişme göstermektedir.

Su ürünleri yetiştiriciliği, dünya balıkçılık üretiminin yaklaşık %30' unu karşılamakta ve yılda % 10'dan fazla artarak büyümektedir. 1980'de 7.4 milyon ton, 1990'da 16.8 milyon tona ulaşan üretim miktarı 2002 yılında 40 milyon tona ulaşmıştır. TÜİK 2009 verilerine göre Türkiye'nin iç su yetiştiriciliğinin en kapsamlı üretimini yapan Muğla ilinde 12462 ton üretim yapılmıştır.

Avrupa Birliği ülkeleri arasında Türkiye'nin balık üretimi 7. sırada iken, tüketimi son sıralarda yer almaktadır. Dünyada su ürünleri kişi başı tüketimi 15 kg., AB ülkelerinde 22 kg. Türkiye'de ise 6-7 kg. dır (Çelikkale 1999).

Ülkemizde alabalık yetiştiriciliği sektörü hızla gelişmekte olup, artan sayıda işletme faaliyete geçmiştir. 2010 TÜİK verilerine göre işletme sayısı 1400' ün üzerindedir. Yetiştiriciliği yapılan en önemli türlerden birisi olan gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği yaklaşık 78.000 ton alabalık üretimi ile Avrupa' da ilk sıralarda yer almaktadır.

Yetiştiricilikte üretimin maksimum ve ekonomik kayıpların minimum olabilmesi için işletmelerdeki yaşam ortamının optimum koşullarının sağlanması önemlidir. Kültür balıkçılığında meydana gelen ekonomik kayıpların başlıca nedeni bakteriyel infeksiyöz hastalıklar gösterilmektedir.

Alabalık yetiştiriciliğinin istenilen düzeyde geliştirilmesi ve ülke ekonomisine katkı sağlaması balıkların uygun koşullarda yetiştirilmelerine, hastalıklarının teşhisine ve korunmalarına bağlıdır.

Bakteriyel kökenli hastalıklarda etiyolojik ajanları sırasıyla *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* ve *A. sobria* olan Hareketli Aeromonas Septisemi hastalıkları ülkemizdeki işletmelerde yaygın dağılım gösteren hastalıklardandır (Parker 2002, Timur ve Timur 2003).

Çalışmamızın ilk aşamasında Muğla'nın Fethiye bölgesindeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinden, klinik bulguları tespit edildikten sonra hastalık belirtisi gösteren balık materyalleri steril koşullarda ve soğuk zincir koşullarına uyularak laboratuara getirilmiştir.

İkinci aşamada, laboratuara getirilen hasta balıkların ağırlıkları ve uzunlukları ölçülüp kaydedilmiştir. Her balık materyalinin karaciğerinden ve böbreğinden örnekler alınmış ve besiyerlerine ekim yapılmıştır. Farklı bakterileri izole edebilmek için deriden ve iç organlardan alınan örnekler, Trypticase Soy Agar (TSA), Tryptone Soy sıvı besiyeri (TSB) ve Kanlı Agar besiyerine ayrı ayrı ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri etüvde uygun sıcaklıkta uygun sürelerde inkübe edilmiştir (Çolak 1982, Timur ve Timur 2003, Austin ve Austin 2007).

Üçüncü aşamada, referans bakteri olarak *A. hydrophila* ATCC 19570, *A. caviae* ATCC 15468, *A. veronii* ATCC 35624 ve *A. sobria* ATCC 43979 kullanılmıştır. Bu bakteriler ve hasta balıktan izole edilen bakteri örnekleri Tripton Soy Agar (TSA), Tripton Soy Broth (TSB) ve Kanlı Agar besiyerinde 22-25 °C' de 24-48 saat üretilmiştir. Daha sonra üretilen bakterilerden DNA izolasyonu yapılmıştır (Miriam vd 1992, Lucangeli vd 2000).

Dördüncü aşamada, bakteriyel DNA' ların kalitatif ve kantitatif ölçümleri yapılmıştır (Turner vd 2004).

Beşinci aşamada, *A. hydrophila* ATCC 19570 için *Aero ve OmpTS*, *A. veronii* ATCC 35624 için *tet*, *A. sobria* ATCC 43979 için *AH* ve *A. caviae* ATCC 15468 için *F3-B3* için ileri ve geri primer setleri hazırlanmıştır ve ticari şirketlerden sağlanmıştır. PCR için bu primer setleri ve saflaştırılmış genomik DNA, PCR master karışımına ilave

edilmiştir ve PCR için hazır hale getirilmiştir (Wei vd 2008, Nawaz vd 2006, Khrushiramani vd 2007, Chu ve Lu 2005).

Altıncı aşamada, referans bakterilerin ve hasta balık materyalinden izole edilen bakterilerin gen bölgelerini belirlemek üzere PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve görüntülenmiştir.

Son yıllarda moleküler tekniklerin alabalık hastalıkları tanımlamasında kullanıldığına ilişkin literatürlerin sayısı artmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda, Chu vd. (2005) tarafından *A. hydrophila* için Aerosin geni, Nawaz vd. (2006) tarafından *A. veronii* için tetracilin geni, Wei vd (2008) tarafından *A. caviae* için F3-B3 geni, Altınok vd (2008) tarafından *A. sobria* için Ah geni, Khrushiramani vd (2006) tarafından *A. hydrophila* için dış membran protein geni ile ilgili izolasyon ve gen ekspresiyonları çalışmaları yapmıştır.

Bu tezde *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A.caviae* ve *A.sobria* türü bakteriler ile *Tet*, *OmpTS*, *Aero*, *Ah* ve *F3B3* genleri geliştirilmiş ve amaca uygun seçilmiştir.

Hasta balıktan DNA izolasyonu Miriam vd (1992) ve Lucangeli vd (2000) metotları modifiye edilerek yapılmış ve bu metotlarla yapılan çalışmaların sonuçlarıyla tezde yapılan işlemlerin sonuçları desteklenmektedir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu optimizasyonları sonucu olarak gökkuşağı alabalıklarından (*Onchorhynchus mykiss*) izole edilen Harekeli *Aeromonas* türlerinde bulunan virulans genlerin varlığı tespit edilmiştir. *A.hydrophila* türünün balıklarda hastalığa neden olan *OmpTS* ve *Aero* genleri PCR optimizasyonu sonucunda *OmpTS* geni 1008 bp., *Aero* geni 462 bp. büyüklüğünde bantlar oluşturarak böbrek ve karaciğerde gözlemlenmiştir. *A. veronii* türünün balıklarda virulans etki gösteren *Tet* geni 211 bp. büyüklüğünde bir bant oluşturması beklenirken herhangi bir sonuç görülmezken, *A. caviae* türünün virulans geni olan F3-B3 geni 292-331 bp. büyüklerinde çift bant oluşturarak sadece karaciğerde gözlemlenmiştir. *A. sobria* türünün

virulans geni olan Ah geni ise 685 bp. büyüklüğünde bir bant oluşturarak böbrekte gözlemlenmiştir.

Çalışmada yapılan PCR analizleri neticesinde toplamda 20 örnekte 14 pozitif PCR sonucu bulunması tezdeki hipotezin doğruluğunu göstermektedir.

Moleküler biyoloji alanında kullanılan tekniklerin ilerlemesi ve yaygınlaşmasıyla beraber su ürünlerinde bu tekniklerin kullanımı çok yaygın bir hal almıştır.

Bu araştırmada kullanılan moleküler teknoloji ile balık hastalığına neden olan bakteriyel etkenler tespit edilebilmekle beraber hastalık bulguları patolojisi için diğer testlerde uygulanmalıdır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, iç su balıkları yetiştiriciliğinin en yoğun yapıldığı bölgelerden biri olan Muğla'nın Fethiye bölgesindeki gökkuşağı alabalık çiftliklerinden, klinik bulguları tespit edildikten sonra hastalık belirtisi gösteren balık örnekleri hastalık olduğunda steril koşullarda ve soğuk zincir koşullarına uyularak laboratuara getirilmiştir.

Laboratuara getirilen hasta balıkların farklı dokularından örnek alınmış ve besiyerlerine ekilmiştir. Hem ekilen hem de direkt alınan örneklerden hastalıkla alakalı genlerin tespiti için bakteriyel DNA izolasyonu yapılmıştır.

Gökkuşağı alabalıklarında en sık karşılaşılan bakteriyel hastalıklardan olan Hareketli *Aeromonas* Septiseminin etkenleri *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* ve *A. sobria* türleri, bu bakteride bulunan OmpTS, Aero, Tet, F3-B3, AH gen bölgelerine bakılarak PCR ile tespit edilmiştir.

Bu bölgeleri belirlemek için uygun PCR' lar seçilmiş ve her bir örnek için PCR yapılmıştır. PCR'ı yapılan örnekler elektroforezde yürütülmüş ve incelenmiştir.

Bu çalışmanın sonucu olarak hastalık belirtisi gösteren örnekler ve izole edilen kültürlerden elde edilen PCR sonucunda *A. hydrophila*, *A. veronii*, ve *A. sobria*, karaciğer ve böbrekte pozitif olarak gözlenmiştir. Klinik bulgularla desteklenen PCR bulgusu bize Hareketli *Aeromonas* Septisemi' yi doğrulamıştır. Ancak hastalığın patolojisinde araştırılması hastalığa uygun tedavi için gereklidir.

Gökkuşağı alabalıklarında Hareketli *Aeromonas* Septisemi' ye yol açan *Aeromonas* türü bakterilerin virulans genleri üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiş ancak bu çalışmada Muğla'nın Fethiye bölgesindeki alabalık işletmelerindeki balıkların incelenmesiyle literatürlere özgün bir çalışma olarak katkıda bulunması beklenmektedir.

7. KAYNAKLAR

- AKAYLI, T., 2001. *Kültür Çipura Balıklarında (Sparus auratus, L.1738) Vibriosis'in ELISA Ve Bakteriyolojik Yöntemlerle Teşhisi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- ALPBAZ, A. 2005. Su Ürünleri Yetiştiriciliği. Alp Yayınları, İzmir, 534.
- ALTINOK, İ., ÇAPKIN, E. ve KAYIŞ, Ş. 2008. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five bacterial fish pathogens. *Vet. Microbiol.* 131, 332-338.
- ALPBAZ, A., HOŞSUCU, H. 2002. İç Su Balıkları Yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları: 12, Ders Kitabı: 3, İzmir, 222.
- AOKI, T. 1999. Motile Aeromonads: *Aeromonas hydrophila*, In *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections* (edited by P.T.K. Woo and D.W. Bruno). CABI Publishing, 1947.
- AUSTIN, B. and AUSTIN, D.A.1992. Bacterial fish pathogens. Diseases of farm and wild fish. Fourth edition, Springer publishing, U.K.
- AUSTIN, B. and AUSTIN, D. A. 1987, Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited, Chichester, 0-85312-844-8.
- AUSTIN, B. and AUSTIN, D. A. 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Ltd, Chichester, 1-85233-120-8.

- AYDIN, S. and CILTAS, A.K. 2004. Systemic *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) : gross pathology, bacteriology, clinical pathology, histopathology and chemotherapy. J. of Anim. and Vet. Adv., 3, 810-819.
- AYDIN, F., KÖKSAL, G., DEMİR, N., BEKCAN, S., KIRKAĞAÇ, M., GÖZGÖZOĞLU, E., ERBAŞ, S., DENİZ, H., MATLAŞ, Ö. ve ARPA, H. 2005. Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Politikalar. IV. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara.
- BACH, R., P. K. CHEN, and G. B. CHAPMAN, 1978. Changes in the spleen of channel catfish *Ictalurus punctatus* rafinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. J. of Fish Dis. 1, 205 - 217.
- BEAZ-HIDALGO, R., MAGI, G.E., BALBOA, S., BARJA, J.L., ROMALDE J.L. 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* gene. Vet. Microbiol. 128, 386-394.
- BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. 1985. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species, A review, J. Food Safety., 7, 15-29.
- BURKE, V. 1984. Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isotibes of *Aeromonas* spp., Appl. Environ. Microbiol., 47, 1146-1149.
- CAETANO-ANOLLES, G. 1993. *PCR Methods Applications*, 3, 85-94.
- CENGİZLER, İ. 2006. Balık Hastalıkları. Nobel Kitap Evi. Adana. 135.

- CHU, W. H. and LU, C. P. 2005. Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*, J. of Fish Dis., 28, 437-441.
- ÇİVANER, E. Ç. 2004. *Su Ürünleri Dış Pazar Araştırması*. T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüt Merkezi. 75.
- ÇELİKKALE, M.S. 1988. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Cilt 1, K.T.Ü.Yayın No:124. TRABZON
- ÇOLAK, A. 1982. Balık Hastalıkları El Kitabı. Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları:1. Sivas. 133.
- DEL CERRO, A., MARQUEZ, I., GUIJARRO, J.A., 2002. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5177-5180.
- DOUKAS, V, ATHANASSOPOULOU, F., KARAGOUNI, E. and DOTSIKA, E. 1998. Short Communication *Aeromonas hydrophila* Infection in Cultured Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea, J. of Fish Dis., 21 (4) ,317-320.
- DWIVEDI, M., MISHRA, A., PRASAD, A., AZİM, A., SINGH, R.K., Baronia, A.K., 2008. *Aeromonas caviae* septicemia in immunocompetent gastrointestinal carriers. Bra. J. of Inf. Dis.. 12, 1-4.
- EWART, K.V., BELANGER, J.C., WILLIAMS, J., KARAKACH, T., Dauglas, S.E. 2005. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by

Aeromonas salmonicida using cDNA microarray technology. Develop. & Compar. Immun. 29, 333-347.

FANG, H.M., GE , R., SIN, Y.M., 2004. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesion. Fish Shellfish Immunol.16, 645-658.

GELDİAY. R. 2007. Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üni. Su Ürünleri Fakültesi Yayınları: 46, Ders Kitabı: 16, İzmir, 644.

GONZALES, S.F., KRUG, M.J., NIELSEN, M.E., SANTOS, Y., CALL, D.R. 2004. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. J. Clini. Microb. 42, 1414-1419.

GRINSTED, J. and BENNETT, P. M. 1988. Analysis of Plasmid DNA with Restriction Endonucleases, In Methods in Microbiology Volume 21 Plasmid Technology 2nd Edition, Academic Press, London, 0-12-521521-5.

GÜVENER, R. P. ve TİMUR, G. 2005. Bazı akvaryum balıklarında *Aeromonad* enfeksiyonlarının tespiti üzerinde bir çalışma. İstanbul Üni. Su Ürünleri Dergisi. 19, 27-39.

HAZEN T.C., FLIERMANS C.B., HIRSCH R.P. AND ESCH G. W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States, Appl. Environ. Micro. 36, 5, 71-738.

HICKMAN-BRENNER, F.W, MACDONALD, K. L. 1987. *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. J. Clin. Micro. 25, 5 900-906.

- ISONHOOD, J.H., DRAKE, M. 2002. *Aeromonas* species in foods. Review, J. Food Pro. 65, 575-582.
- JANDA, J.M. 1991. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. J. Clin. Micro. Rev. 4, 397-410.
- KARAKAŞ, H.H. ve TÜRKOĞLU, H. 2005. Su Ürünlerinin Dünya ve Türkiye'deki Durumu. Harran Üni. Ziraat Fakültesi Dergisi. 9(3), 21-28.
- KARATAŞ, M. 2010. Balık Biyolojisi Araştırma Yöntemleri. Öncü Basımevi. Yayın no:4. Ankara. 501.
- KORUN, J. ve TİMUR, G. 2001. Gökkuşluğu Alabalıklarında (*O. mykiss*) Fry Mortalite Sendromu (FMS) Üzerinde Bir Çalışma, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 15, 15-30.
- KOZINSKA, A. and PEKALA, A., 2004. First isolation of *Shewanella putrefaciens* from freshwater fish – a potential new pathogen of fish. Bull.Eur.Ass.Fish Pathol. 24,189-193.
- KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C. and WINN, W. C., 1992, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Fourth Edition, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 0-397-51201-5.
- KHURANA, R. ve KUMAR, A. 1997. Prevalence of motile *Aeromonads* in foods of animal origin, J. Food Sci. Technol. 34, 228-229.
- KHUSHIRAMANI, R., GIRISHA, S. K. And KARUNASAGAR, I. 2006. Cloning and expression of an outer membrane protein ompTS of

Aeromonas hydrophila and study of immunogenicity in fish, Prot. Exp. and Puri. 51, 303-307.

KIROW, S.M. 1990. A note on *Aeromonas* spp. From chickens as possible food-borne pathogens. J. Appl. Bacteriol., 68, 327- 334,

LEE, C., CHO, J. C., LEE S. H., D.-G. LEE and S.-J. KIM. 2002. Distribution of *Aeromonas* spp. identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm, J. of App. Micro. 93, 976– 985.

LEWIS, D. H. and ALLISON, T. C. 1971. An immunofluorescent technique for detecting *aeromonas liquefaciens* in fish utilized in lunar exposure studies, Trans. of Ame. Fish. Soc. 100, 575-578.

LEWIS, D. H. and SAVAGE, N. L. 1972. Detection of antibody to *Aeromonas liquefaciens* in fish by indirect fluorescent antibody technique, J. of Fish. Res. B. of Canada. 29, 211-212.

LUCANGELI, A., MORABITO, S., CAPRIOLI, A. 2000. Molecular fingerprinting of strains of *Yersinia ruckeri* serovar O1 and *Photobacterium damsela subsp. piscicida* isolated in Italy, Vet. Micro. 76, 273-281.

LUCAS, J., SOUTHGATE, P. 2003. Aquaculture Farming Aquatic Animals and Plants. Blackwell Publishing. UK. 502.

MOKSNESS, E., KJØRSVIK. E. and OLSEN. Y. 2004. Culture of Cold-Water Marine Fish. Blackwell Publishing. UK. 528.

MIRIAM, A., GRIFFITHS, G. 1997. PCR and Probe-PCR Assays to monitor broodstock atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ovarian fluid

and kidney tissue for presence of dna of the fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*, J. of Cli. Micro. 35, 1322-1326.

MIYATA, M., AOKI, T., INGLIS, V., YOSHIDA, T. and ENDO, M. 1995. RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*, J. of App. Bac. 79, 181-185.

NAWAZ, M., SUNG, K., KHAN, S., KHAN, A. and STEELE, R. 2006. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish, App. and Envir. Micro. 72, 6461-6466.

ÖZER, S., DEMİREL, M., US, M., YILDIRIM, S. 2008. Mersin ili Çağlarca köyündeki Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) kuluçkahanelerinin mikrobiyal florası. J. of Fish. Sci. 2, 261-271.

PALUMBO, S.A., 2000. The *Aeromonas hydrophila* Group, In The Microbiological Safety and Quality of Food., Aspen publication, 1011-1027.

PARKER, R. 2002. Aquaculture Science. Delmar Publishing. ABD. 621.

PEPPER, I. L., GERBA, C. P. and BRENDENCKE, J. W. 1995, Molecular Detection of Microbial Pathogens Using Polymerase Chain Reaction, In *Environmental Microbiology*, Academic Pres, Inc, 115-122.

PERRY, J.J. and STALEY, J. T. 2000. Genetic Engineering Chapter 16, In *Microbiology: Dynamics and Diversity*, Saunders College Publishing, Fort Worth, USA, 367-381.

- RAHIM, Z., AZIZ, K. M. S., HUQ, M. I. and SAEED, H. 1985. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the wounds of five species of brackish water fish of Bangladesh. Bangladesh J. of Zoo. 13, 37 - 42.
- ROBERTS, R. J. 1993. Motile Aeromonad Septicaemia, In Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Scientific Publications, 0-632-03497-1.
- ROBERTS, R. J. and SHEPHERD, C. J. 1986. Handbook of Trout and Salmon Diseases Second Edition, Fishing News Book Ltd., Farnham, Surrey, England, 0 85238 1387.
- SCHNEIDER, J. and RHEINHEIMER, G. 1988. Isolation Methods, In Methods in Aquatic Bacteriology (edited by Austin, B.), John Wiley and Sons Ltd.
- SNIESZKO S.F. and AXELROD H. R. 1971. Diseases of Fishes, Jersey City, New Jersey, T.F.H. Publications Inc. Ltd .
- ŞAHRİKOĞLU, L. ve CANDAN, A. 2002. Levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) Balıklarında *Aeromonas hydrophila* İnfeksiyonu Üzerinde Bir Araştırma, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 14, 59-70.
- ŞEN, K. 2005. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. Canadian J. of Micro. 51(11), 957-966.
- SACHAN, N., AGARWAL, R. K. 2000. Selective enrichment broth for the isolation of *Aeromonas* spp. from chicken meat, Int. J. Food Micro. 60, 65-74.

- TANAKA, R., SAWABE, T., TAJIMA, K., VANDENBERGHE, J. and EZURA, Y. 2001. Identification of *Vibrio haliotocoli* using 16S rDNA PCR/RFLP analysis. Fish. Sci. 67, 185-187.
- TANRIKUL, T.T. 2007. Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. Pakistan J. of Bio. Sci. 10, 1773-1737.
- TEKELİOĞLU, N. 2005. İç su balıkları yetiştiriciliği. Nobel Kitapevi. Adana. 278.
- TUİK, 2008. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>. Alıntı tarihi: 2010
- TUİK, 2009. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr>. Alıntı tarihi: 2011
- TURNER, P.C., MCLENNAN, A.G., BATES, A.D. and WHITE, M.R.H. 2004. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. Çeviri editörü Muhsin Konuk. Nobel Yayın Dağıtım, 613, 346, Ankara.
- TİMUR, G. ve TİMUR, M. 2003. Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Rektörlük Yayın No: 4426. İstanbul. 538.
- TİMUR, G. ve TİMUR, M. 2003. Balık Hastalıkları, Rektörlük Yayın No.4426 Su Ürünleri Yayın No.5 İstanbul, 975-404-699-9.
- TİMUR, G., KORUN J. VE GÜVENER, R.P. 2003. *Lepistes (Poecilia reticulata)* üretim ünitesindeki anaç ve yavru balıklarda ağır mortalite ile seyreden aeromonad septisemi üzerine bir çalışma. İstanbul Üni. Su Ürünleri Dergisi. 15, 1-11.

- UZEL, A., ve UÇAR, F. 2000. İzmir ilindeki çeşitli kaynaklardan *Aeromonas hydrophila*'nın izolasyon, identifikasyon ve toksijenik özellikleri. Turk J. Biol. 24,25-32.
- WATSON J.D. and CRICK F.H.C. 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. Nature. 171, 737-738.
- WEI, X.N., ZHEN, Z.J., ZHANG, L.H. 2008. Sensitive and rapid detection of *Aeromonas caviae* in stool samples by loop-mediated isothermal amplification. Diag. Micro. and Inf. Dis. 60,113-116.
- WAITES, W.M. 1991. Microbial food poisoning, Problems and solutions. British Food J. 93, 4-9.
- LINDHORST-EMME, W. 1990. Forellenzucht. Verlag Paul Parey. 157 . Hamburg und Berlin.

ÖZGEÇMİŞ

Evrım Beyhan ŞEN, 1987 yılında İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İzmir’de tamamladı. 2004 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’nden 2008 yılında Su Ürünleri Mühendisi olarak mezun oldu. Őubat 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi’nde yüksek lisans eğitimine başladı.