İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜLTÜR ÇİPURA (*Sparus aurata*, L. 1758) BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN PROTEİN PROFİLLERİNİN TESPİTİ

Su Ürünleri Müh. Özgür ÇANAK
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Hastalıklar Programı

Danışman
Doç. Dr. Tülay AKAYLI

Temmuz-2011

İSTANBUL

Bu çalışma 15/07/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Hastalıklar Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Gülşen TİMUR
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

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

Doç. Dr. Nuray ERKAN ÖZDEN
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Yard. Doç. Dr. Hafize Sibel ÇOLAK
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 5087 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Tülay Akaylı'ya; İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Gülşen Timur'a; benden yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Araş. Gör. R. Eda Yardımcı'ya; İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü'ndeki bütün akademik ve idari personel ile öğrenci arkadaşlarıma; örnekleme çalışmalarım boyunca benden yardım ve ilgilerini esirgemeyen balık işletmelerine ve çalışanlarına; başta grup başkanı Prof. Alicia Estevez Toranzo olmak üzere ERASMUS programı kapsamında bir süre birlikte çalışma fırsatı bulduğum İspanya'daki Santiago de Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Anabilim Dalı İhtiyopatoloji grubunun bütün çalışanlarına; İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden Doç. Dr. Reyhan Akçaalan Albay'a; İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden Yard. Doç. Dr. Bedia Gemici Palabıyık ve bölümün bütün çalışanlarına; öğrenim hayatım boyunca bana destek olan annem ve babama ve son olarak eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Temmuz, 2011 **Özgür ÇANAK**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i
İÇİNDEKİLER ii
ŞEKİL LİSTESİ iv
TABLO LİSTESİ vi
SEMBOL LİSTESİ vii
ÖZET viii
SUMMARY ix
1. GİRİŞ ……... 1
2. GENELKISIMLAR…… 5
2.1 ÇİPURA BALIĞININ MORFOLOJİK VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ…… 5
2.2 ÇİPURA BALIĞI YETİŞTİRİCİLİĞİ…….. 6
2.3 BAKTERİLERİN HÜCRE YAPISI……..……. 7
2.3.1 Bakterilerde Hücre Zarının Yapısı…… 8
2.4 BALIKLARDA HASTALIĞA NEDEN OLAN PATOJEN BAKTERİLER……. 10
2.4.1 Gram Negatif Balık Patojenleri……...…….. 11
2.4.1.1 Vibrionaceae…….. 11
2.4.1.2 Aeromonadaceae…… 13
2.4.1.3 Flavobacteriaceae…….. 14
2.4.1.4 Pseudomonadaceae……. 14
2.4.2 Gram Pozitif Balık Patojenleri…….. 15
2.4.2.1 Streptococcaceae…… 15
2.4.2.2 Micrococcaceae…… 16
2.5 İMMÜNOKİMYASAL YÖNTEMLER…… 17
2.5.1 Aglütinasyon……... 18
2.5.2 Fluoresan Antikor Tekniği…… 19
2.5.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Tekniği……. 20
2.5.4 Elektroforetik Yöntemler…….. 20
2.5.5 Western-Blot Tekniği……. 21
3. MALZEME VE YÖNTEM……. 22
3.1 MALZEME…… 22
3.1.1 Araştırmanın Yapıldığı Yer…….. 22
3.1.2 Hasta Balık Materyali Temini……... 22
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Referans Suşlar ve Antikorlar…… 23

3.1.4 Araştırmada Kullanılan Bakteriyolojik Besiyerleri……... 23
3.1.5 Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler…….. 23
3.1.6 Protein Saflaştırma ve SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Kit, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler……..……..….. 24
3.2 YÖNTEM……..…... 26
3.2.1 Enfekte Balıkların Klinik ve Otopsi Muayenesi……. 26
3.2.2 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu…… 26
3.2.3 Referans Suşların ve Antikorların Hazırlanması…… 27
3.2.4 Lam Aglütinasyon Testi……. 27
3.2.5 Patojen Bakterilerden Protein Örneklerinin Hazırlanması……... 28
3.2.5.1 Rutin yöntem……. **28**
3.2.5.2 Kit kullanılarak protein örneklerinin hazırlanması…….. **29**
3.2.6 Elektroforez……. 29
4. BULGULAR……. 32
4.1 HASTA ÇİPURA BALIKLARININ KLİNİK VE OTOPSİ BULGULARI…… 32
4.2 BAKTERİYOLOJİK BULGULAR……. 38
4.3 LAM AGLÜTİNASYON TESTİ BULGULARI…… 50
4.4 BAKTERİ PROTEİNLERİNİN SDS-PAGE ANALİZİ BULGULARI…….. 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ…… 57
6. KAYNAKLAR……. 66
ÖZGEÇMİŞ…… 88

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	İ. Ü Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuarında SDS-PAGE deney düzeneğinin hazırlanması sırasında kullanılan solüsyonlar ve aletler……	31
Şekil 4.1	1 numaralı işletmeden temin edilen 20 g ağırlığındaki balık örneğinde anüste, kuyruk kaidesinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler…….	33
Şekil 4.2	1 numaralı işletmeden temin edilen 20 g ağırlığındaki balık örneğinde iç organlarda solgunluk……..	33
Şekil 4.3	2 numaralı işletmeden temin edilen 80 g ağırlığındaki balık örneğinde yüzgeç dibinde ve deri üzerinde hemorajiler……..	34
Şekil 4.4	2 numaralı işletmeden temin edilen 80 g ağırlığındaki balık örneğinde karaciğer renginde solgunluk ve solungaçlarda anemi……...	34
Şekil 4.5	3 numaralı işletmeden temin edilen 10 g ağırlığındaki balık örneklerinde vücut yüzeyinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler ile alt çenede erozyon……	35
Şekil 4.6	3 numaralı işletmeden temin edilen 10 g ağırlığındaki balık örneğinde karaciğer renginde solgunluk…….	35
Şekil 4.7	4 numaralı işletmeden temin edilen 3 g ağırlığındaki balık örneğinde abdomende şişkinlik ve deride renk kaybı…….	36
Şekil 4.8	4 numaralı işletmeden temin edilen 3 g ağırlığındaki balık örneğinde iç organlarda büyüme ve hemorajiler …….	37
Şekil 4.9	5 numaralı işletmeden temin edilen 130 g ağırlığındaki balık örneğinde abdomende şişkinlik ve deride renk kaybı…….	37
Şekil 4.10	5 numaralı işletmeden temin edilen 130 g ağırlığındaki balık örneğinde peritonal boşlukta sıvı birikimi ve şişkin barsak……..…….	38
Şekil 4.11	Bakteri izolatlarının TSA besiyeri üzerinde oluşturduğu koloni tipleri ve Gram preparatındaki görüntüleri……..……..	40
Şekil 4.12	TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan *V. anguillarum* izolatı……..…….....	41
Şekil 4.13	VAM besiyerinde etrafında hare bulunan sarı renkli koloni oluşturan 1 numaralı *V. anguillarum* izolatı ……..…….	41
Şekil 4.14	Kanlı agar besiyerinde β-hemoliz yapan 3 numaralı *V. anguillarum* izolatı…….	42
Şekil 4.15	TCBS besiyerinde yeşil renkli koloni oluşturan *V. logei* izolatı (9 numaralı izolat)……..……	44

Şekil 4.16 a) Üreaz testinde ekim yapılmamış negatif kontrol tüpü (K) ve pozitif sonuç veren *Staphylococcus* sp. izolatı (13 numaralı izolat) b) Sitrat testinde ekim yapılmamış negatif kontrol tüpü (K) ve pozitif sonuç veren *P. stutzeri* izolatı (11 numaralı izolat)……. 45
Şekil 4.17 TSA besiyerinde mat sarı renkli *Micrococcus luteus* kolonileri (14 numaralı izolat)…… 46
Şekil 4.18 Lam aglütinasyon testinin floresan ışık altında incelenmesi ve çökelme oluşumu……. 50
Şekil 4.19 Çalışmada izole edilen *V. anguillarum* izolatları ve referans bakteri suşlarının rutin laboratuar yöntemiyle elde edilen bütün hücre proteini analizi……..……. 52
Şekil 4.20 Çalışmada izole edilen *V. anguillarum* izolatları ve referans bakteri suşlarının protein saflaştırma kiti kullanılarak elde edilen bütün hücre proteini analizi…….…….. 52
Şekil 4.21 Çalışmada izole edilen *V. anguillarum* izolatları ve referans bakteri suşlarının rutin laboratuar yöntemiyle elde edilen dış membran proteini analizi…… 53
Şekil 4.22 Hasta kültür çipura balıklarından izole edilen 5-9 numaralı izolatların rutin yöntem ile elde edilen dış membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi……..... 54
Şekil 4.23 Hasta kültür çipura balıklarından elde edilen 10, 11, 12 ve 15 numaralı izolatların dış membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi……. 55
Şekil 4.24 Hasta kültür çipura balıklarından izole edilen Gram-pozitif karakterdeki bakteri izolatlarının membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi…….. 56

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	Hasta çipura balıklarından elde edilen 1-5 numaralı bakteri izolatlarının fiziksel ve biyokimyasal özelikleri…….	47
Tablo 4.2	Hasta çipura balıklarından elde edilen 6-10 numaralı bakteri izolatlarının fiziksel ve biyokimyasal özelikleri……	48
Tablo 4.3	Hasta çipura balıklarından elde edilen 11-15 numaralı bakteri izolatlarının fiziksel ve biyokimyasal özelikleri……..	49

SEMBOL LİSTESİ

°C : Derece santigrat
µl : mikro litre
µm : mikrometre
DNA : Deoksiribonükleik asit
ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent Assays
FAO : Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
g : gram
IFAT : Floresan antikor tekniği
kDa : kilodalton
KOH : Potasyum hidroksit
LPS : Lipopolisakkarit
MA : Marine agar
MR : Metil Red
NaCl : Sodyum klorür
O/F : Oksidasyon/Fermentasyon
OMP : Dış membran proteinleri
ONPG : Orto nitrofenil beta galaktosidaz
PBS : Phosphate buffered saline
PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA : Ribonükleik asit
SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
TCBS : Tiyosülfat sitrat safra tuzları sukroz
TSA : Triptik soya agar
TSI : Üçlü şeker-demir besiyeri
TUİK : Türkiye İstatistik Kurumu
V : Volt
VAM : *Vibrio anguillarum* besiyeri
VP : Vogues-Proskauer

ÖZET

KÜLTÜR ÇİPURA (*Sparus aurata*, L. 1758) BALIKLARINDAN İZOLE EDİLEN BAZI PATOJEN BAKTERİLERİN PROTEİN PROFİLLERİNİN TESPİTİ

Bu çalışma Nisan 2009 – Temmuz 2010 tarihleri arasında Ege bölgesindeki deniz balığı işletmelerindeki çipura balıklarında hastalıklara neden olan bakteriyolojik etkenlerin teşhisi ve immunokimyasal teknikler kullanarak bu etkenlerin serotiplerinin ve protein profillerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışma boyunca Muğla ve İzmir illerinde bulunan beş adet deniz balığı işletmesinde gerçekleştirilen üç örnekleme çalışmasında temin edilen, ağırlıkları 3 ile 130 g arasında değişen toplam 27 adet çeşitli hastalık belirtileri gösteren kültür çipura balığı örneği bakteriyolojik açıdan incelenmiştir. Genel olarak dış bakıda yüzeye yakın ve yavaş yüzme hareketi, balık renginde solgunluk, deride pul kaybı, vücut yüzeyinde ülser ve lezyonlar, yüzgeç diplerinde hemorajiler, solungaçlarda anemi ve iç bakıda karaciğer renginde solgunluk, periton boşluğunda sıvı birikimi ve iç organlarda erime ve küçülme gibi klinik bulgular gözlenen hasta balık örneklerinin karaciğer, böbrek, dalak, kan ve lezyonlarından TCBS, MA ve %1,5 NaCl içeren TSA besiyerlerine bakteriyolojik ekimler yapılmış ve petriler 21 °C'de üç gün süreyle inkübe edilmiştir. Çalışma sonucunda saf kültür halinde elde edilen 15 adet bakteri izolatı konvansiyonel metotlar ve API 20E tanı kitleri kullanılarak identifiye edilmiştir. Çalışmada incelenen balık örneklerinden en baskın olarak *Vibrio anguillarum*, izole edilmiştir. Bunun yanı sıra balık örneklerinden *Vibrio* genusuna ait türlerden *V. scophthalmi*, *V. logei* ve *V. harveyi* izole ve identifiye edilmiştir. Çalışmada, *Vibrio* genusu üyelerinin dışında Gram-negatif bakterilerden *Pseudomonas stutzeri*, *P. anguilliseptica* ile Gram-pozitif bakterilerden *Staphylococcus* sp., ve *Micrococcus luteus* türleri de izole ve identifiye edilmiştir.

V. anguillarum olarak identifiye edilen 6 adet izolattan dört tanesinin serotipinin belirlenmesi amacıyla lam aglütinasyon testi gerçekleştirilmiş ve üç tanesinin *V. anguillarum* serotip O1 olduğu tespit edilmiştir. Bir adet *V. anguillarum* izolatı ise türün O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilen antikorlarla çökelme oluşturmadığından lam aglütinasyon tekniği ile serotipleri belirlenememiştir.

Bakteri izolatlarının protein profillerinin ve antijenik yapılarının tespiti amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analizleri sonucunda, aynı türe ait izolatların temel dış membran proteini bakımından benzerlik gösterirken aralarında küçük farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada *Vibrio* genusu üyelerinin çipuraların temel patojenleri olduğu, diğer bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin de bu türlerle birlikte karma enfeksiyonlara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatların tespit edilen protein profillerinin bu türlerin neden olduğu hastalıkların tedavi ve önlenmelerine yönelik çalışmalarda yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE PROTEIN PROFILES OF SOME PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM CULTURED GILT-HEAD SEA BREAM (*Sparus aurata*, L. 1758)

This study was performed between April 2009 and July 2010 to identify the bacterial agents which cause diseases in gilthead sea bream cultured in the marine fish farms located in the Aegean region of Turkey and to determine the serotypes and protein profiles of these agent using immunochemical techniques.

A total of 27 cultured gilthead seabream specimens showing some clinical signals of diseases and weighing between 3-130 g which were supplied from five fish farms located in Muğla and İzmir were examined bacteriologically. Bacteriological samples were streaked on TCBS, MA and TSA containing 1,5% NaCl from the liver, kidney, spleen, blood and lesions of the fish samples which have main external clinical symptoms such as slowly swimming behavior near the sea surface, pale skin color, loss of scales, ulcers and lesions on the skin, hemorrhages at the base of the fins, anemia in the gills and main internal symptoms such as pale liver color, accumulation of fluid in the peritoneal cavity and swollen internal organs that are smaller in size. Petri dishes were incubated at 21 °C for three days. 15 bacterial isolates which were recovered in pure cultures were identified depending on the conventional bacteriological tests and API 20E kits. *V. anguillarum* was recovered from the fish samples abundantly. Besides, *V. scophthalmi*, *V. logei* and *V. harveyi* belonging to the genus *Vibrio* were isolated and identified from the fish samples. Except the members of the genus *Vibrio*, Gram-negative *Pseudomonas stutzeri*, *P. anguilliseptica* isolates and Gram-positive *Staphylococcus* sp. and *Micrococcus luteus* isolates were also isolated and identified in this study.

Slide agglutination tests were performed to determine the serotype of 4 out of the 6 *V. anguillarum* isolates and 3 of them were identified as *V. anguillarum* serotype O1. One *V. anguillarum* isolate did not made any reactions with antibodies raised against serotypes O1, O2 and O3 of this species and hence its serotypes could not be determined using slide agglutination technique.

Depending on the results of SDS-PAGE analysis carried out to determine the protein profiles and antigenic structures of the bacterial isolates, it was observed that isolates of the same species show similarities on the major outer membrane proteins besides little differences.

In conclusion, it was determined that *Vibrio* species are the main pathogens of gilthead seabream and some other Gram-negative and Gram-positive bacteria cause mixed infections in this species. It is thought that protein profiles of these bacterial species determined in this study could be used as useful tools in control and preventation studies of diseases caused by these organisms.

1. GİRİŞ

Dünyadaki hızlı nüfus artışına paralel olarak, insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan balığa talep gittikçe artmaktadır. Balık eti, içerdiği proteinler, yağ asitleri (Sargent, 1997) ve selenyum (Rayman, 2000) gibi mineraller maddelerden dolayı insan beslenmesi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, özellikle kalp damar rahatsızlıkları ve hastalıkların önlenmesi gibi hususlarda büyük bir öneme sahiptir (Friedman, 1996; Kris-Etherton ve diğ., 2003). Aşırı avlanma, sanayileşme ve kentsel atıklar sonucu denizlerde ve iç sularda oluşan kirlilik nedeniyle doğal balık stokları gittikçe azalmaktadır (Curtis ve Howard, 1993; Naylor ve diğ., 2000). Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliği, teknolojik ilerlemelerin katkısıyla gelişen bir endüstri kolu haline gelmiştir. Kültür balıkçığı tüm dünyada yaygın olarak yapılmasına rağmen yine de besin ihtiyacını yeterince karşılayamamaktadır (Shang, 1981; Naylor ve diğ., 2000; Tidwell ve Allan, 2001; Süzer ve diğ., 2007).

Akdeniz Bölgesi'ndeki ülkelerde etinin lezzetli olması nedeniyle talep edilen balık türlerinden biri olan çipura balığının (*Sparus aurata*), mevcut talebi karşılayabilmek için Yunanistan (Papoutsoglou, 2000), İtalya (Moretti ve diğ., 1999), Fransa (Chatain, 1997), İsrail (Lubzens ve diğ., 1997) ve İspanya (Sanchez-Mata ve Mora, 2000) gibi ülkelerde yetiştiriciliğine 1970'li yılların sonunda başlanmış iken ülkemizde ise bu türün yetiştiriciliğine 1985 yılında başlamıştır (Alpbaz, 2001, Güven ve diğ., 2001; Memiş ve diğ., 2002, Okumuş ve Deniz, 2007).

Bütün canlı üretim sistemlerinde olduğu gibi su ürünleri sektöründe de görülen enfeksiyöz ve enfeksiyöz olmayan hastalıklar balıkların üretimi, gelişimi ve büyümeleri üzerinde sınırlayıcı bir faktördür (Kabata, 1985; Southgate, 1993; Toranzo ve diğ., 2005). Balıklarda hastalık olgularının görülmesi ve gelişimi patojen, çevre ve konak arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucudur. Bu faktörlerden herhangi birinde meydana gelen olumsuzluk konak balığın direncini azaltarak hastalıklara daha duyarlı

hale gelmesine neden olarak hastalığın gelişme olasılığını ve ölümleri arttırır (Sniezko, 1974; Wedemeyer ve diğ., 1976).

Kültür balıkçılığında; suda toksik maddelerin bulunması, balıkların dengesiz beslenmesi ve işletmelerdeki sistem hataları gibi enfeksiyöz olmayan etkenler balık ölümlerine neden olurken en büyük kayıplar bakteri, virüs, parazit ve mantar gibi mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyöz etkenlerden kaynaklanan hastalıklar sonucu meydana gelmektedir (Colorni, 1989; Woo ve Bruno, 1999; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010). Bu mikroorganizmalar, konak canlıyı güçsüzleştirir ve öldürürken insan gıdası olarak tüketildiğinde maddi değerinin düşmesine ve hastalıkların insanlara geçmesine neden olabilir (Hedrick, 1998; Osorio ve Toranzo, 2002; Austin ve Austin, 2007).

Çipura balıklarında görülen enfeksiyöz hastalıkların bakteriyel kaynaklı olduğu ve bu bakterilerin de %93'ünün Gram-negatif karakterde olduğu tespit edilmiştir (Balebona ve diğ., 1998). Yurt dışındaki çalışmalarda çipura balıklarından hastalık etkeni olarak farklı genuslara ait bakteriler izole edilmişse de (Rodgers ve Furones, 1998; Balebona ve diğ., 1998; Le Breton, 1999) çeşitli çalışmalarda bu bakterilerin yaklaşık %70'inin *Vibrio* genusuna ait bakteriler olduğu bildirilmiştir (Zorrilla ve diğ., 2003a; Colorni, 2004; Özesen Çolak ve diğ., 2007; Akaylı ve diğ., 2009). Yukarıda belirtilen çalışmalarda çipura balıklarından izole edildiği bildirilen başlıca *Vibrio* türleri *Listonella anguillarum* (= *V. anguillarum*), *V. ordalii*, *V. alginolyticus* ve *V. harveyi*'dir. Çipura balıklarından hastalık etkeni olarak çeşitli *Vibrio* türlerinin yanı sıra *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (= *Pasteurella piscicida*) (Toranzo ve diğ., 1991; Bakopoulos ve diğ., 1997), *Aeromonas salmonicida* (Real ve diğ., 1994), *A. hydrophila* (Le Breton, 1999), *Pseudomonas anguilliseptica* (Berthe ve diğ., 1995; Domenech ve diğ., 1997), *Mycobacterium* sp. (Ramos, 2000), *Tenacibaculum maritimum* (= *Flexibacter maritimus*) (Toranzo ve diğ., 2005), *Stenotrophomonas maltophilia* (Kapetanovic ve diğ., 2006) ve *Pseudoalteromonas undina* (Pujalte ve diğ., 2007) izole edildiği bildirilmiştir.

Ülkemizdeki çipura balıklarından Gram-negatif karakterdeki bakterilerden *V. anguillarum* (Candan, 1993a; Korun, 2006; Özesen Çolak ve diğ., 2007), *V. ordalii*

(Candan, 1993b; Akaylı, 2001; Özesen Çolak ve diğ., 2007) *V. alginolyticus* (Akaylı, 2001; Tanrıkul, 2006), *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* (*Pasteurella piscicida*) (Çağırgan, 1993; Özesen Çolak ve diğ., 2007), *F. maritimus* (Özesen Çolak ve diğ., 2007) ve *A. hydrophila* (Özesen Çolak ve diğ., 2007) izole edilmiştir. Akaylı ve diğ. (2009) tarafından Bodrum bölgesindeki kültür çipura balıklarının larva ve ergin bireylerinden Gram-negatif bakterilerden *Vibrio* genusu üyeleri dışında *Flavobacterium* sp., *Flexibacter* sp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ve *A. hydrophila* izole edilmiştir. Bunun yanı sıra Kubilay ve Uluköy (2004), Gram-pozitif karakterdeki bakterilerden *Staphylococcus epidermidis*'i hasta çipura balıklarından izole etmişlerdir.

Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisi, etkenin uygun besiyerinde primer izolasyonu sonrasında konvansiyonel testler kullanılarak yapılabilir (Kimberley ve MacNair, 2004). Alışılagelen yöntemlerin yanı sıra API kitleri gibi hızlı biyokimyasal tanı kitleri de bakteriyel hastalık etkenlerinin teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Colorni, 2004). İmmünokimyasal, serolojik, histolojik ve moleküler teknikler, bakteriyel hastalıkların daha hızlı ve daha güvenilir bir şekilde teşhisinin yapılmasında, teşhisin doğrulanmasında ve etkenin ayrıntılı bir şekilde karakterizasyonunda yaygın olarak tercih edilmektedir (Cunningham, 2002; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007, Noga, 2010). Günümüzde immünokimyasal yöntemler balık hastalıklarının teşhisinde, etkenin tür içi karakterizasyonunda, patojenite ile ilgili çalışmalarda ve etkenin serotiplendirilmesinde kullanılmaktadır.

Hücre zarı yapısına göre bakteriler Gram-pozitif ve Gram-negatif olmak üzere iki ana gruba ayrılır ve Gram-negatif karakterde olanlar, çift katlı hücre membranının yapısında proteinleri ve lipopolisakkaritleri içerir. Bu bileşikler canlıda patojene karşı bağışıklık oluşturulmasında rol alan temel dış membran antijenleridir. Dış membran proteinleri (OMP) enfeksiyon sırasında ve konak immün yanıtının oluşturulmasında önemli rol üstlenirler ve canlıda koruyucu bağışık yanıt oluşturdukları için temel antijenlerdir. OMP'lerinin tespiti bakterilerin serotiplendirilmesinde (Knappskog ve diğ., 1993; Lopez-Romalde ve diğ., 2003; Bos ve diğ., 2004; Mao ve diğ., 2007) kullanılmaktadır.

Aynı türe ait bakterilerin antijenik bakımdan farklılık gösteren suşlarına serotip denir (Kimberley ve MacNair, 2004). Serotiplendirme organizmaların alt tür bakımından

sınıflandırılmasına izin verir (Young ve Moody, 1974) ki bu da epidemiyoloji çalışmaları bakımından çok önemlidir (Shimada ve diğ., 1994). Balıklarda hastalıklara neden olan *V. anguillarum*, *A. hydrophila* ve *E. tarda* gibi serolojik heterojeniteye sahip bakteri türlerine karşı aşı geliştirmeden önce serotiplendirme yapılması daha başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlar (Newman, 1993).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde karşılaşılan bakteriyel hastalıkların tedavisinde uzun süredir antibakteriyel özellikteki kimyasal maddeler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerin sayısı ile kullanım miktarları su ürünleri sektörünün büyümesi ve görülen hastalık problemlerinin çoğalmasıyla birlikte artış göstermiştir. Ayrıca bu maddelerin kullanımındaki bir takım yanlışlıklar, hastalık etkeni olan mikroorganizmalarda direnç oluşmasına neden olur. Bakteriyel hastalıkların önlenmesinde bakteriyel patojenlerin antijenik yapıları veya öldürülmüş bütün hücreleri kullanılarak geliştirilen aşılar da yaygın olarak kullanılmaktadır (Thuvander ve diğ., 1987; Magarinos ve diğ., 1994; Joosten ve diğ., 1995; Mulero ve diğ., 1998).

Bu çalışma ile kültür çipura balıklarında Nisan 2009 – Temmuz 2010 tarihleri arasında enfeksiyonlara neden olan patojen bakterilerin bakteriyolojik yöntemler kullanılarak tür düzeyinde identifikasyonunun yapılması ve bu bakterilere ait dış membran proteinlerinin moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE metoduyla tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 ÇİPURA BALIĞININ MORFOLOJİK VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Çipura balıkları (*Sparus aurata*, L. 1758) Sparidae familyasından olup *Sparus* genusuna ait balıklardır. Gövdeleri uzun ve lateralden yassılaşmıştır. Sırtları koyu mavi, yanları ise gümüşi sarı renktedir. Başları küt ve dudakları kalındır. Gözlerinin arasında "V" şeklinde altın sarısı bir bant bulunur. Operkulumun üst tarafında, yan çizginin başlangıcında siyah renkli bir leke bulunur. Tek ve sırt boyunca uzanan dorsal yüzgeçleri vardır. Kaudal yüzgecinin ise uç kısımları siyah renklidir (Wheeler, 1969). Ağız ve diş yapısı sert olup kabuklu canlıları bile kırabilecek niteliktedir. Bu balıkların tür tayininde diş yapıları çok önemli bir rol oynamaktadır. Dişleri alt çenede önde 4 adet kanin, arkada 4 sıra molar, üst çenede ön tarafta 4 adet kanin, arkada ise 3 sıra molar form şeklinde dizilmiştir (Moretti ve diğ., 1999).

Çipura balığı, ‰ 5.0 – 40 tuzluluk ve 4.5 – 8.0 mg/l oksijen seviyesine sahip denizlerin özellikle kıyısal bölgelerinde, acı su lagünlerinde ve nehir ağızlarında yaşayabilen bir balık türüdür (Moretti ve diğ., 1999). Akdeniz'in tamamında ve Kuzey Batı Afrika kıyılarında yayılım gösteren bir balık türüdür (Whitehead ve diğ., 1986). Britanya adalarının güney sahillerinin, bu türün dağılımında kuzey sınır olduğu düşünülmesine rağmen (Davis, 1988), son yıllarda daha kuzeyde, İrlanda sahillerinde görüldüğü ve burada kolonileştiği rapor edilmiştir (Fahy ve diğ., 2005; Craig ve diğ., 2008).

Karnivor bir tür olup doğal koşullarda zooplankton, kabuklu canlılar ve balıklar ile beslenir. Kültür koşullarında ise yumurta kesesinin çekilmesinin ardından önce zenginleştirilmiş rotiferler ile; daha sonra *Artemia nauplii* ve yapay pelet yemlerle; ilerleyen safhalarda ise % 45 – 55 protein içeren yapay pelet yemlerlerle beslenir. Doğal koşullarda 6 – 32 °C arasındaki sularda yayılım gösteren çipura balıkları 14 – 16 °C arasında ürer. Optimum büyüme ise 22 – 24 °C arasında gerçekleşir (Moretti ve diğ, 1999).

Prodandrik hermafroditizm görülen çipura balıkları yaklaşık 1 yaşına geldiklerinde testisleri gelişerek erkeklik özelliği gösterirken, 17-18. aylardan itibaren cinsiyet dönüşümü başlar ve 2 yaşındaki bireylerde %80 oranında dişilik özelliği gösterir (Zohar ve diğ., 1978; Alpbaz, 2001; Çoban ve diğ., 2004).

2.2 ÇİPURA BALIĞI YETİŞTİRİCİLİĞİ

Günümüzde çipura balığı etinin lezzetli olması, doğal stokların giderek azalması, yüksek fiyatı, hayatta kalma oranının yüksek olması, hastalıklara dirençli olması, nispeten daha düşük olan besin gereksinimleri ve kültür koşullarına yüksek derecede adaptasyonu sayesinde Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerin deniz balıkları yetiştiriciliğinde levrek balığı (*Dicentrarchus labrax*) ile birlikte kültürü yapılan önemli türlerdendir (Morretti ve diğ., 1999).

1974 yılında ilk kez İsrail'de kıyıdan toplanan çipura larvaları ve daha sonraki yıllarda bu balıklardan yapay yollarla elde edilen larvaları ile çeşitli kafes sistemlerinde yapay pelet yemler kullanarak deneysel yetiştiricilik çalışmaları gerçekleştirilmiş ve kıyıdan açıkta yüzer kafeslerde, polietilen ağlarda 2 yılda 200-400 g pazar boyuna ulaşıldığı rapor edilmiştir (Pitt ve diğ., 1977).

Günümüzde Yunanistan, İtalya, İspanya, Cezayir, Tunus, Mısır ve Türkiye gibi Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerin yanı sıra, Hint Okyanusu'na kıyısı olan Kuveyt ve Umman'da da entansif olarak çipura balığı yetiştiriciliği gerçekleştirilmektedir (FAO, 2009). FAO verilerine göre dünya çapındaki çipura üretimi 2000 yılında 87.288 ton/yıl; 2008 yılında ise 133.026 tonluk üretim miktarına ulaşılmıştır. Çipura balığı üretiminde Yunanistan yaklaşık % 39'luk bir pay ile en büyük çipura üreticisi ülke konumundadır. Yunanistan'ı sırasıyla Türkiye (% 23,8), İspanya (% 16,7) ve İtalya (% 6,3) gibi ülkeler takip etmektedir (FAO, 2009).

Türkiye'de çipura yetiştiriciliği 1985 yılında Pınar Deniz Ürünleri Anonim Şirketi tarafından İzmir'de ilk kuluçkahanenin kurulması ile başlamış ve günümüze kadar bu türün yetiştiriciliği çok büyük gelişme göstermiştir (Alpbaz, 2001; Güven ve diğ., 2001; Memiş ve diğ., 2002, Okumuş ve Deniz, 2007). Günümüzde Türkiye'de çipura ve

levrek yetiştiriciliği yapan 313 tesisin toplam kapasitesi 122.176 ton/yıldır. Ülkemizde balıkların doğal yumurtlama periyodu Aralık ayından Ocak ayının sonuna kadar olmakla birlikte (Çelikkale ve diğ., 1999; Alpbaz, 2005) büyük miktarlarda larva üretimi yapılan kuluçkahanelerde fotoperiyot kontrolü ile yıl boyunca mevsim dışı döl alımı gerçekleştirilmektedir (Çoban ve diğ., 2004; Alpbaz, 2005; Süzer ve diğ., 2007).

Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 1990 yılında 1.031 ton/yıl olan çipura balığı üretim miktarı sürekli olarak bir artış göstererek 2008 yılında 31.670 ton/yıla ulaşmıştır. Bu miktar, ülkemizde 2008 yılında yetiştiricilik yoluyla elde edilen toplam su ürünleri miktarının %20.8'ini teşkil etmektedir. Türkiye'deki toplam çipura üretiminin yaklaşık %71.5'i Muğla ilinde, özellikle Bodrum yarımadası çevresinde, yaklaşık %24.25'i ise İzmir ili sınırlarında gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda Akdeniz Bölgesi'nde Hatay, Mersin ve Antalya, Ege Bölgesi'nde Aydın ve Balıkesir gibi illerimizde de küçük ölçekli çipura balığı yetiştiriciliği faaliyetlerine başlanmıştır (TUİK, 2011).

2.3 BAKTERİLERİN HÜCRE YAPISI

Bakteriler, tek hücreli prokaryotik canlılardır. Şekilleri yuvarlak (kok), basil veya sprial olabilir. Çoğu bakteri türünde hücreler karakteristik bir şekle sahipken bazılarının hücreleri pleomorfik, yani çok şekillidir. Bazı türlerde bu hücreler grup oluşturarak çiftler, kümeler, zincirler ve filamentler şeklinde görülebilir. Hücre çapları genellikle 0,5-8 µm arasında değişmektedir. Bakteriler su, toprak veya hava gibi her türlü ortamda, farklı sıcaklık, tuzluluk ve asitlik seviyelerinde serbest halde bulunabildikleri gibi hayvan ve bitki hücrelerinin ve diğer bakterilerin içinde parazitik bir yaşam sürebilirler. Sitoplazmaları içerisinde ökaryotik hücrelerde bulunan mitokondri, kloroplastlar, golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum gibi organeller bulunmaz. Protein sentezinden sorumlu ribozom adlı çok sayıda organel bakteri hücresindeki sitoplazma içerisine dağılmış halde bulunur. Belirli bir zarla çevrili bir nukleusları bulunmayıp genetik materyalleri tipik olarak sitoplazma içinde bulunan irregüler şekle sahip nükleoit adı verilen tek bir sirküler kromozomdan oluşmaktadır (Lima De Faria, 1969).

Bakteriler antibiyotik direnç ve virülens faktörleri ile ilişkili genleri içeren kromozom harici küçük DNA (Deoksiribonükleik asit) parçaları olarak adlandırılan plazmitlere

sahiptirler. Bakteri hücrelerinde sitoplazma bir zar ile çevrilidir. Bazı bakteriler; hücre zarının dışında polimerik yapıda, 0,2-10 μm kalınlığında örtü tabakası şeklinde ve vizkoz yapıya sahip kapsül içermektedir. Hareketli olan bakterilerde ise hareketi sağlayan flagella adı verilen, hücre duvarından çıkan sarmal uzantılar mevcuttur. Bakterilerin hücre zarından çıkan ve bakterinin yüzeye tutunmasını sağlayan içi boş, kıvrımsız, saçak ve kök görünümünde pillus adı verilen uzantılar vardır (Lima De Faria, 1969).

2.3.1 Hücre Zarının Yapısı

Bakteriler hücre zarının yapısına ve bileşimine göre Gram-pozitif ve Gram-negatif olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Balıklarda hastalıklara neden olan saprofit ve patojen bakteriler çoğunlukla Gram-negatif karakterdeki bakteriler olmakla birlikte, Gram-pozitif karakterdeki bakteriler de balıklarda hastalıklara neden olabilirler (Frerichs ve Roberts, 1989; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010). Primer patojen olarak adlandırılan bakteriler, balıklarda yoğun ölümlere neden olan hastalıkların büyük çoğunluğundan sorumludur (Austin ve Austin, 2007).

Bakterilerde hücre zarının kuru ağırlığının %40-70'ini proteinler oluşturur. (Lima de Faria, 1969). İç membran ile dış membran arasında sert ve ince bir peptidoglikan tabakası bulunmaktadır. Bakteri hücre zarında bir dış membranın varlığı sadece Gram-negatif bakterilere özgüdür ve Gram-pozitif bakterilerde bunun karşılığı sayılabilecek bir yapı bulunmamaktadır (Ghuysen ve Hakenbeck, 1994).

Gram-negatif bakterilerin hücre zarı, iç kısımda bulunan sitoplazmik membran, iki membran arasında bulunan sert ve ince peptidoglikan katmanı ve buna bağlı olan dış membrandan oluşmaktadır (Lima de Faria, 1969; Ghuysen ve Hakenbeck, 1994). Lipoproteinleri ve porin gibi özelleşmiş proteinleri içeren dış membran, bu gruptaki bakterilere özgüdür. Gram-negatif bakterilerin hücre zarı, Gram-pozitif bakterilerin hücre zarına göre kimyasal yapı olarak daha karmaşıktır (Lima de Faria, 1969; Ghuysen ve Hakenbeck, 1994). Gram-pozitif karakterdeki bakterilerin hücre zarında ise iç membranın üstünde yer alan kalın peptidoglikan tabakası mevcuttur. Lipitler bakımından fakir fakat polisakkaritler bakımından zengin olan bu katmanın içerisinde

ise polisakkaritler, mukopolisakkaritler, tekoik ve lipotekoik asitlerin yanı sıra antijenik M-proteinler bulunur (Lima de Faria, 1969).

Gram-negatif karakterdeki bakterileri zorlu çevre şartlarına karşı koruma hücreye şeklini verme ve seçici geçici bir bariyer olarak görev yapmanın yanı sıra bazı enzimatik sistemleri de bünyesinde bulunduran hücre çeperi (Lima de Faria, 1969; Koebnik ve diğ., 2000) çift katlı bir membran ile çevrilidir ve dış membranları; tamamı sitoplazmada sentezlenen fosfolipidler, lipopolisakkaritler (LPS), lipoproteinler ve integral dış membran proteinlerinden oluşmaktadır (Bos ve Tomassen, 2004).

Hücreyi oluşturan temel organik moleküller basit şekerler, yağ asitleri, amino asitler ve nükleotitlerdir. Küçük moleküller hücrenin temel kimyasal yapıtaşlarının sentezlenmesinde ve enerji elde edilmesinde kullanılırlar. Küçük moleküllerin polimerleri olan büyük moleküller ise biyolojik süreçlerin özgüllüğünden ve biyolojik bilginin transferinden sorumludurlar. Proteinler doğadaki en önemli makromolekül gruplarından biridir ve canlı hücresindeki pek çok işlev farklı tiplerdeki protein molekülü tarafından yürütülür. Uzun aminoasit zincirlerinden oluşan proteinler, virülent mikroorganizmalarda aktif antijen olarak tanımlanan ilk yapılardır (Heidelberger, 1956). Proteinler hücrenin yapısal sağlamlığını sağlamanın yanı sıra bakteriyel konjugasyonda, bakteriyofaj bağlamada ve hücre büyümesinde de görev almaktadır (Jeannin ve ark., 2002).

Bakterilerin hücre zarı yapısında bulunan dış membran proteinleri (OMP: outer membrane proteins) ve LPS'ler canlıda koruyucu bağışıklık oluşturulmasında rol alan temel dış membran antijenleridir (Fulop ve ark., 1995). LPS'ler ile immünizasyon kısmi koruma sağlarken (Ruffolo ve Adler, 1996), Gram-negatif bakterilerin antijenik karakteri ile yakından ilişkili olan OMP'ler (Qian ve diğ., 2008a) canlıda koruyucu bağışık yanıt oluşturduğu için temel antijenlerdir (Ruffulo ve Adler, 1996).

Bakterilerin hücre zarındaki proteinlerin saflaştırılması sırasında önce bütün membran proteinleri elde edilir. Bu ekstrakta çeşitli kimyasal maddelerle muamele edildiğinde dış membran proteinleri saflaştırılmış olur ve dört veya beş adet baskın temel proteinin bulunmasıyla karakterize edilir (Crosa ve Hodges, 1981). Bunun aksine, içte bulunan

sitoplazmik membran SDS-PAGE analizlerinde çok daha fazla sayıda protein bandı oluşturur ki bu özellik Gram-pozitif karakterdeki bakterilerin sitoplazmik membranlarında da bulunmaktadır.

Temel dış membran proteinlerinin önemi, permeabilite çalışmalarının gerçekleştirilmesinin ardından anlaşılabilmiştir. (Ghuysen ve Hackenbeck, 1994). Bakterilerin dış membranlarında bulunan porinler hücre zarının seçici geçirgen bir bariyer olarak görev yapmasını sağlar (Hancock, 1997) ve pek çok çözünür madde, bakteri hücresi içine porin adı verilen bu protein kanallarını kullanarak girer (Arman, 2009). Özellikle porinler tarafından oluşturulan kanalların, birtakım virülens faktörlerinin konak hücresine taşınmasında da görev aldığı bildirilmiştir (Kuehn ve Kesty, 2005).

Bakterilerin identifikasyonu için genel olarak rutin biyokimyasal metotlar kullanılmaktadır. Fakat biyokimyasal metotlar bakterilerin tür içi ayrımında yetersiz kalabilmektedir. Farklı coğrafi bölgelerden izole edilen aynı türe ait bakteriler arasında OMP profilleri bakımından farklılıklar vardır (Pacha ve Kien, 1969; Santos ve diğ., 1995; Zorilla ve ark., 2003b). Bunun yanı sıra bu yapıların bakterilerin dış membran proteinleri, enfeksiyon sırasında ve konak immün yanıtının oluşturulmasında önemli bir rol üstlenirler (Qian ve diğ., 2008a). Bu bakteriyel proteinlerin tespiti yeni antibakteriyel ürünlerin ve aşıların geliştirilebilmesi açısından da önem teşkil etmektedirler (Knappskog ve diğ., 1993; Bos ve diğ., 2004; Mao ve diğ., 2007; Qian ve diğ., 2008a).

2.4 BALIKLARDA HASTALIĞA NEDEN OLAN PATOJEN BAKTERİLER

Balıklar içerisinde yaşadıkları su ortamında bulunan mikroorganizmalar ile vücudu kaplayan derileri ve solungaçları ile devamlı temas halindedirler. Bakteriler balığın vücuduna çeşitli yollarla girerek balığın iç organlarına yerleşebilir ve hastalık oluşturabilir. Stok yoğunluğunun normalden fazla olduğu kültür ortamlarında, patojen bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyöz hastalıklara çok sık rastlanmaktadır (Horsley, 1977; Sar ve Rosenberg, 1987). Su ürünleri yetiştiriciliğinin dünya çapında hızlı gelişimi, uzun süredir bilinenlerin yanı sıra yeni tanımlanan bakteriyel hastalıkların

ortaya çıkış sıklığının ve bu hastalıkların etkenlerinin artmasına neden olmuştur (Frerichs ve Roberts, 1989).

Bakteriyel identifikasyon metotları geliştikçe ve bakteriyel klasifikasyon sistemleri güncellendikçe bakteriyel balık hastalıklarından sorumlu genus ve tür sayısı değişmektedir. Gram-negatif karakterdeki balık patojenleri balıklarda tipik olarak septisemi ile seyreden ülseratif hastalıklara neden olurken, Gram-pozitif karakterdeki bakteriler çoğunlukla balıklarda gözlerde ekzoftalmus ve opaklaşma, deride letarji ve koyulaşmaya neden olurlar (Woo ve Bruno, 1999; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010). Gram-negatif bakteriler bakteriyel balık hastalıklarının büyük bir bölümünden sorumludur. Gram-pozitif karakterdeki patojenler daha az sıklıkla hasta balıklardan izole edilmekle birlikte, su kirliliği veya su sıcaklığındaki değişimler gibi özel koşullar altında belirli bazı balık türlerinde ağır kayıplara neden olabilmektedir (Frerichs ve Roberts, 1989).

2.4.1 Gram-negatif Balık Patojenleri

Balıklarda hastalık yaptıkları rapor edilen Gram negatif karakterdeki bakteri türleri çoğunlukla Vibrionaceae, Aeromonadaceae, Flavobacteriacea, Pseudomonaceae ve Pasteurellaceae familyalarına mensuptur (Holt ve diğ., 1994; Woo ve Bruno, 1999; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010).

2.4.1.1 Vibrionaceae

Vibrionaceae familyası üyeleri özellikle denizel ortamın en baskın bakteriyel gruplarından birini oluşturur ve denizel heterotrofik bakteriyel popülasyonun önemli bir kısmını teşkil eder (Simidu ve Tsukamoto, 1985). Bu familya *Vibrio*, *Plesiomonas* ve *Photobacterium* gibi akuatik ortam için büyük öneme sahip genusları içermektedir. Bu familyaya ait bireyler Gram-negatif, çoğunlukla hareketli, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif çomaklardır. Dünya çapında yayılım gösteren bu familyanın bireyleri akuatik ekosistemin bir parçasıdır ve hem balıkların doğal mikroflorasında yer alır hem de insan, balık ve omurgasız su canlılarının hastalık olgularında patojen olarak izole edilebilir (Farmer ve Janda, 2005; Austin ve Austin, 2007).

Bu familyanın en önemli genusu olan *Vibrio* genusuna ait bireyler çoğunlukla polar flagellaları ile hareket etmeleri, vibriostat (O/129) testine duyarlı olmaları ve optimum

üreme için NaCl'ye ihtiyaç duymaları gibi özelliklerinden dolayı familyanın diğer genuslarından ayrılırlar (Farmer ve Janda, 2005). Vibriosis hastalığı en yaygın balık hastalıklarındandır ve hasta balıklardan başlıca *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *V. damsela*, *V. vulnificus* biyotip II, *V. tubiashii*, *V. harveyi* ve *V. cholerae*-non-O1 izole ve identifiye edilirken günümüzde bu türler dışında *V. scophthalmi*, *V. logei* ve *V. splendidus* gibi farklı *Vibrio* türleri de izole edilmiştir (Le Bretton, 1999; Toranzo ve diğ., 2005; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010).

V. anguillarum, başlangıçta Avrupa bölgesindeki balıklarda hastalık oluşturmuş, ardından da dünyanın diğer bölgelerine taşınarak 48 tür canlıdan hastalık etkeni olarak izole edilmiştir. Deniz balıklarının yanı sıra, tatlısu ortamlarındaki balıklarda da hastalık oluşturduğuna dair kanıtlar olması nedeniyle akuakültürde oldukça yaygın bir problem olarak kabul edilmektedir (Austin ve Austin, 2007).

Türkiye'de bu genusa ait bakterilerden *V. anguillarum* çipura balıklarından (Candan, 1993a; Korun, 2006) kültür Atlantik salmonlarından, (Candan, 2000), gökkuşağı alabalıklarından (Timur ve Korun, 2004; Tanrıkul, 2007), levrek balıklarından (Timur ve diğ., 2005; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008) ve kırmızı mercan balıklarından (Korun ve Gökoğlu, 2007) ve izole edilmiştir. *V. ordalii* çipura (Candan, 1993b; Akaylı, 2001; Timur ve diğ., 2004) ve levrek (Korun ve Timur, 2008) balıklarından izole edilmiştir. *V. harveyi* kültür levrek balıklarının hastalık olgularından izole edilmiştir (Korun ve Akaylı, 2004; Korun ve Timur, 2008). *Vibrio alginolyticus* ve *V. damsela* ise kültür çipura balıklarının hastalık olgularından izole edilmiştir (Akaylı, 2001).

Balıkların hastalık olgularından nadiren izole edilen *V. logei*'nin kaynağı deniz suyudur (Austin ve Austin, 2007). *V. logei*'ye benzer özellikteki bir organizma, su sıcaklığı 10 °C'nin altına düştüğü zaman kültür atlantik salmonlarında oluşan ve sığ deri lezyonları ile seyreden bir hastalık olgusundan izole edilmiştir (Benediksdottir ve diğ., 1998). Daha önce çipura, levrek, kalkan ve Atlantik salmonlarının hastalık olgularından izole edilen (Austin ve Austin, 2007) *V. splendidus*, akuatik çevrenin normal bakteriyel florasının bir parçasıdır ve 114 günden fazla hayatta kalma süresi vardır (Lopez ve Angulo, 1995). Kalkan ve morina gibi çeşitli balık ve kabuklu türlerinin fırsatçı

patojenlerinden olduğu rapor edilen *V. pelagius*, denizel halofilik bir bakteri türüdür (Angulo ve diğ., 1992; Santos ve diğ., 1997; Armada ve diğ., 2003). *V. scophthalmi* ise larval dönemde kalkan balıklarının barsak mikroflorasının baskın türlerindendir (Cerda-Cuellar ve Blanch, 2004).

2.4.1.2 Aeromonadaceae

Aeromonadaceae familyasının en tipik genusu olan *Aeromonas* genusu daha önce Vibrionaceae familyası içerisinde incelenmesine rağmen, Bergey Sistematik Bakteriyoloji kitabında 16s rDNA analizleri sonucunda bu familyadan çıkartılarak Aeromonadaceae familyası altında incelenmesi gerektiğini önerilmiştir. Bu familyaya ait *Aeromonas* genusunun bireyleri tatlı su ve deniz ortamının en önemli mikroorganizmalarındandır ve bu genusun bazı türleri insan, balık ve omurgasızların primer veya frısatçı patojenlerindendir (Shotts ve diğ., 1972; Araujo ve diğ., 1990; Martin-Carnahan ve Joseph, 2005; Austin ve Austin, 2007). Vibriolar denizel ekosistemin doğal bir parçası iken tatlı suda Aeromonas türleri baskın hale gelir (Yoshimizu ve Kimura, 1976). Gram-negatif, fermentatif ve çoğunlukla hareketli olan Aeromonaslar, vibriostat testine dirençli olmaları ve üreme için NaCl'ye ihtiyaç duymamalarıyla *Vibrio* genusuna ait bireylerden farklılık gösterir (Martin-Carnahan ve Joseph, 2005). Bu genusa ait hareketsiz bir bakteri türü olan *A. salmonicida* bilinen en eski balık patojenlerindendir ve balıklarda furunkulozis hastalığına neden olmaktadır. Bu genusun hareketli bireylerinden *A. hydrophila* ise balıklarda bakteriyel hemorajik septisemiye yol açar (Frerichs ve Roberts, 1989; Woo ve Bruno, 1999; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010).

Türkiye'deki araştırıcılar *A. salmonicida*'yı levrek (Karataş ve diğ., 2005) ve gökkuşağı alabalıklarından (Kırkan ve diğ., 2003), *A. caviae* (Candan ve diğ., 1995), *A. sobria*'yı Atlantik salmonlarından (Karataş Düğenci ve Candan, 2003), *A. hydrophila*'yı gökkuşağı alabalıklarından (Baran ve diğ., 1981; Diler ve Altun, 1994; Köprücü ve Sarıeyyüpoğlu, 2010), levrek balıklarından (Şahrikoğlu ve Candan, 2002) ve çipura balıklarından (Akaylı ve diğ., 2009) ve *A. schubertii*'yi gökkuşağı alabalıklarından (Akaylı ve diğ., 2011a) izole etmişlerdir.

2.4.1.3 Flavobacteriaceae

Flavobacteriaceae familyası, fenotipik olarak karakterizasyonu en karmaşık olan ve sistematiği birçok değişikliğe uğramış olan bakteri familyalarından biridir. Bu familyanın bireyleri Gram-negatif karakterde ve çoğu zaman uzun çomaklardır. Bazı genuslarına ait bireyler hareketsizken, çoğunluğu kayma hareketi yapmaktadır Genel olarak oksidatif olan bu familyaya ait türlerin çoğu katı vasat üzerinde sarı veya turuncu pigmentli koloniler oluşturur (Bernardet ve diğ. 1996). Çoğunlukla çevresel türler olup, balıklarda hastalık olgularından da izole edilmişlerdir (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007). Bu genusun üyelerinden *Flavobacterium columnare*, balıklarda kolumnaris, *F. psychrophilum* bakteriyel soğuk su hastalığının etkenidir (Frerich ve Roberts, 1989; Woo ve Bruno, 1999; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010), *Tenacibaculum maritimum* ise özellikle deniz balıklarında kayıplara neden olmaktadır (Suzuki ve diğ., 2001; Avendano-Herrera ve diğ., 2004).

Türkiye'de *F. columnare* (Kubilay ve diğ., 2008) ve *F. Psychrophylum* gökkuşağı alabalıklarından (Kayış ve diğ., 2009), *F. johnsoniae* (Karataş ve diğ., 2010) ve *F. hydatis* mersin balıklarından (Timur ve diğ., 2009) izole edilmiştir. *Flavobacterium* sp. ise çipura balıklarından izole edilmiştir (Akaylı ve diğ., 2009).

2.4.1.4 Pseudomonadaceae

Pseudomonadlar düz veya hafif kıvrık Gram-negatif, oksidatif çomaklardır. Çoğu türü polar flagellaları ile hareketlidir. Familyanın en önemli genusu olan *Pseudomonas* genusuna ait bireylerden *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens* ve *P. plecoglossicida* gibi türler çeşitli balık hastalıkları olgularında başlıca patojen olarak rapor edilirken *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. luteola* ve *P. stutzeri* çeşitli balıkların hastalık olgularında identifiye edilmiştir (Woo ve Bruno, 1999; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007)

Bu genusa ait bireylerden *P. anguilliseptica,* sitokrom oksidaz ve katalaz testleri pozitif, fluoresan pigment üretmeyen, nişastayı hidrolize edemeyen, nitratları indirgemeyen ve arabinoz, laktoz, maltoz, sukroz gibi birçok karbonhidrattan asit üretemeyen bir türdür (Palleroni, 2005). İlk olarak yılan balıklarında hastalıklara yol açtığı rapor edilen bu balığın daha sonra çipura, ringa, orfoz ve morina gibi balık türlerinde de hastalıklara ve ölümlere yol açtığı rapor edilmiştir (Domenech ve diğ., 1999; Austin ve Austin, 2007).

Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarından *Pseudomonas* sp. (Aydın ve diğ., 2005), *P. putida* (Altınok ve diğ., 2006), *P. lutoeola* (Altınok ve diğ., 2007) ve *P. plecoglossicida* (Akaylı ve diğ., 2011b) izole edilmiştir.

Bu genusa ait bireylerden *P. stutzeri,* dünyanın bir çok bölgesinde, ahtapot ve insanların lezyonlarından izole edildiği gibi (Farto ve diğ., 2003) atıksu, tatlısu, toprak ve denizel ortamlarda bulunduğu rapor edilmiştir (Rosselo ve diğ., 1991; Sikorski ve diğ., 2002)

2.4.2 Gram-pozitif Balık Patojenleri

Balıklarda hastalıklara neden olan Gram-pozitif karakterdeki bakteriler arasında en önemli türler Streptococcae, Micrococcaceae, Nocardiaceae ve Mycobacteriaceae familyalarına aittir (Austin ve Austin, 2007).

2.4.2.1 Streptococcaceae

Streptococcus ve *Lactococcus* gibi hem insan hem de balık sağlığı açısından iki önemli genusu içeren bu familyanın bireyleri Gram-pozitif, hareketsiz, fermentatif, sitokrom oksidaz ve katalaz negatif olup iki veya daha fazla birey yan yana gelerek zincir oluşturur (Austin ve Austin, 2007). Bu familyaya ait bireyler, hem tatlı suda hem de denizdeki kültür balıklarında, su sıcaklığının 15 °C'nin üstüne çıktığı zamanlarda enfeksiyonlara neden olurlar (Akhlagi ve Mahjor, 2004; Vendrell ve diğ., 2006). Bu familyanın üyelerine ait bakteriler tarafından oluşturulan ve genel olarak streptococcosis olarak adlandırılan bu enfeksiyonlar balıklarda hemorajik septisemi, ekzoftalmia ve deride koyulaşma ile karakterize edilir (Akhlagi ve Mahjor, 2004).

Streptococcus genusuna ait bakterilerden *Streptococcus iniae*, *Streptococcus milleri* ve *Streptococcus parauberis* gibi türler hem tatlı su hem de deniz ortamındaki birçok farklı türde hastalıklara neden olmuştur (Kusuda ve Siguyama, 1981; Kitao, 1993; Colorni ve diğ., 2002; Austin ve Austin, 2007). *Streptoccus* genusuna ait türler hasta levrek (Colorni ve diğ, 2002) ve gökkuşağı alabalığı (Ceschia ve diğ., 1998) gibi türlerden izole edilmiştir. Ülkemizde *Streptococcus* sp. kültür çipura balıklarının karma enfeksiyonlarından (Akaylı ve diğ., 2009) izole edilmiştir. Bu familyanın üyelerinden

Lactococcus garviae ise ülkemizdeki balıkların hastalık olgularından sıklıkla izole edilmektedir (Tanrıkul ve Gültepe, 2011).

L. garviae daha önce alabalıklardan ve sarı kuyruk balıklarından izole edilmiştir (Eldar ve diğ., 1999). Ülkemizde ise özellikle gökkuşağı alabalıklarında salgınlara neden olmaktadır (Çağırgan ve Tanrıkul, 1995; Diler ve diğ., 2002; Özer ve diğ., 2008).

2.4.2.2 Micrococcaceae

Planococcus ve *Stomatococcus* genuslarının yanı sıra *Micrococcus* ve *Staphylococcus* gibi balık hastalıkları açısından önemli olan iki genusunu içeren bir familyadır. Staphylococcus genusuna ait bireyler Gram-pozitif, hareketsiz, fermentatif, sitokrom oksidaz negatif, katalaz pozitif bakterilerdir. Gram preparatında birçok birey yan yana gelerek üzüm salkımı görüntüsü oluşturur (Koneman, 1992). Staphylococcosis enfeksiyonlarında balıklarda vücut üzerinde ve yüzgeçlerde hemorajiler, deride koyulaşma, letarji ve aşırı miktarda mukus salgılanması gözlemlenir. İç bakıda ise abdominal boşlukta asidik sıvı birikmesi, karaciğerde solgunluk ve büyüme ve dalakta büyüme görülür (Austin ve Austin, 2007). *Staphylococcus aureus* sazan balıklarından (Shah ve Tyagi, 1986), *S. epidermidis* ise kültür sarı kuyruk ve kırmızı mercan balıklarından (Kusuda ve Sugiyama, 1981) izole edilmiştir

Ülkemizde kültür gökkuşağı alabalıklarından bu familyaya ait bireylerden *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* (Timur ve Akaylı, 2003) ve *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis* türleri izole edilmiştir (Turgay, 2009). Kubilay ve Uluköy (2004) ise kültür çipura balıklarındaki bir hastalık olgusunda etken olarak *Staphylococcus epidermidis* izole ve identifiye etmişlerdir.

Sitokrom oksidaz testi *Staphylococcus* ve *Micrococcus* üyelerinin ayrımında kullanılabilecek en basit testlerden biri olmakla birlikte, besiyeri içeriği ve inkübasyonun süresi bu test sonucunda farklılıklara neden olabilir (Faller ve Schleifer, 1981). Genel olarak oksidatif olan ve Gram preparatında 4'lü gruplar şeklinde görülen *Micrococcus* genusuna ait bakteriler (Austin ve Austin, 2007), hem genus içerisinde, hem de tür içerisinde koloni rengi, morfolojisi ve sitokrom oksidaz aktivitesi gibi bazı biyokimyasal test sonuçlarında farklılıklar göstermektedir (Kloos ve diğ., 1974). Bu

araştırıcıların rapor ettiği sonuçlara göre, katı besiyeri üzerinde mat sarı koloniler oluşturup sitokrom oksidaz test sonucu negatif olabilen *Micrococcus* türleri mevcuttur. Bu iki genus arasındaki ayırt edici özelliklerden biri de üreme zamanıdır. *Micrococcus* genusuna ait bireylerin katı besiyeri üzerinde tipik kolonilerinin oluşması için 48 saat gibi bir süreye ihtiyaç duyulurken, *Staphylococcus* genusuna ait türler daha kısa sürede ürerler (Koneman, 1992). *Micrococcus* genusuna ait bireyler çoğu zaman sarı, pembe veya turuncu renkte pigment oluştururken, *Staphylococcus* genusuna ait bireyler genellikle pigmentsiz beyaz veya gri renkli koloniler oluşturur (Koneman, 1992).

Micrococcus genusunun balıklarda hastalık oluşturduğu rapor edilen tek türü olan *Micrococcus luteus* Gram-pozitif, hareketsiz, oksidatif, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif bir bakteridir (Buller, 2004). Karakteristik olarak 4'lü gruplar halinde görünürler (Austin ve Austin, 2007). Bu bakteri fry mortalite sendromuna yakalanmış gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Austin ve Stobie, 1992). Balebona ve diğ. (1998) tarafından çipura balıklarındaki hastalık olgularından *Micrococcus* sp. izole edilmiştir. Bu tür şimdiye kadar ülkemizdeki hasta balıklardan izole edilmemiştir.

2.5 İMMÜNOKİMYASAL YÖNTEMLER

Bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde bakteriyolojik, histolojik ve moleküler biyolojik metodlar kullanılırken türler arası ve tür içi farklılıkların ortaya çıkarılması ve aşı çalışmaları için serolojik ve immünokimyasal yöntemler günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Adams ve Thompson, 2006).

Antijenler konak immün sisteminde spesifik (özgül) bir antikor üretimine neden olan, organizmaya yabancı olan partiküllerdir (Candan ve Karataş, 2010). Genellikle tüm protein molekülleri ve hatta mikroorganizmanın tamamı antijen olarak kabul edilmektedir. Modifiye globülinler veya immunoglobülinler olarak da bilinen antikorlar (Heidelberger, 1956) ise canlıların bağışıklık sistemi tarafından üretilen ve antikor olarak adlandırılan vücuda giren yabancı maddelerin tanınmasını ve yok edilmesini sağlayan proteinlerdir (Janeway ve diğ., 2001). Antikorlar aglütinasyon veya presipitasyon gibi immün reaksiyonlara yol açarlar ve virülent mikroorganizmaları veya bunların toksinlerini elemine ederek canlıları bu mikroorganizmalara karşı korurlar

(Heidelberger, 1956). Organizmanın antijenle uyarılmasından sonra daha fazla antikor üretilir ve bir süre sonda dolaşım sisteminde antikorlar görülmeye başlar (Heidelberger, 1956; Ellis, 1999). Antikorlar, antijen özgüllükleri nedeniyle makromoleküllerin belirlenmesi ve yerlerinin tayininde kullanılırlar (Montero, 2003).

İmmünolojik yöntemler proteinlerin saflaştırılmasında olduğu kadar nükleik asitlerin ve proteinlerin tanımlanmasında da önem taşırlar (Temizkan ve Arda, 2008). İmmünokimya ise kimya biliminin bağışıklık sisteminin bileşenlerini ve reaksiyonlarını kimyasal maddeler kullanarak inceleyen bir dalıdır. İmmünokimya, protein molekülleri olan ve vücuda yabancı maddeler olarak adlandırılan antijenler ile bu maddelere karşı vücudun bağışıklık sistemi tarafından üretilen antikorlar arasındaki immünolojik ilişkiyi kimyasal maddeler kullanarak tespit eden bilimdalıdır (Coons, 1958; Montero, 2003). Kullanım alanları her geçen gün artan immünokimyasal yöntemler kullanarak rutin laboratuar metodları ile teşhisi uzun vakit alan bakteriyel ve viral balık hastalıklarının teşhisi daha hızlı yapılabilmekte (Anderson, 1993) ve tür içindeki antijenik farklılar da tespit edilebilmektedir (Pacha ve Kien, 1969; Santos ve diğ., 1995; Zorilla ve ark., 2003b). Akuatik bakteriyolojide ve balık hastalıklarının teşhisinde antijen-antikor ilişkisi temeline dayanan (Koneman, 1992) immünokimyasal yöntemlerden aglütinasyon, fluoresan antikor testi, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), elektroforetik yöntemler ve Western-blot tekniği uzun süredir kullanılmaktadır (Adams ve diğ., 1995; Austin, 1998; Timur ve Timur, 2003; Austin ve Austin, 2007).

2.5.1 Aglütinasyon

Aglütinasyon belirli bir antijen ile ona özgü bir spesifik bir antikor arasında gelişen reaksiyondur. Antijene karşı özel olarak geliştirilen ve ticari olaraksatılan antikorlar sayesinde aglütinasyon tekniği yaygın olarak kullanılmaktadır (Kimberley ve MacNair, 2004). Aglütinasyon tekniğinin lam aglütinasyon, tüp aglütinasyon ve latex aglütinasyon gibi çeşitleri bulunmaktadır (Ellis, 1999). Aglütinasyon testi ile identifikasyonun yanı sıra aynı türe ait bakterilerin serotipi de belirlenebilmektedir (Kimberley ve MacNair, 2004). Küçük miktardaki antikor ile bilinen mevcut bakteriyel balık patojenlerinin büyük çoğunluğunu teşhis etmek mümkündür (Arkoosh ve Kaattari, 1993). Bakteriyel aglütinasyon reaksiyon testleri, immunolojik testler arasında en kolay

yapılabilenlerdir (Edwards ve Ewing, 1955; Toranzo ve diğ., 1987; Aldova, 1987; Arkoosh ve Kaattari, 1993; Santos ve diğ., 1996).

Mikroorganizmaların hücre yüzeyindeki antijenlerine bağlı olarak serotiplendirme yapılır ve bakterilerin serotiplendirme çalışmaları sırasında lam aglütinasyon testi kullanılmaktadır (Sorensen ve Larsen, 1986). Serotiplendirmede aynı türe ait bireyler arasındaki farklılığı ortaya çıkartmak için dış membran proteinleri, virülens faktörler ve lipopolisakkaritler etkilidir (Mandrell ve Zollinger, 1977; Shimada ve diğ., 1994).

V. anguillarum'um epizootiolojik ve ekolojik çalışmalarında serolojinin (ve dolayısıyla serotiplendirmenin) önemi, bu türe ait 3 farklı serotipi tanımlamış olan Pacha ve Kiehn (1969) tarafından aglütinasyon yanıtları incelenerek açıklanmıştır. Günümüzde ise bu bakterinin Avrupa'daki serotiplendirme çalışmalarında 23 farklı serotipinin bulunmasına rağmen, yalnızca 01, 02, 03 ve 04 serotipinin balıklarda epizootiklere neden olduğu bildirilmiştir (Pedersen ve diğ., 1999).

Lam ve tüp aglütinasyon testleri *Aeromonas hydrophila* ve *A. sobria*'nın (Pacha ve Kien, 1969; Leblanc ve diğ., 1981) ve *Vibrio*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas* ve *Lactobacillus* genuslarına ait bakterilerin (Toranzo ve diğ., 1987), latex aglütinasyon testi *A. salmonicida*'nın (McCarthy, 1975), serotiplendirilmesinde, teşhisinde ve teşhisin konfirmasyonunda kullanılmıştır.

Bu yöntemlerin yanı sıra mikroaglütinasyon ve presipitasyon Ouchterlony jel difüzyon yöntemleri de *Aeromonas* septisemileri ve bakteriyel böbrek hastalığı gibi balıklarda gözlemlenen çeşitli bakteriyel hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır (Ingram, 1993; Roberson, 1993; Timur ve Timur, 2003).

2.5.2 Fluoresan Antikor Tekniği

Fluorescein ile kimyasal olarak işaretlenmiş antikor veya antijenlerin kullanıldığı (Coons, 1958) ve herhangi bir antijenin canlı dokuları veya serum içerisindeki varlığını tespit etmede (Anderson, 1993) ve teşhisinde (Roberson, 1993) kullanılan bu yöntemin direkt (FAT) ve indirekt (IFAT) olmak üzere iki tekniği vardır (Anderson, 1993). IFAT tekniği *Yersinia ruckeri*'nin (Bullock ve diğ. 1978; Kubilay ve Timur, 2001); *A.*

hydrophila'nın (Fliermans ve Hazen, 1980) ve *Edwardsiella ictaluri*'nin (Ainsworth ve diğ., 1986) teşhisinde, balık dokusundaki varlığının ve yerinin tespitinde kullanılmıştır.

2.5.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Tekniği

ELISA tekniği *A. salmonicida*'nın (Smith, 1981); *V. anguillarum*'un (Adone ve diğ., 1996; Gudmundsdottir ve diğ., 2009); *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*'nın (Bakopoulos ve diğ., 1997); *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *V. alginolytivus* ve *V. ordalii*'nin (Akaylı, 2001) ve *Yersinia ruckeri*'nin (Kubilay ve Timur, 2001) teşhisinde ve teşhisin doğrulanmasında kullanılmıştır.

2.5.4 Elektroforetik Yöntemler

Elektrik yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği bir teknik olan elektroforezde çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda hareket (göç) etmeleri prensibine dayanır. Elektroforez yoluyla, makromoleküller destek ortamı üzerinde ağırlıklarına göre farklı mesafelerde hareket edebilirler. Hafif olan moleküller daha ileri gidebilirken, ağır olanlar daha az ilerleyebilirler. Elektroforetik yöntemler, destek ortamının konumuna ve içeriğine göre farklı isimler almaktadır. En yaygın olarak kullanılan iki elektroforez metodundan biri olan yatay agaroz jel elektroforezinde DNA ve RNA (Ribonükleik asit) gibi PCR (Polimerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'ın son ürünleri incelenebilirken, dikey pozisyonlu jel elektroforezisi olan SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi) metodunda ise proteinler veya lipopolisakkaritler gibi makromoleküller incelenmektedir (Wessel ve Fluge, 1984; Vesterberg, 1989; Vesterberg, 1993; Arda ve Ertan, 2008).

SDS-PAGE metodu kullanılarak proteinlerin ayrıştırılması ve identifikasyonunun Laemmli (1970) tarafından ortaya çıkarılmasının sonrasında, Towbin ve diğ. (1979) ve Brunette (1981), proteinlerin jelden membrana transfer edilerek bu membranın immünolojik deneylerde kullanıldığı Western-blot tekniğini bulmuştur.

Çipura balıklarından hastalık etkeni olarak izole edilen bakteri türlerinin dış membran proteinleri üzerine çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Toranzo ve diğ. (1983), Santos ve diğ., (1995), Simon ve diğ. (1996), Wang ve diğ. (2003) *V. anguillarum*,

Magarinos ve diğ., (2003) *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, Zorrilla ve diğ., (2003b), Qian ve diğ., (2007), Qian ve diğ. (2008b) ile Snoussi ve diğ. (2008) *V. alginolyticus*'un dış membran proteinlerini analiz etmişlerdir. Bu çalışmalar sonucunda araştırıcılar bakterilerin virülens faktörleri ile ilişkili yapılarını, tür içindeki antijenik yapı farklılıklarını ve bu antijenik yapıların, hastalıkların önlenmesi için geliştirilecek aşı formülasyonlarında kullanılması gerektiğini tespit etmişlerdir. Ülkemizde ise Akaylı ve diğ., (2008) kültür çipura balıklarından izole edilen *V. alginolyticus* izolatlarının OMP ve LPS profillerini incelemişlerdir.

2.5.5 Western-blot Tekniği

Protein immün emdirimi olarak da adlandırılan Western blotting testi ile bakteri türüne özgü proteinin, aynı türe karşı özel olarak geliştirilen monoklonal veya poliklonal antikorlar ile tespiti gerçekleştirilir (Brunette, 1981; Hossenlopp ve diğ., 1986). Bu teknik çeşitli araştırıcılar tarafından *A. salmonicida* (Chart ve diğ., 1984) *V. anguillarum* (Cipriano ve diğ., 1985; Norqvist ve diğ., 1989; Santos ve diğ., 1997) ve *A. hydrophila* (Dooley ve diğ., 1986) gibi balık patojenlerinin teşhisinde ve teşhisin konfirmasyonunda kullanılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 MALZEME

3.1.1 Araştırmanın Yapıldığı Yer

Bu çalışmada incelenen hasta balık örnekleri, Nisan 2009, Temmuz 2009 ve Mayıs 2010 tarihlerinde Muğla iline bağlı Milas ilçesindeki dört adet ve İzmir iline bağlı Çeşme ilçesindeki bir adet ticari çipura işletmesinde gerçekleştirilen üç örnekleme çalışması sonucunda temin edilmiştir. İşletmelerden ikisi, karasal alanda zeminden temin edilen su ile çalışan kuluçkahane olup (1 ve 4 numaralı işletmeler) diğerleri ise açık denizdeki kafeslerde çeşitli boylarda porsiyonluk çipura yetiştiriciliği yapan işletmelerdir (2, 3 ve 5 numaralı işletmeler).

Sahada gerçekleştirilen örnekleme ve bakteriyolojik ekimlerin ardından, identifikasyon için gerekli mikrobiyolojik çalışmalar İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı'na ait mikrobiyoloji laboratuarında yürütülmüştür. Lam aglütinasyon testleri İspanya'daki Santiago de Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Departmanına ait CIBUS laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Protein saflaştırma ve SDS-PAGE analizi çalışmaları ise İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi ve İspanya'daki mikrobiyoloji laboratuarlarında gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE sonucunda elde edilen jellerin fotoğrafları ise İ. Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki laboratuarlarda çekilmiştir.

3.1.2 Hasta Balık Materyali Temini

İşletmelerde gerçekleştirilen örnekleme çalışmaları sonucunda, ağırlıkları 3 ile 130 g arasında değişen toplam 27 adet hasta balık örneği incelenmiştir. İşletmelerdeki balık örnekleri seçilirken renginde farklılık olan, vücut yüzeyinde ülser veya lezyonlar bulunan, yüzeye yakın ve yavaş yüzme hareketi gibi çeşitli klinik bulguları gösteren bireyler tercih edilmiştir.

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Referans Suşlar ve Antikorlar

Bu çalışmanın çeşitli aşamalarında kullanılmak üzere Santiago de Compostela Üniversitesi (İspanya) Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Alicia Estevez Toranzo tarafından söz konusu üniversitenin İhtiyopatoloji grubunun kültür koleksiyondan hediye edilen *V. anguillarum*'un O1 serotipine ait R 82, SRV 10.1 ve PC 725 kodlu suşlar ile *V. anguillarum*'un O2 serotipine ait PC 696.1 ve RV 22 kodlu suşlar kullanılmıştır. Lam aglütinasyon testinde ise aynı çalışma grubu tarafından hediye edilen ve *V. anguillarum*'un O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilmiş olan poliklonal tavşian serumları çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.4 Araştırmada Kullanılan Bakteriyolojik Besiyerleri

Çalışma sırasında bakteriyolojik teşhis için tryptic soya agar (Merck, 1.05458), tryptic soya broth (Merck, 1.05459), TCBS agar besiyeri (Merck, 1.10263), nutrient sıvı besiyeri (Merck 105443), Difco marine agar 2216 (Becton Dickinson, 212185), oksidasyon/fermentasyon Hugh Leifson bazal besi yeri (Merck 110280), Methyl red/Voges proskauer besi yeri (HiMedia, M070), nitrat sıvı besiyeri (Merck 110204), üçlü şeker demir agar besiyeri (Merck, 1.03915), üre agar bazal besiyeri (Merck, 1.08492), Simon's sitrat agar besiyeri (Merck 102501), agar agar (Merck 101613), tripton (HiMedia, M026), pepton (HiMedia, M463), L-arjinin-monohidroklorit (Merck 1015440), L-lizin-monohidroklorit (Merck 105700), ornitin (Merck 106906), jelatin (Merck 104078), D-mannitol (Merck 5980), sakkaroz (Merck 107651), laktoz monohidrat (Merck, 1.07657), L-arabinoz (Merck 101492), sorbitol (Doğa ilaç), D-fruktoz (Merck, 1.05323), D-ksiloz (Merck, 8689), üre (Merck 108486), nişasta (Merck, 1.01253), maya özütü (HiMedia, RM027) ve safra tuzları (Oxoid, L55) kullanılmıştır. Bu vasatların yanı sıra API 20E (BioMerieux, 20100) hızlı tanı kiti de tercih edilmiştir.

3.1.5 Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmada hasta balık örneklerinin incelemeden önce anestezisi 2-phenoxyethanol (Fluka, 10832) ile gerçekleştirilmiştir. Vasatların hazırlanmasında ve test sonuçlarının okunması sırasında metil kırmızısı (Merck 106076), Kovac's indol ayıracı (GBL 0525), kresol kırmızısı (Merck 105225), bromtimol mavisi (Merck, 1.03026), DD15T O129

diskleri 150 µg (Oxoid X3494B), ONPG diskleri (Oxoid DD013A), sodyum klorür (Riedel-de Haen 13423) ve ampicillin sodium salt (Biomatik, A2154) kullanılmıştır.

3.1.6 Protein Saflaştırma ve SDS-PAGE Tekniğinde Kullanılan Kit, Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Bu çalışmadaki bakteri izolatlarından protein örnekleri rutin laboratuar yöntemi ve "Complete Lysis-B(2X), EDTA-free" protein saflaştırma kiti (Roche, 04719948001) ile elde edildikten sonra bu protein örnekleri SDS-PAGE tekniği ile analiz edilmiştir. Rutin laboratuar yöntemiyle protein saflaştırılması ve SDS-PAGE tekniği sırasında akrilamid (Merck, 800830), N,N'-Methylenebisacrylamide (Sigma, M2022), tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, 1.08387), amonyumpersülfat (Merck, 1.09201) 2-Merkaptoethanol (Merck, 8057400005), glisin (Merck, 1.04169), N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (Merck, 1.10732), bromfenol mavisi (Merck, 108122), glisin (Merck, 3570), coomassie parlak mavisi R-250 (Merck, 112553), gliserol (HiMedia, RM081), metanol (Merck, 1.07018) ve glasiyel asetik asit (1.00056) kullanılmıştır. Standart protein karışımı (Marker) olarak "PageRuler Unstained Protein Ladder" (Fermentas, SM0661) tercih edilmiştir.

Çalışma materyalini oluşturan bakteri izolatlarından elde edilen protein örneklerinin analizi için kullanılan %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli, aşağıdaki solüsyonlar ve formülasyonlar kullanılarak hazırlanmıştır. Protein örnekleri jele yüklenmeden önce 2X örnek uyguılama tamponu ile karıştırılmıştır ve elektroforez tankına 5X tank tamponu yerleştirildikten sonra elektroforeze başlanmıştır (Arda ve Ertan, 2008).

Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 T, %2,7 C_{bis})

Akrilamid	29,2 g
Bis	0,8 g
H_2O	100 ml'ye tamamlanır
Karanlıkta +4 °C'de saklanır	

4X Ayırma jeli tamponu

Tris	18,15 g
H_2O	100 ml'ye tamamlanır
3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlanır	
+4°C'de saklanır	

4X Yükleme jeli tamponu

Tris	3 g
H_2O	50 ml'ye tamamlanır
5 N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır	
+4°C'de saklanır	

% 12 T ayırma jeli

Monomer çözeltisi	12 ml
4X ayırma jeli tamponu	7,5 ml
%10 SDS çözeltisi	300 µl
Distile su	10,2 ml
TEMED	15 µl
%10 APS çözeltisi	300 µl

%5 T yükleme jeli

Monomer çözeltisi	1,6 ml
4X yükleme jeli tamponu	2,5 ml
%10 SDS çözeltisi	100 µl
Distile su	5,63 ml
TEMED	5 µl
%10 APS çözeltisi	100 µl

2X Örnek uygulama tamponu (Final Sample Buffer)

C çözeltisi	2,5 ml
%10'luk SDS çözeltisi	4 ml
2-Merkaptoetanol	1 ml
Boya katılmadan önce pH 6,8'e ayarlanır	
Bromofenol mavisi	0,02 g
H_2O	10 ml'ye tamamlanır
- 20 °C'de saklanır	

5X Tank tamponu

Tris	15 g
Glisin	72 g
SDS	5 g
H_2O	1 litreye tamamlanır

+4°C'de saklanır. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirildikten sonra 5 kez sulandırılır ve tanka doldurulur.

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Enfekte Balıkların Klinik ve Otopsi Muayenesi

İşletmelerdeki hastalık sorunlarına ilişkin anemnez bilgileri her örnekleme çalışmasına gidildiğinde çiftlik sahiplerinden alınmış ve incelenecek hasta balık örneklerinin anestezisi 2-Phenoxyethanol (1 ml/litre) ile gerçekleştirilmiştir (Sehdev ve diğ., 1963). Anestezi uygulamasından sonra balıkların dış bakıdaki incelemesi gerçekleştirilerek gözlemlenen klinik bulgular not edilmiştir. Daha sonra steril şartlar altında otopsileri yapılan örneklerin (Amlacher, 1970) iç bakıdaki incelemesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Primer bakteri izolasyonu için enfekte balık örneklerinin karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarının yanı sıra kan ve lezyonlarından, %1 NaCl içeren TSA (Triptik soya agar) besiyerine, TCBS (Tiyosülfat sitrat safra tuzu sukroz) besiyerine ve MA (Marine Agar) besiyerine ekim yapılarak, petriler 21 °C'de 3 gün süre ile etüvde inkübe edilmiştir.

Hasta balık örneklerinden izole edilen bakteriler İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Balık Hastalıkları Laboratuarına getirilmiş ve saf kültürler elde edebilmek amacıyla yeni besiyerlerine azaltma metoduyla pasajlar alınmıştır. Bunun sonucunda toplamda 15 adet bakteri izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Saf kültürü elde edilen bakteri izolatlarının öncelikle genus düzeyinde identifikasyonu için Gram boyama ve %3'lük KOH solüsyonu ile gram karakteristiğinin belirlenmesi (Buck, 1982), asılı damla metodu ile hareket muayenesi, sitokrom oksidaz ve katalaz etkinlikleri, oksidasyon/fermentasyon testi ve O/129 testleri yapılmıştır. Ardından tür düzeyinde identifikasyon için TCBS besiyerinde üreme, arjinin dihidrolaz, lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, indol, MR, VP, üre kullanımı, sitrat kullanımı, jelatinaz, amilaz, lipaz, eskulin, nitrat, TSI (Triple Sugar Iron agar besiyeri), kanlı agarda üreme ve hemoliz, 4, 37 ve 44 °C'de üreme, %0, % 3, %5, %8 ve %10 tuzluluktaki besiyerlerinde üreme (Timur ve Timur, 2003; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007) ve VAM (*Vibrio anguillarum medium*) besiyerinde üreme (Alsina ve diğ., 1994) özellikleri araştırılmıştır. Belirli sıcaklık derecelerinde üreme özelliklerinin dışındaki testler 21-24 °C aralığındaki etüvlerde, 24-48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Ayrıca rutin laboratuar yöntemlerinin yanı sıra izolatların identifikasyonunda Gram-

negatif karakterdeki bakterilere API 20E hızlı tanı kiti de uygulanmıştır. Bu kitin kullanımında üretici firmanın (BioMerieux, Fransa) talimatları takip edilmiş ve hazırlanan kitler 21-24 °C'de 2 gün süreyle inkübe edildikten sonra gerekli ayraçlar damlatılarak test sonuçları okunmuştur (API 20E kullanım klavuzu, REF 20 100 / 20 160, 2002/10) .

3.2.3 Referans Suşların ve Serum Örneklerinin Hazırlanması

-80 °C'de saklanan R82, SRV 10.1, PC 725, PC 696.1, RV 22 kodlu referans *V. anguillarum* suşları, oda sıcaklığında çözündürülerek %1 NaCl içeren TSA besiyerine azaltma tekniği ile yayılarak 21 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Serum örnekleri testlere başlamadan hemen önce -25 °C'lik derin dondurucudan çıkartılmış ve oda sıcaklığında kısa süreli çözündürülmüştür. *V. anguillarum* olarak identifiye edilen izolatların serotiplerinin belirlenmesi için uygulanan lam aglütinasyon tekniğinde kullanılacak olan daha önceden dilüsyonları yapılaran poliklonal serum örnekleri kullanılmıştır.

3.2.4 Lam Aglütinasyon Testi

Bu çalışmada yapılan biyokimyasal testler sonucu *Vibrio anguillarum* olarak identifiye edilen izolatların serotipinin belirlenmesi amacıyla lam aglütinasyon testi uygulanmıştır (Sorensen ve Larsen, 1986). Bu amaçla önce çalışma materyalini oluşturan bakteri izolatlarından ve bir adet referans *V. anguillarum* serotip O1 bir adet de referans *V. anguillarum* serotip O2 suşundan O-antijen süspansiyonları hazırlanmıştır.

Bakteri izolatlarından O-antijen süspansiyonunun hazırlanması için özetle TSA besiyerinde üretilen taze izolatlardan alınan bakteriler 3 ml sodyum asetat tamponlu formalin salin çözeltisi (0,05 M $NaCOOCH_3$, 0,1 M NaCl, %1 [hacmen] formalin [%40], pH 7,5) içerisinde çözdürülmüştür. Ardından bu süspansiyon 1 saat süreyle 100 °C'lik su banyosunda tutularak O-antijenler elde edilmiştir (Sorensen ve Larsen, 1986). Lam üzerine önce sırasıyla negatif kontrol (steril distile su), *V. anguillarum*'un O1, O2 ve O3 sertiplerine karşı üretilen serumlar (18'er µl) damlatılarak, bu damlaların üzerine bakteri izolatlarından elde edilen O-antijen süspansiyonu (18 µl) eklenmiştir. Daha sonra lamlar 1-2 dakika hafifçe çalkalanarak beklenmiştir. Kuvvetli floresan ışık altında,

çökelme olayı gözlemlenmiştir. Lam üzerinde 1 dakika içerisinde gözle görülebilir çökelme oluşumu pozitif sonuç olarak kayıt edilmiştir. Çökelme olmaması veya çok zayıf çökelme oluşumu negatif sonuç olarak kayıt edilmiştir.

3.2.5 Patojen Bakterilerden Protein Örneklerinin Hazırlanması

Bakteriyel identifikasyon ve seroloji çalışmaları tamamlandıktan sonra, bakteri izolatlarından rutin laboratuar metodu ve hızlı protein saflaştırma kiti kullanılarak protein saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1 Rutin yöntem

Bakteri izolatlarından dış membran proteinlerinin saflaştırılmasında Crosa ve Hodges (1981) tarafından rapor edilen manuel metot kullanılmıştır. Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besiyerinde bakteri kültürü elde edildikten sonra bakterileri besiyerinden ayırmak için 10.000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj yapılıp tüpün üst kısmında kalan sıvı besiyeri uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibine çöken pelet 3 ml %0,3 NaCl içeren 10 mM Tris-HCl çözeltisi (pH: 8.0) ile sulandırıldıktan sonra Branson marka sonikatörde 3 defa 30'ar saniyelik sonikasyona tabi tutulmuştur. Sonikasyonun ardından, bakteri çözeltisi 1'er ml'lik porsiyonlar halinde iki ayrı ependorf tüpüne aktarılmıştır. 12.000 devir/dakikada 5 dakikalık santrifüjün ardından üstte kalan sıvı yeni ependorf tüplerine aktarılmıştır. 17.000 devir/dakikada 4 °C'de 1 saatlik santrifüjün ardından üstte kalan sıvı dökülmüştür. Bu santrifüj işleminden sonra bütün hücre proteinleri elde edilmiştir ve ependorf tüpünün dibinde kalan pelet 150 µl distile su ile sulandırılarak -25 °C'de saklanmıştır.

Rutin yöntem ile bakteri izolatlarından dış membran proteinlerinin temini için ise ayrı bir tüpte hazırlanan ve yukarıda belirtilen son santrifüj işleminde sonra elde edilen pelet 100 µl distile su ve 100 µl, 20 mM Tris-HCl içerisinde çözündürülmüş %3'lük iyonik bir deterjan olan sodyum-lauryl sarcosinate (sarkosil) çözeltisi ile sulandırılmıştır (Filip ve ark., 1973). Oda sıcaklığında 30-35 dakika inkübasyonun ardından 17.000 devir/dakikada 4 °C'de 1 saatlik santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılmış ve pelet 20 µl distile su ile yeniden sulandırılmıştır. Bakteri izolatlarından elde edilen dış membran proteini ekstraktı SDS-PAGE analizinde kullanılıncaya kadar -25 °C'de saklanmıştır.

3.2.5.2 Kit kullanılarak protein örneklerinin hazırlanması

Complete Lysis Protein Saflaştırma Kiti ile çalışmada elde edilen izolatlardan hazırlanacak proteinlerin saflaştırılması sırasında üretici firmanın talimatları takip edilmiştir. Öncelikle kit içerisinde bulunan ve protein ekstraksiyonu için gerekli kimyasal maddeleri içeren 1 adet tablet, yine kit içeriğinde bulunan 5 ml Lysis-B solüsyonu içerisine konularak kısa bir süre vortekslenmiş ve tamamen çözünmesi için 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. TSA katı besiyerinde 24 saat inkübe edilen taze kültürden alınan bakteri izolatları, ependorf tüplerinde 1 ml PBS tamponu içerisinde yoğun bir şekilde süspanse edilmiştir. 5.000 devir/dakikada 10 dakikalık santrifüjden sonra üstte kalan sıvı dökülmüştür ve dipte kalan pelet, kit içeriğindeki malzemelerle hazırlanan liziz solüsyonundan 150 µl ile yeniden sulandırılmıştır. Pipet ile homojenize edilen liziz solüsyonu ve pelet karışımı, daha iyi bir homojenizasyon sağlanması amacıyla kısa bir süre vortekslenmiştir. 13.000 devir/dakikada 5 dakikalık bir santrifüjün ardından üstte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır ve tüpe tekrar 150 µl liziz solüsyonu eklenerek pipet ve vortex yardımıyla homojenizasyon sağlanmıştır. Bu ticari kitin kullanımı sonucunda elde edilen protein örnekleri SDS-PAGE analizinde kullanılıncaya kadar -25 °C'de saklanmıştır.

3.2.6 Elektroforez

Çalışmada kullanılan 21 adet bakteri izolatı ve 4 adet referans bakteri suşundan yukarıda açıklandığı gibi protein örnekleri hazırlandıktan sonra bu izolatların protein profillerinin tespiti için SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli, 1970). SDS-PAGE düzeneğinin hazırlanması sırasında İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi'ndeki laboratuarlarda kullanılan solüsyonlar ve aletler Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

SDS-PAGE analizi için %5'lik yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılmıştır. SDS-PAGE düzeneğinin hazırlanması için önce, alt kısımda yer alacak olan ayırma jeli jel kasetine pipet yardımıyla, hava kabarcığı oluşturmamak için yavaşça dökülmüş ve üstünün düz olması amacıyla %0,1'lik SDS çözeltisi dökülerek donması için yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. Ayırma jeli donduktan sonra jelin üstündeki SDS çözeltisi ortamdan uzaklaştırılarak yükleme jeli konulmuştur ve protein örneklerinin döküleceği ceplerin oluşması için tarak benzeri kalıp, kasetin üst tarafına, iki camın arasına

yerleştirilmiştir. Yükleme jeli de donduktan sora cam kalıp, kasetten dikkatlice çıkartılarak, içinde 5 kez sulandırılmış tank tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin şeklini veren camlardan kısa olanı, tank içine yerleştirilen aparatın iç kısmına bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Camların monte edildiği aparat tanka yerleştirildikten sonra aparatın iç kısmına da aparatın en üstüne kadar tank tamponundan dökülmüştür. Sonrasında ceplerin oluşması için konulan tarak dikkatlice çıkartılmıştır ve tank tamponunun jel ile teması sağlanmıştır. Bu sırada protein örnekleri dondurucudan çıkartılarak yeni bir ependorf tüpünde, örnek uygulama tamponu ile eşit hacimde olacak şekilde (15 µl protein örneğine 15 µl örnek uygulama tamponu) karıştırılmış ve daha iyi bir karışım sağlamak amacıyla 5 dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra bu karışımdan 15 µl jeldeki ceplere konulmuştur. Ayrıca jeldeki ceplerden bir tanesine molekül ağırlığının belirlenmesinde yardımcı olan, molekül ağırlığı bilinen standart protein karışımı (marker) olarak 15 µl Fermentas PageRuler unstained protein ladder yüklenmiştir. Elektroforetik ayrışmanın sağlanması için tankın güç kaynağı ile bağlantıları yapılarak 50 V elektrik verilerek yaklaşık 7 saat beklenmiştir. Örnek uygulama tamponu içerisinde bulunan bromfenol mavisi sayesinde protein örneklerinin jel üzerindeki konumu takip edilmiştir ve jelin altına yaklaşık 0,5 cm kalınca güç kaynağı kapatılmıştır (Arda ve Ertan, 2008).

Elektroforetik ayrıştırmanın ardından şeffaf olan jeldeki protein bantlarının görünür hale gelmesi ve standart protein karışımı ile karşılaştırılarak molekül ağırlıklarının belirlenmesi için Coomassie Parlak Mavisi ile boyanmıştır (Diezel ve diğ., 1972). Bu yöntem için elektroforezin ardından jel, aside dayanıklı plastik bir kapta, hacminin 3-4 katı boya solüsyonu içinde gece boyunca 20 devir/dakika hızda çalkalanarak tutulmuştur. Ardından boyama solüsyonu dökülerek yıkama solüsyonu içinde, ara ara solüsyon yenilenerek 12 saat boyunca 20 devir/dakika hızda çalkalanarak tutulmuştur. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra İ. Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki laboratuarlarda jelin fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 3.1: İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuarında elektroforez deney düzeneğinin hazırlanması sırasında kullanılan solüsyonlar ve aletler

4. BULGULAR

4.1 HASTA ÇİPURA BALIKLARININ KLİNİK VE OTOPSİ BULGULARI

Bu çalışma boyunca gerçekleştirilen 3 farklı örneklemede incelenen hasta çipura balıklarında ortak özellik olarak dış bakıda klinik bulguları arasında karında şişkinlik ve renkte solgunluk göze çarpmıştır.

Muğla ili Milas ilçesinde zeminden temin edilen ve çipura yetiştiriciliğine uygun kimyasal özelliklere sahip su ile çalışan kuluçkahane'de (1 numaralı işletme) 2009 yılı Nisan ayında gerçekleştirilen örnekleme çalışmasında incelenen 20 g ağırlığındaki hasta balık örneklerinde dış bakıda yüzgeç diplerinde, kuyruk kaidesinde ve anüste hemorajiler ile alt çenede erozyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Bu balık örneklerinin iç bakısında ise iç organlarda solgunluk göze çarpmıştır (Şekil 4.2).

İzmir ili Çeşme ilçesinde deniz kafeslerinde porsiyonluk çipura yetiştiriciliği yapan 2 numaralı işletmede 2010 yılı Mayıs ayında gerçekleştirilen örnekleme çalışmasında temin edilen 80 g ağırlığındaki hasta balık örneklerinin dış bakısında deride pul kaybı, renkte solgunluk ve vücut yüzeyinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Örneklerin iç bakısında ise solungaçların ve iç organların anemik olduğu, peritonal boşlukta az miktarda şeffaf bir sıvının biriktiği görülmüştür (Şekil 4.4).

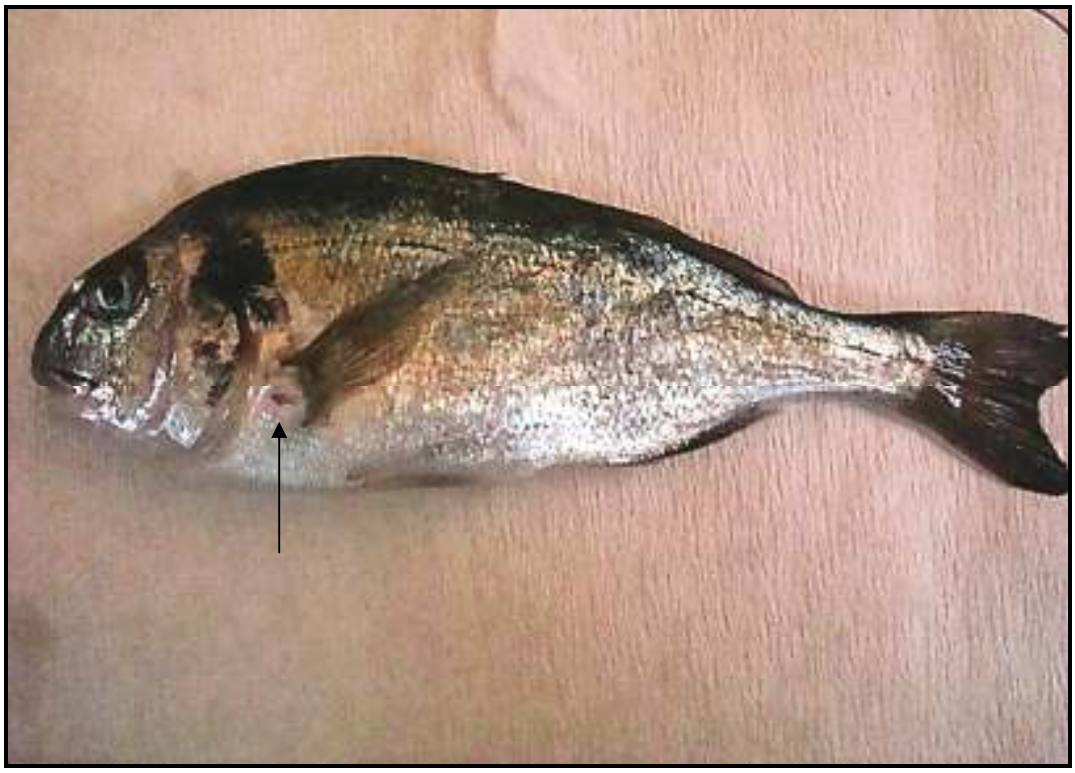
Muğla ili Güllük ilçesinde denizde kafeslerinde porsiyonluk çipura yetiştiriciliği yapan 3 numaralı işletmeden 2010 yılı Mayıs ayında gerçekleştirilen örnekleme çalışmasında temin edilen 10 g ağırlığındaki hasta balıkörneklerinin dış bakısında alt çenede erezyon, vücut yüzeyinde lezyonlar, deride pul kaybı ve yüzgeç diplerinde hemorajiler gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Bu işletmeden temin edilen balık örneklerininiç bakısında ise iç organların, özellikle de karaciğerin renginde solgunluk tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



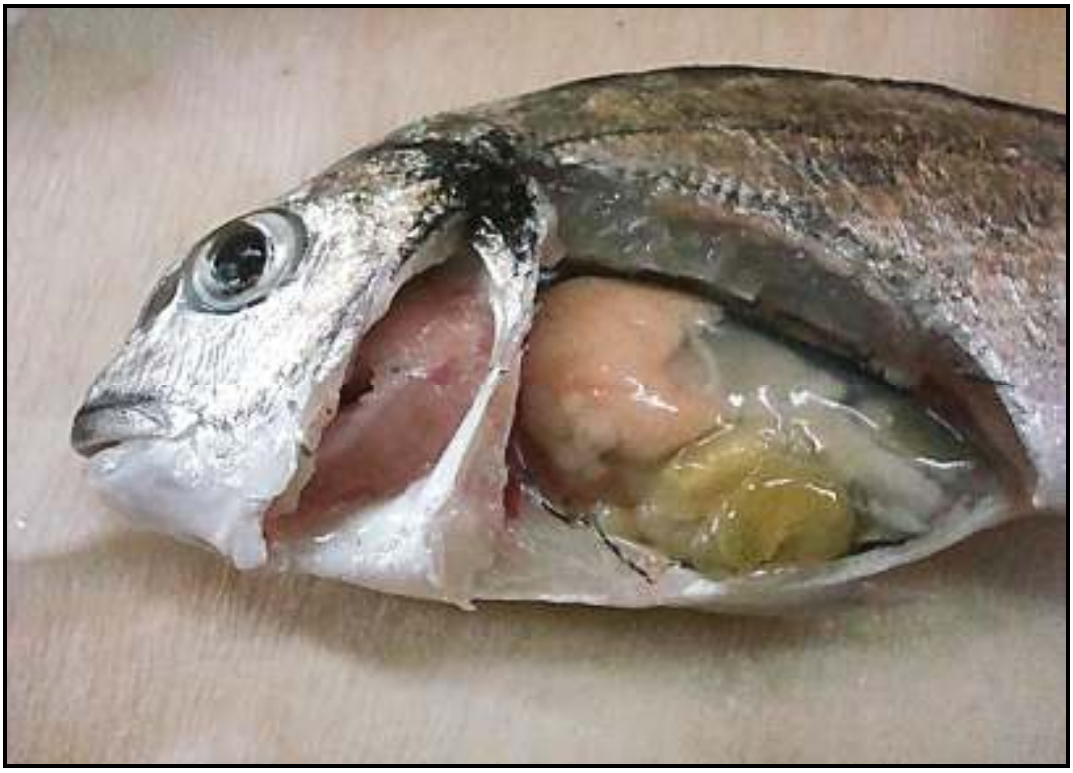
Şekil 4.1: 1 numaralı işletmeden temin edilen 20 g ağırlığındaki balık örneğinde anüste, kuyruk kaidesinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler (okla gösterilmiştir)



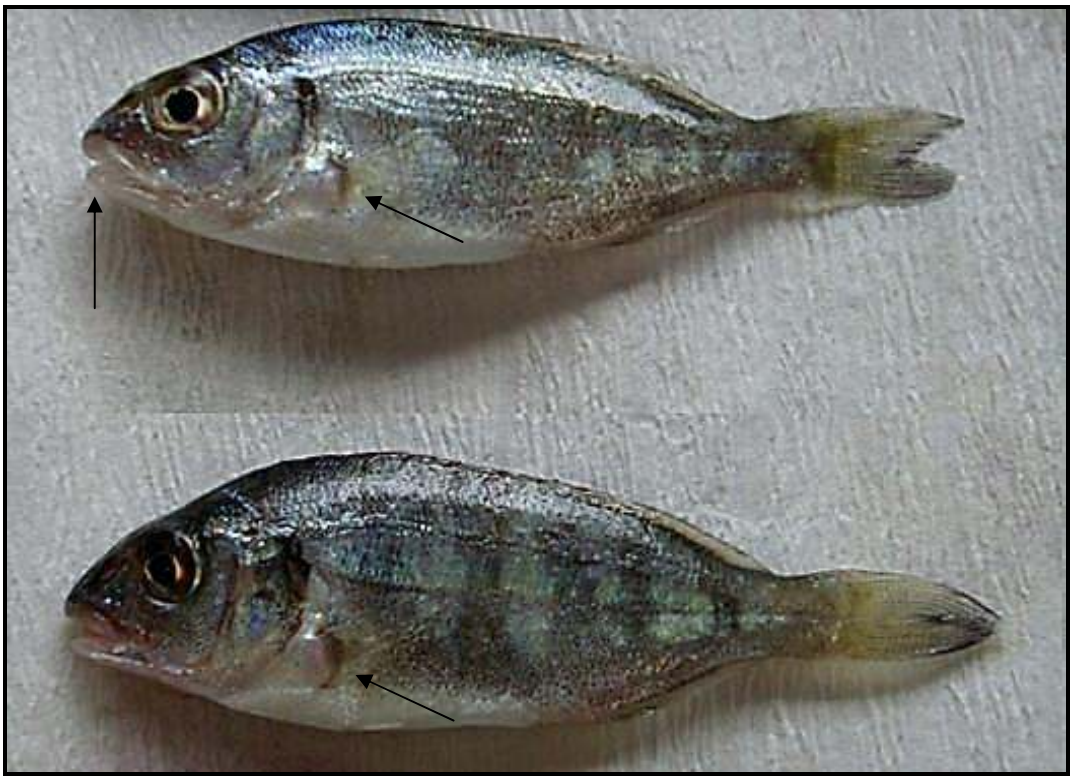
Şekil 4.2: 1 numaralı işletmeden temin edilen 20 g ağırlığındaki balık örneğinde iç organlarda solgunluk



Şekil 4.3: 2 numaralı işletmeden temin edilen 80 g ağırlığındaki balık örneğinde yüzgeç dibinde ve deri üzerinde hemorajiler (okla gösterilmiştir)



Şekil 4.4: 2 numaralı işletmeden temin edilen 80 g ağırlığındaki balık örneğinde karaciğer renginde solgunluk ve solungaçlarda anemi



Şekil 4.5: 3 numaralı işletmeden temin edilen 10 g ağırlığındaki balık örneklerinde vücut düzeyinde ve yüzgeç diplerinde hemorajiler (okla gösterilmiştir) ile alt çenede erozyon (okla gösterilmiştir)



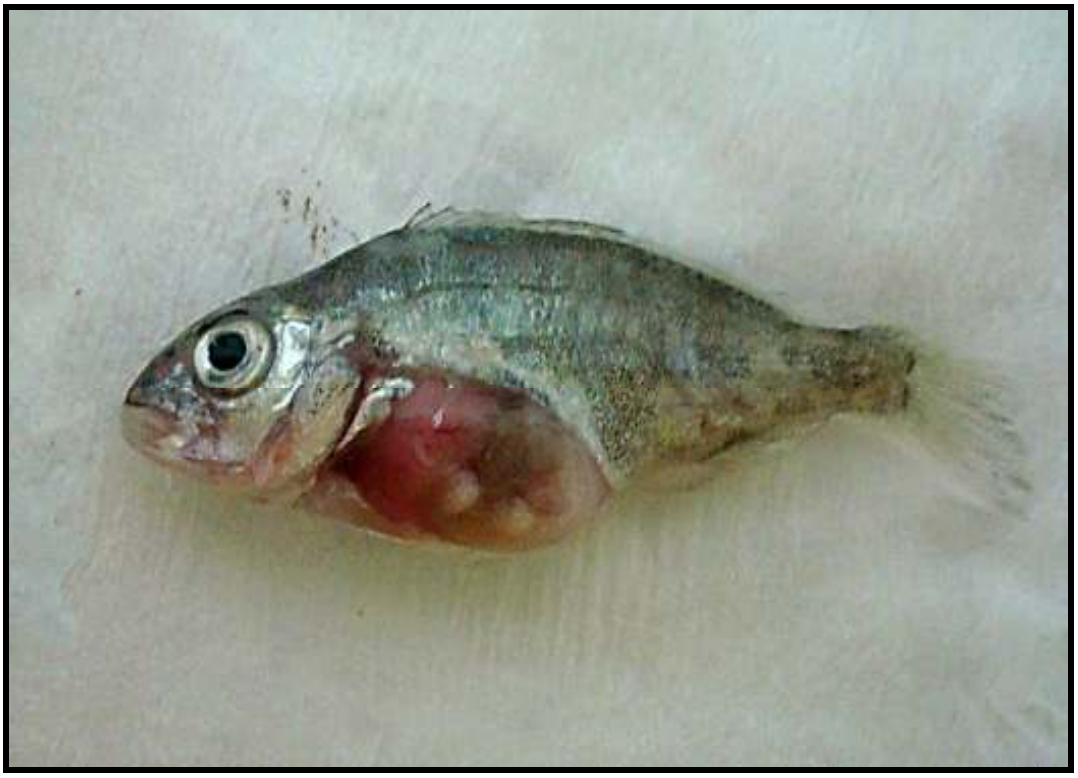
Şekil 4.6: 3 numaralı işletmeden temin edilen 10 g ağırlığındaki balık örneğinde karaciğer renginde solgunluk (okla gösterilmiştir)

Muğla ili Milas ilçesinde karasal alanda zeminden temin edilen su ile işletilen kuluçkahaneden (4 numaralı işletme) 2009 yılının Nisan ve Temmuz ayları ile 2010 yılı Mayıs ayında gerçekleştirilen örnekleme çalışmalarında temin edilen yaklaşık 3 g ağırlığındaki hasta balık örneklerinin dış bakısında abdomende şişkinlik ve deride renk kaybı olduğu görülmüştür (Şekil 4.7). Aynı işletmeden temin edilen balık örneklerinin iç bakısında ise karaciğer gibi iç organlarda büyüme, böbrekte erime ve özellikle karaciğerin üstünde peteşiyal hemorajilerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

Muğla ili Güllük ilçesinde denizdeki kafeslerde porsiyonluk balık yetiştiriciliği yapan 5 numaralı işletmeden temin edilen 130 g ağırlığındaki balık örneklerinin dış bakısında abdomende şişkinlik, deride renkte solgunluk ve pul kaybı olduğu görülmüştür (Şekil 4.9). Bu balık örneklerinin iç bakısında ise iç organların kanamalı olduğu, dalağın normalden büyük olduğu, barsakların şişkin ve kanlı olduğu ve peritonal boşlukta kanlı sıvı biriktiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



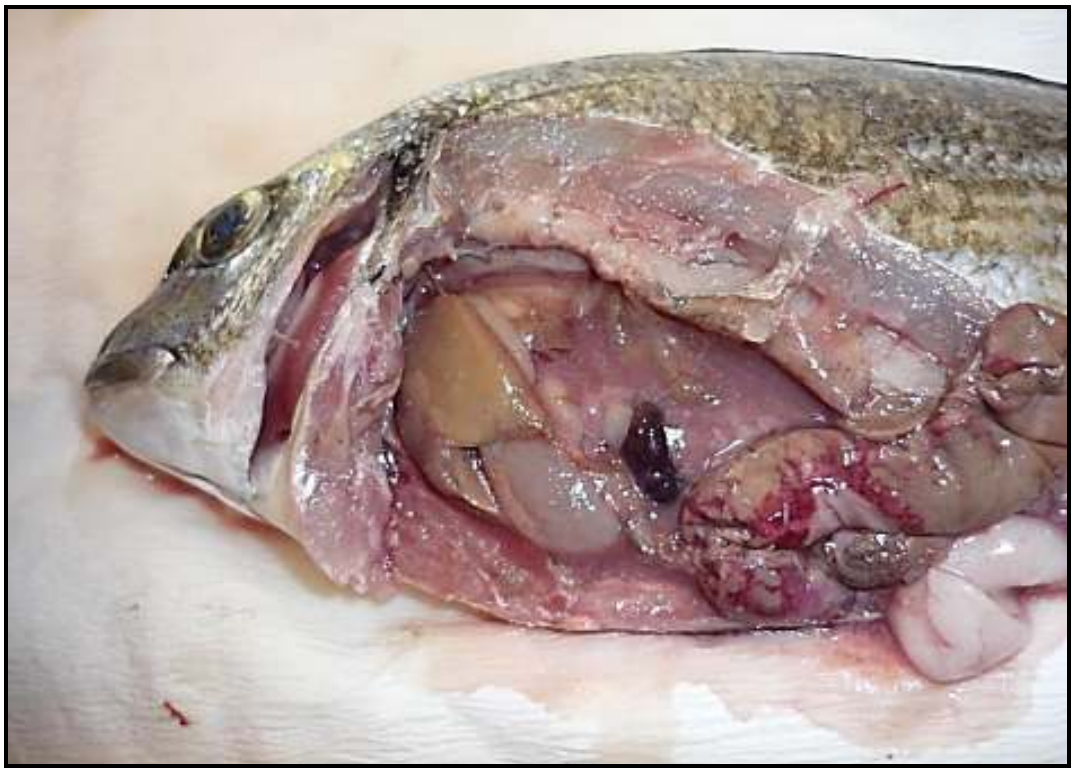
Şekil 4.7: 4 numaralı işletmeden temin edilen 3 g ağırlığındaki balık örneğinde abdomende şişkinlik ve deride renk kaybı



Şekil 4.8: 4 numaralı işletmeden temin edilen 3 g ağırlığındaki
balık örneğinde iç organlarda büyüme ve hemorajiler



Şekil 4.9: 5 numaralı işletmeden temin edilen 130 g ağırlığındaki balık örneğinde
abdomende şişkinlik ve deride renk kaybı



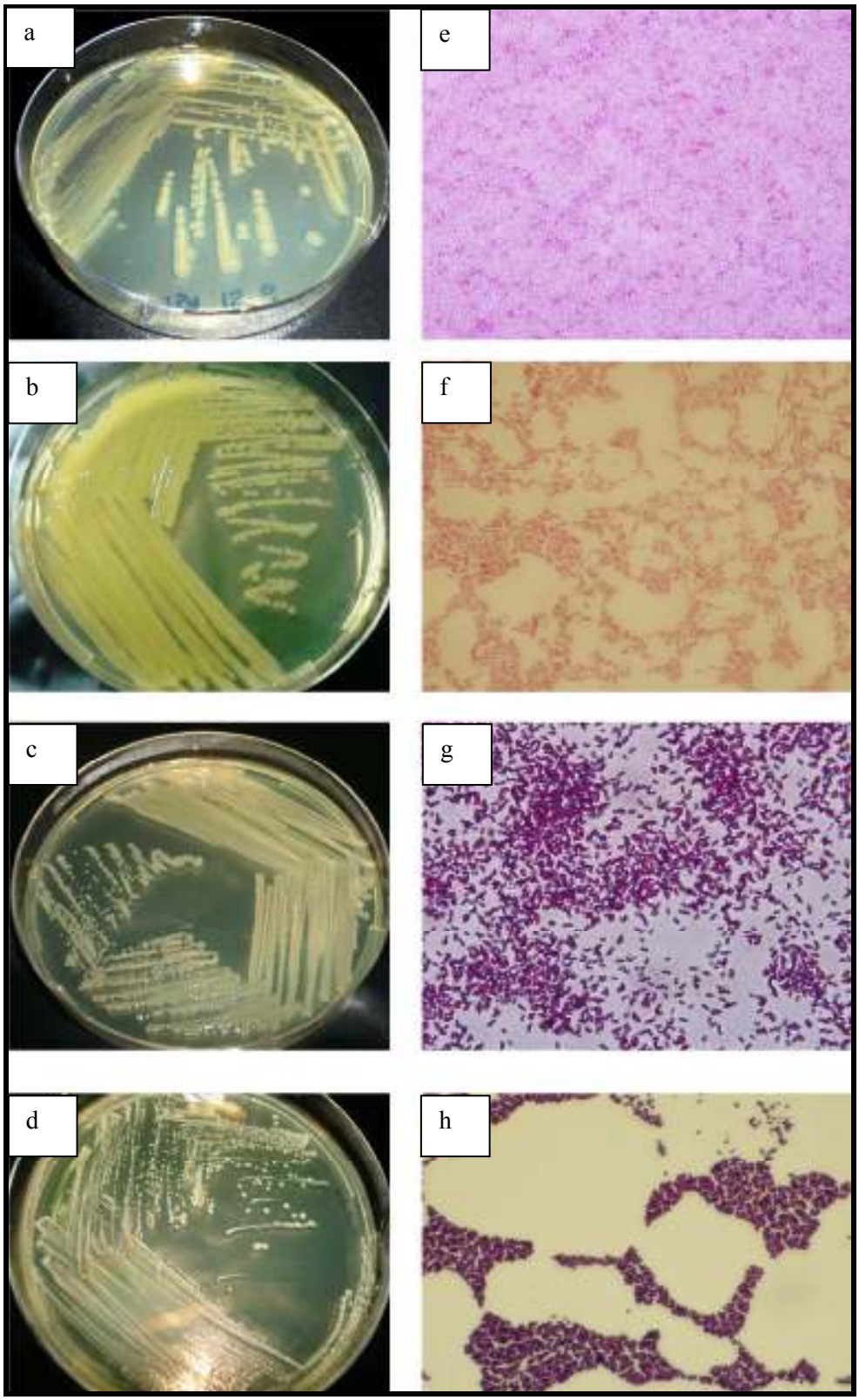
Şekil 4.10: 5 numaralı işletmeden temin edilen 130 g ağırlığındaki balık örneğinde peritonal boşlukta sıvı birikimi ve şişkin barsak

4.2 BAKTERİYOLOJİK BULGULAR

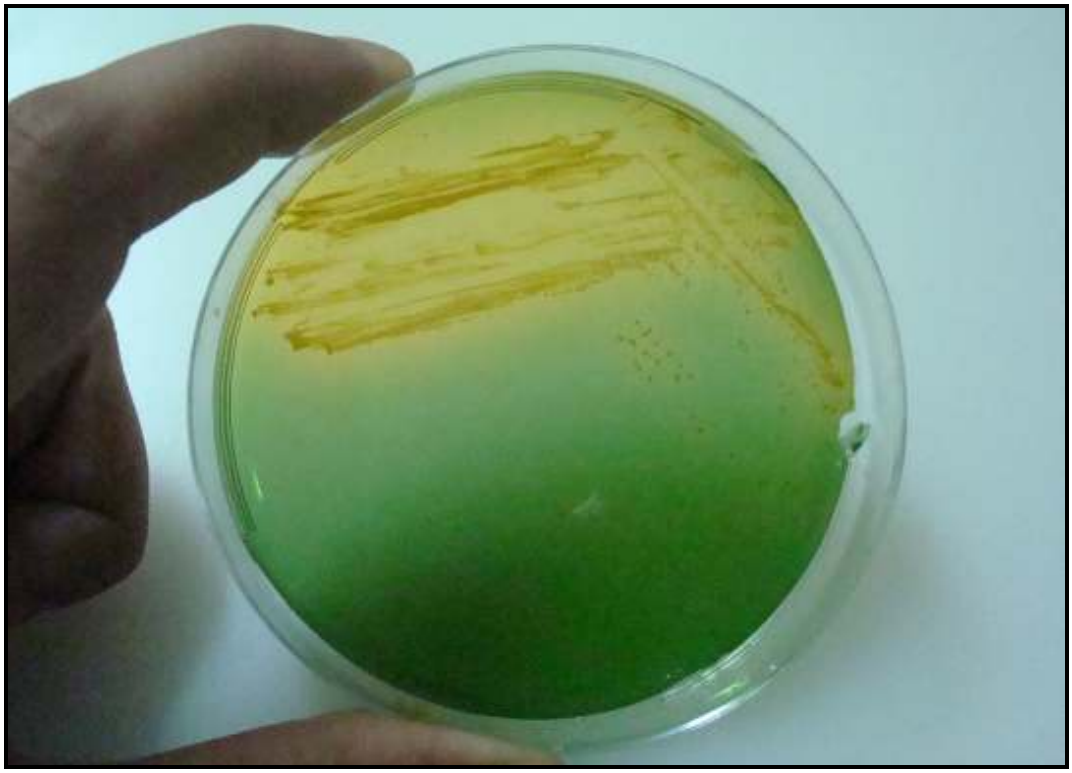
Hasta balık örneklerinden gerçekleştirilen bakteriyolojik ekimlerin sonucunda elde edilen bakteri izolatlarının, koloni tipi, rengi ve şekli bakımından farklılık gösterdiği görülmüştür. 1, 2, 3 ve 4 numaralı izolatlar TSA besiyeri üzerinde sarı krem renkli yuvarlak koloniler geliştiriken (Şekil 4.11a), 5,6 ve 8 numaralı izolatlar daha küçük, yuvarlak ve beyaz krem renkte koloniler geliştirmiştir. 7 numarlaı izolat krem renkli, yuvarlak, düz kenarlı olmayan koloniler geliştirmiştir. 9 numaralı izolat küçük beyaz krem, 10 ve 12 numaralı izolatlar yuvarlak, krem renkli küçük koloniler geliştirmiştir. 11 numaralı izolat TSA besiyeri üzerinde sarı turuncu (4.11b), 13 numaralı izolat ise küçük beyaz yuvarlak koloniler oluşturmuştur (Şekil 4.11c). 14 numaralı izolat aynı besiyeri üzerinde küçük yuvarlak ve mat sarı renkli koloniler oluşturmuştur. 15 numaralı izolat ise krem renkli yuvarlak konveks koloniler oluşturmuştur (Şekil 4.11d). Elde edilen bakteri izolatları önce Gram boyanma özelliklerine göre ayrılmıştır. 15 adet izolatın 13 tanesi Gram-negatif, 2 tanesi Gram-pozitif özellik göstermiştir. Gram preparatlarında 13 ve 14 numaralı izolatlar hariç hepsinin Gram-negatif karakterde

olduğu tespit edilmiştir. 1, 2, 3, 4 (Şekil 4.11e), 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 12 numaralı izolatların hafif kıvrık basiller, 11 numaralı izolatın uzun basil (Şekil 4.11f), 15 numaralı izolatın ise hafif kıvrık basiller olduğu (Şekil 4.11g) görülmüştür. 13 numaralı izolatın üzüm salkımı (Şekil 4.11h), 14 numaralı izolatın ise 4'lü paketler (tetrad) şeklinde dizilim gösterdiği gözlemlenmiştir.

1 numaralı işletmeden temin edilen hasta balık örneklerinden yapılan bakteriyolojik ekimler sonrasında TSA besiyerinde 3-4 mm çapında sarı-krem renkli koloni oluşturan 3 adet izolat elde edilmiştir. 20 gram ağırlığındaki balık örneklerinin Karaciğerden izole edilen 1 numaralı ve böbreklerinden izole edilen 2 ve 3 numaralı bu izolatlar Gram negatif karakterde, hareketli, sitokrom oksidaz ve katalaz testinde pozitif, fermentatif ve O/129'a hassas olmaları, TCBS (Şekil 4.12) ve VAM (Şekil 4.13) besiyerlerinde sarı renkli koloniler üretmeleri, kanlı agarda β-hemoliz yapmaları (Şekil 4.14), arjinin pozitif, lizin ve ornitin negatif, indol, VP ve ONPG test sonuçlarının pozitif olması ve diğer özellikleri nedeniyle (Tablo 4.1) *V. anguillarum* olarak identifiye edilmiştir.



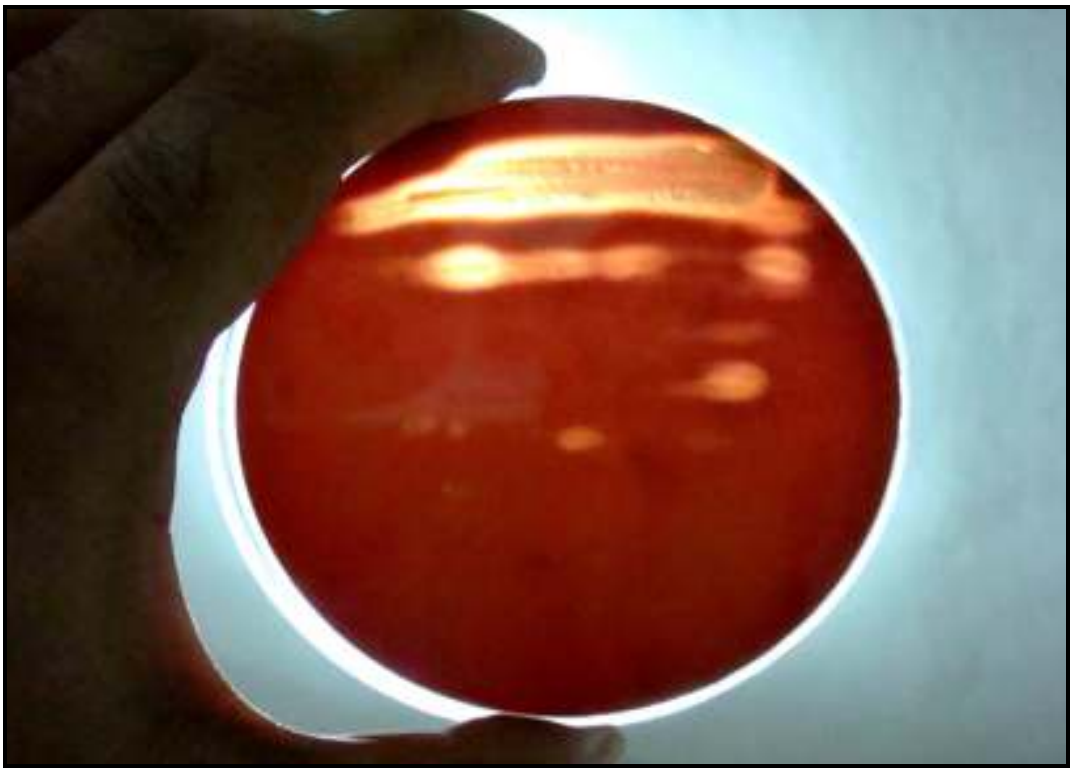
Şekil 4.11: Bakteri izolatlarının TSA besiyeri üzerinde oluşturduğu koloni tipleri [(a) 4 numaralı izolat b) 11 numaralı izolat c) 15 numaralı izolat d) 13 numaralı izolat)] ve Gram preparatındaki görüntüleri [(e) 4 numaralı izolat f) 11 numaralı izolat g) 15 numaralı izolat h) 13 numaralı izolat]



Şekil 4.12 TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan 1 numaralı *V. anguillarum* izolatı



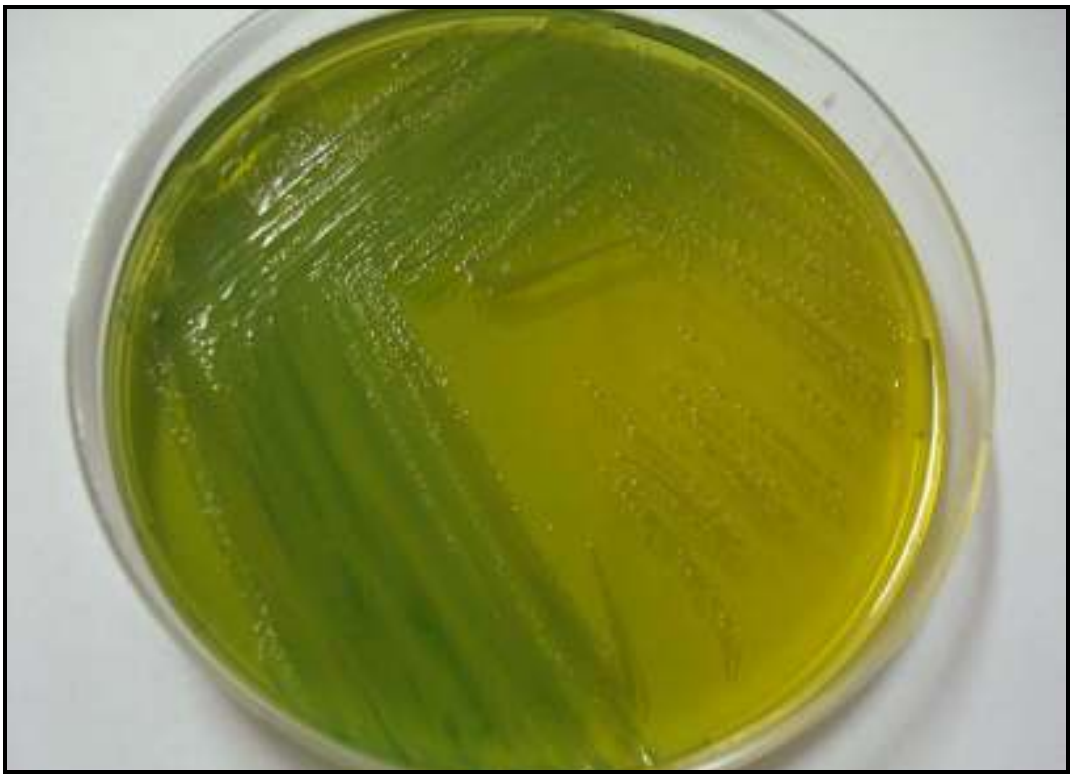
Şekil 4.13 VAM besiyerinde etrafında hare bulunan sarı renkli koloni oluşturan 1 numaralı *V. anguillarum* izolatı



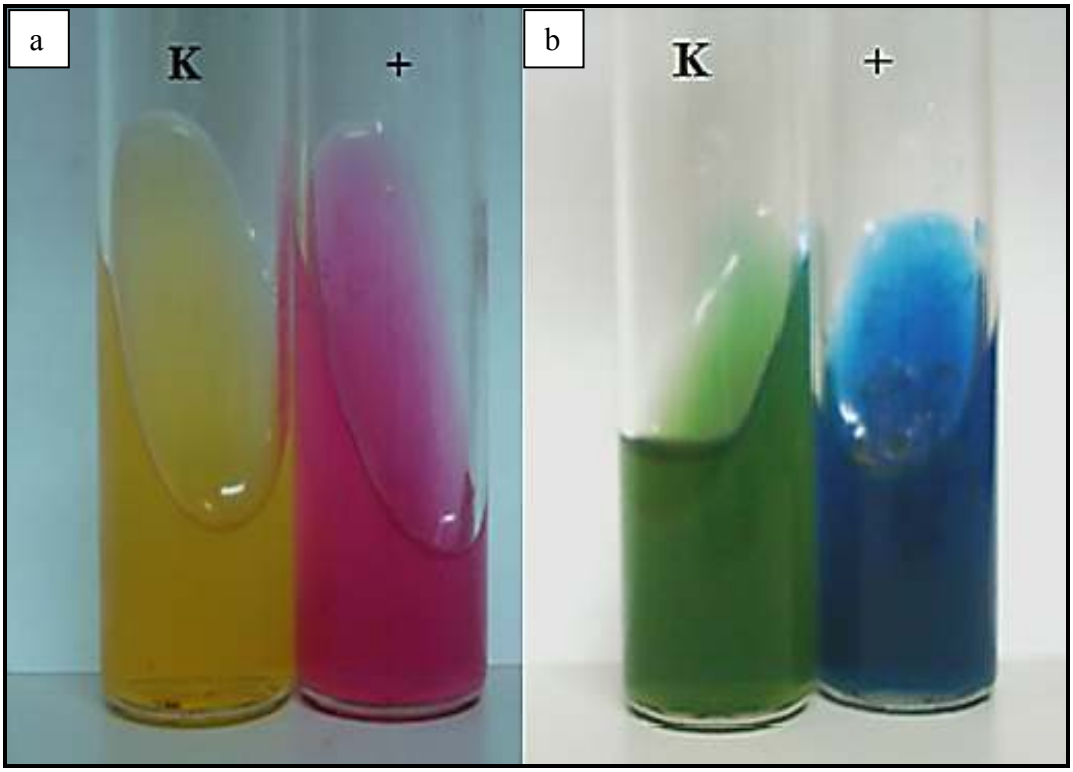
Şekil 4.14 Kanlı agar besiyerinde β-hemoliz yapan
3 numaralı *V. anguillarum* izolatı

2 numaralı işletmeden temin edilen farklı çaplardaki dört adet krem renkli koloni, Gram-negatif, hareketli, sitokrom oksidaz ve katalaz testinde pozitif, fermentatif ve O/129'a hassas olmalarıyla ilk etapta *Vibrio* sp. olarak identifiye edilmiştir. Bu işletmeden temin edilen 80 gram ağırlığındaki balık örneğinin böbreğinden izole edilen ve TCBS ve VAM besiyerlerinde sarı renkli koloniler üreten, arjinin pozitif, lizin ve ornitin negatif, indol, VP ve ONPG test sonuçları pozitif olan 4 numaralı izolat *V. anguillarum* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.1). Hasta balık örneklerinin böbreklerinden izole edilen ve TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan, arjinin, lizin ve ornitin negatif, VP testinde pozitif, MR ve indol testlerinde negatif sonuç veren 5 (Tablo 4.1) ve 6 numaralı izolatlar (Tablo 4.2) *V. scophthalmi* olarak identifiye edilmiştir. Hasta balık örneğinin kalbinden izole edilen ve TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan, arjinin testinde negatif, lizin ve ornitin testinde pozitif, indol ve VP testinde pozitif, MR testinde negatif olan ve %10 tuzlulukta üreyemeyen 7 numaralı izolat ise *V. harveyi* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.2).

3 numaralı işletmeden temin edilen hasta balık örneklerinden yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda toplamda dört farklı tipte koloni tespit edilmiştir. 3 numaralı işletmeden temin edilen 10 gram ağırlığındaki balık örneğinin böbreğinden izole edilen ve arjinin, lizin, ornitin, indol, jelatin ve amilaz test sonuçları negatif, eskulin test sonucu pozitif olan 8 numaralı izolat *V. scophthalmi* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.2). Hasta balık örneğinin dalağından izole edilen ve TCBS besiyerinde yeşil renkli koloni oluşturan (Şekil 4.15), arjinin test sonucu negatif, lizin, ornitin ve indol test sonuçları pozitif, üre (Şekil 4.16a), sitrat (Şekil 4.16b), jelatinaz ve amilaz test sonuçları negatif olan 9 numaralı izolat *V. logei* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.2). Hasta balık örneğinin dalağından izole edilen ve TCBS besiyerinde sarı krem renkli koloni oluşturan, arjinin test sonucu pozitif, lizin ve ornitin test sonuçları negatif, indol, ONPG, jelatinaz, sitrat ve VP test sonuçları pozitif, %5 tuzlulukta üreyebilen fakat %8 NaCl'de üreyemeyen 10 numaralı izolat *V. anguillarum* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.2). Hasta balık örneğinin kanından izole edilen ve TSA besiyerinde turuncu pigment üreten 11 numaralı izolat Gram-negatif olması, hareketli olması, sitokrom oksidaz ve katalaz pozitif olması, oksidatif ve O/129'a dirençli olması, arjinin, lizin ve ortnitin test sonuçlarının negatif, sitrat test sonucunun pozitif olması ve kanlı agarda hemoliz yapmaması nedeniyle *Pseudomonas stutzeri* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.3).

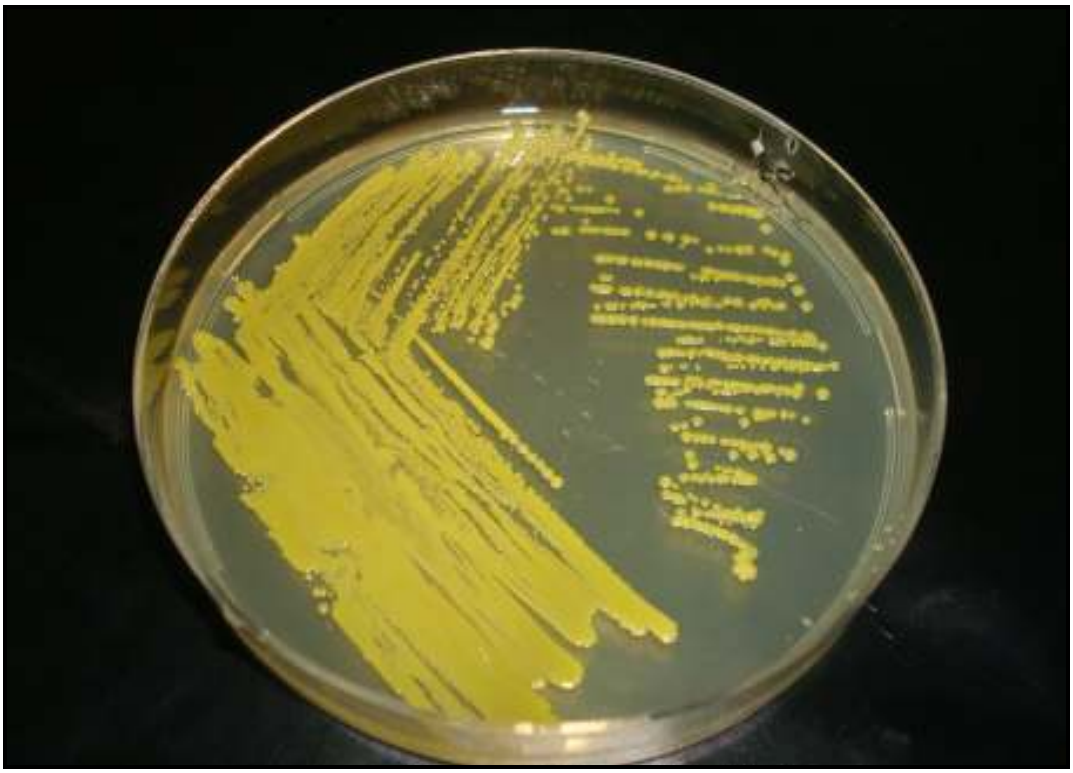


Şekil 4.15: TCBS besiyerinde yeşil renkli koloni oluşturan
V. logei izolatı (9 numaralı izolat)



Şekil 4.16: a) Üreaz testinde ekim yapılmamış negatif kontrol tüpü (K)
ve pozitif sonuç veren *Staphylococcus* sp. izolatı (13 numaralı izolat)
b) Sitrat testinde ekim yapılmamış negatif kontrol tüpü (K)
ve pozitif sonuç veren *P. stutzeri* izolatı (11 numaralı izolat)

4 numaralı işletmeden temin edilen yaklaşık 3 gram ağırlığındaki hasta balık örneklerinden TSA besiyerine yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda toplamda üç farklı tipte koloni tespit edilmiştir. Hasta balık örneğinin dalağından izole edilen krem renkli, Gram-negatif, hareketli, sitokrom oksidaz ve katalaz test sonucu pozitif fermentatif, O/129'a hassas, TCBS besiyerinde sarı renkli koloni oluşturan, arjinin test sonucu pozitif, lizin, ornitin test sonuçları negatif, indol, VP, ONPG, jelatinaz ve sitrat, test sonucu negatif, %5 tuzlulukta üreyebilen fakat %8 tuzlulukta üreyemeyen (Tablo 4.3) 12 numaralı izolat *V. anguillarum* olarak identifiye edilmiştir. Hasta balık örneğinin böbreğinden izole edilen ve TSA besiyerinde beyaz-krem renkli koloni oluşturan, Gram-pozitif ve Gram preparatında üzüm salkımı şeklinde dizilim gösteren, sitokrom oksidaz test sonucu negatif, katalaz test sonucu pozitif, fermentatif, O/129'a dirençli olan 13 numaralı izolat *Staphylococcus* sp. olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.3). Hasta balık örneğinin böbreğinden izole edilen ve TSA besiyerinde mat sarı renkli koloniler üreten (Şekil 4.17), Gram-pozitif ve Gram preparatında dörtlü veya sekizli gruplar halinde görülen, hareketsiz, oksidatif, sitokrom oksidaz test sonucu negatif, katalaz test sonucu pozitif ve O/129'a dirençli ve kanlı agarda α hemolitik üreme gösteren 14 numaralı izolat ise *Micrococcus luteus* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.17 TSA besiyerinde mat sarı renkli
Micrococcus luteus kolonileri (14 numaralı izolat)

5 numaralı işletmeden temin edilen 130 gram ağırlığındaki hasta balık örneğinin böbreğinden izole edilen ve TSA besiyerinde krem renkli koloni oluşturan, Gram-negatif, hareketli, sitokrom oksidaz ve katalaz test sonucu pozitif, oksidatif, O/129'a dirençli, arjinin, lizin ve ornitin, indol, MR, ONPG, üre, sitrat, jelatinaz ve amilaz test sonuçları negatif ve VP test sonucu pozitif olan 15 numaralı izolat *Pseudomonas anguilliseptica* olarak identifiye edilmiştir (Tablo 4.3).

Bu çalışmada boyunca gerçekleştirilen 3 adet örnekleme çalışmasında incelenen 27 adet hasta balık örneğinden izole edilen 15 adet bakteri izolatından, Gram-negatif karakterdeki 13 adet izolata API 20E testi uygulanmıştır. Bakteri izolatlarına ait API 20E test sonuçları bakterilerin konvansiyonel yöntemlerle gerçekleştirilen biyokimyasal test sonuçları ile birlikte tablolarda verilmiştir.

Tablo 4.1: Hasta Çipura Balıklarından Elde Edilen 1-5 Numaralı Bakteri İzolatlarının Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolat numarası	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
İşletme numarası	1	1	1	2	2
Örnekleme tarihi	Nisan 2009	Nisan 2009	Nisan 2009	Mayıs 2010	Mayıs 2010
Balık numarası	1-1	1-1	1-2	2-1	2-1
Örneğin ağırlığı	20 g	20 g	20 g	80 g	80 g
Organ	Karaciğer	Böbrek	Böbrek	Böbrek	Böbrek
Gram	-	-	-	-	-
Morfoloji	Basil	Basil	Basil	Basil	Pleimorfik
Hareket	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+
O/129 – 150 µg	Hassas	Hassas	Hassas	Hassas	Hassas
TCBS'de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
VAM besiyerinde üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Yeşil	-
Arjinin dihidroliz	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	-
MR	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-
ONPG	+	+	+	+	-
Jelatinaz	+	+	+	+	-
Amilaz	+	+	+	+	-
Lipaz	-	-	-	+	-
Eskulin	-	-	-	-	+
Kanlı agarda hemoliz	β	β	β	β	γ
Üre kullanımı	-	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	-	-	-	-	-
Nitrat	+	+	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-
Fruktoz	+	+	+	+	+
Arabinoz	+	+	+	+	-
Mannitol	+	+	+	+	+
Mannoz	-	+	+	+	+
Ksiloz	-	-	-	-	+
Laktoz	-	-	-	-	+
4 °C	Z	Z	Z	-	-
37 °C	+	+	+	+	+
40 °C	Z	Z	Z	Z	-
% 0	-	-	-	-	-
% 3	+	+	+	+	+
% 5	+	+	+	+	+
% 8	-	-	-	-	-
% 10	-	-	-	-	-
API 20E profili	3247526	3247526	3247526	3047127	2000024
İdentifikasyon	*V. anguillarum*	*V. anguillarum*	*V. anguillarum*	*V. anguillarum*	*V. scophthalmi*

F: Fermentatif, O: Oksidatif, +: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, Z: zayıf, β: beta-hemoliz γ: Gama hemoliz

Tablo 4.2: Hasta Çipura Balıklarından Elde Edilen 6-10 Numaralı Bakteri İzolatlarının Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolat numarası	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
İşletme numarası	2	2	3	3	3
Örnekleme tarihi	Mayıs 2010	Mayıs 2010	Mayıs 2010	Mayıs 2010	Mayıs 2010
Balık numarası	2-1	2-2	3-1	3-3	3-3
Örneğin ağırlığı	80 g	80 g	10 g	10 g	10 g
Organ	Böbrek	Kalp	Böbrek	Dalak	Dalak
Gram	-	-	-	-	-
Morfoloji	Basil	Pleimorfik	Basil	Basil	Basil
Hareket	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+
O/129 – 150 µg	Hassas	Hassas	Hassas	Hassas	Hassas
TCBS'de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Yeşil	Sarı
VAM besiyerinde üreme	-	-	-	Sarı	Yeşil
Arjinin dihidroliz	+	-	+	-	+
Lizin dekarboksilaz	-	+	-	+	-
Ornitin dekarboksilaz	-	+	-	+	+
İndol	-	+	-	+	-
MR	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	+
ONPG	-	-	-	+	+
Jelatinaz	-	-	-	-	+
Amilaz	-	-	-	-	+
Lipaz	-	-	-	-	-
Eskulin	+	Z	+	+	-
Kanlı agarda hemoliz	γ	β	γ	β	β
Üre kullanımı	-	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	-	-	-	+	+
Nitrat	+	-	+	+	+
H_2S	-	-	-	-	-
Fruktoz	+	-	+	+	+
Arabinoz	-	-	-	-	+
Mannitol	+	+	+	-	+
Mannoz	+	-	+	+	+
Ksiloz	+	+	+	+	-
Laktoz	+	+	+	+	+
4 °C	-	-	-	-	-
37 °C	+	+	+	-	+
40 °C	-	+	-	-	Z
% 0	-	-	-	-	-
% 3	+	+	+	+	+
% 5	+	+	+	+	+
% 8	-	-	-	-	-
% 10	-	-	-	-	-
API profili	2000024	4356525	2000124	5764105	3267126
İdentifikasyon	*V. scophthalmi*	*V. harveyi*	*V. scophthalmi*	*V. logei*	*V. anguillarum*

F: Fermentatif, O: Oksidatif, +: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, Z: zayıf,
β: beta-hemoliz γ: gama hemoliz

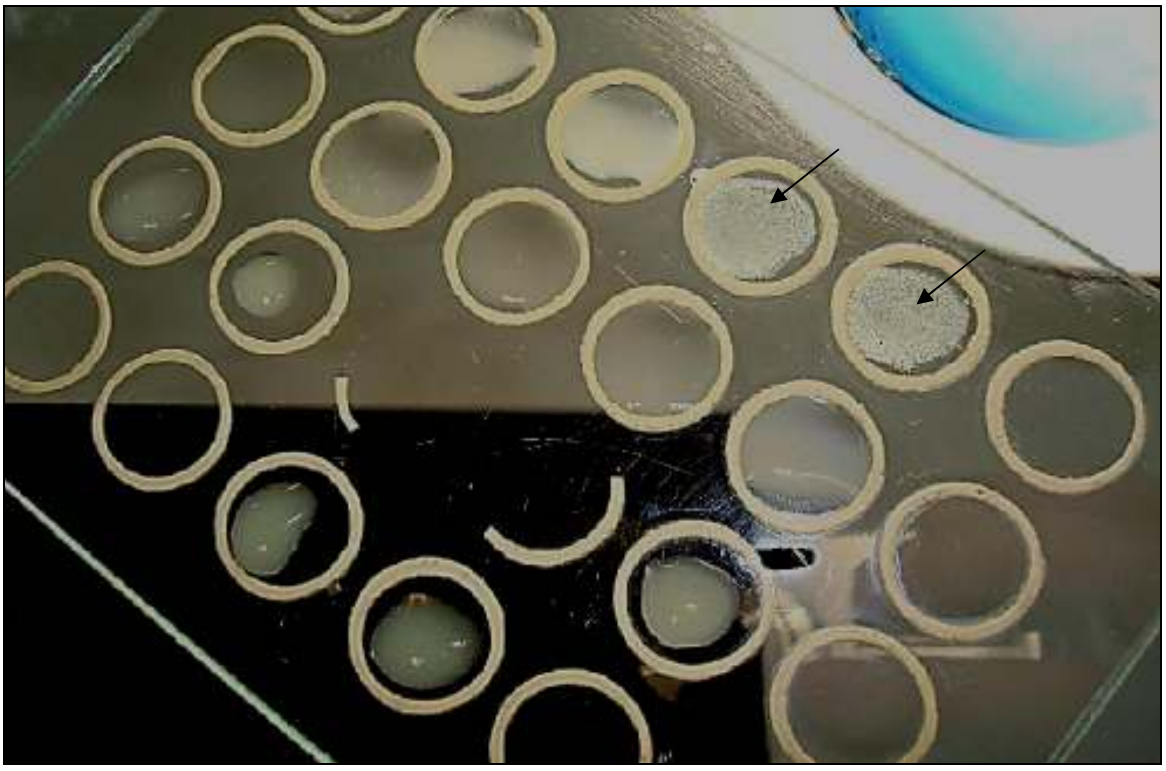
Tablo 4.3: Hasta Çipura Balıklarından Elde Edilen 11-15 Numaralı Bakteri İzolatlarının Fiziksel ve Biyokimyasal Özellikleri

İzolat numarası	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
İşletme numarası	3	4	4	4	5
Örnekleme tarihi	Mayıs 2010	Mayıs 2010	Mayıs 2010	Mayıs 2010	Temmuz 2009
Balık numarası	3-4	4-2	4-1	4-4	5-1
Örneğin ağırlığı	10 g	3 g	3 g	3 g	130 g
Organ	Kan	Dalak	Böbrek	Böbrek	Böbrek
Gram	-	-	+	+	-
Morfoloji	Basil	Basil	Üzüm salkımı	Tetrad	Basil
Hareket	+	+	-	-	+
O/F	O	F	F	O	O
Sitokrom oksidaz	+	+	-	-	+
Katalaz	+	+	+	+	+
O/129 – 150 µg	Dirençli	Hassas	Dirençli	Dirençli	Dirençli
TCBS'de üreme	-	Sarı	-	-	-
VAM besiyerinde üreme	-	Yeşil	-	-	-
Arjinin dihidroliz	-	+	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	-	+	+	-
İndol	-	+	-	-	-
MR	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	-	+
ONPG	-	+	-	-	-
Jelatinaz	+	+	-	-	-
Amilaz	-	-	-	-	-
Lipaz	-	-	-	-	-
Eskulin	-	+	-	-	-
Kanlı agarda hemoliz	α	β	α	α	β
Üre kullanımı	-	-	+	-	-
Sitrat kullanımı	+	+	-	-	-
Nitrat	+	-	+	-	+
H_2S		-	-	+	-
Fruktoz	-	+	-	-	+
Arabinoz	-	+	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Mannoz	-	+	-	-	-
Ksiloz	-	-	-	-	-
Laktoz	-	+	-	-	-
4 °C	Z	-	-	-	+
37 °C	+	+	+	+	-
40 °C	-	Z	+	+	-
% 0	-	-	+	+	+
% 3	+	+	+	+	+
% 5	+	+	+	+	+
% 8	-	-	-	Z	Z
% 10	-	-	-	-	-
API profili	0200004	3267126	Yapılmadı	Yapılmadı	2200004
İdentifikasyon	*P. stutzeri*	*V. anguillarum*	*Staphylococcus sp.*	*Micrococcus luteus*	*P. anguilliseptica*

F: Fermentatif, O: Oksidatif, +: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, Z: zayıf,
β: beta-hemoliz α: alfa hemoliz

4.3 LAM AGLÜTİNASYON TESTİ BULGULARI

Çalışmada sadece konvansiyonel bakteriyolojik metotlar ve hızlı tanı kiti sonuçlarına göre *V. anguillarum* olarak identifiye edilen bakteri izolatlarının bazılarının serotipinin tespit edilmesi için lam aglütinasyon testi gerçekleştirilmiştir. Diğer izolatlara karşı antikor temin edilemediğinden bu test diğer bakteri izolatlarına uygulanamamıştır. Gerçekleştirilen lam aglütinasyon testleri sonucunda, 1, 2 ve 3 numaralı izolatlardan hazırlanan O-antijenlerin, bu türün O1 serotipine karşı deney tavşanlarında geliştirilen antikor ile kısa zamanda ve kuvvetli bir şekilde çökelme oluşturdukları tespit edilmiştir. Bu türün O1 serotipine ait referans bakteri suşundan hazırlanan O-antijenlerin aynı antikor ile kuvvetli çökelme gerçekleştirmesi ile serotip teşhisi doğrulanmıştır (Şekil 4.18). *V. anguillarum* olarak identifiye edilen 4 numaralı izolattan hazırlanan O-antijenler ise türün O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilen serumları ile hiçbir tepkimeye girmemiştir. Bu nedenle bu izolatın serotipi belirlenememiştir.

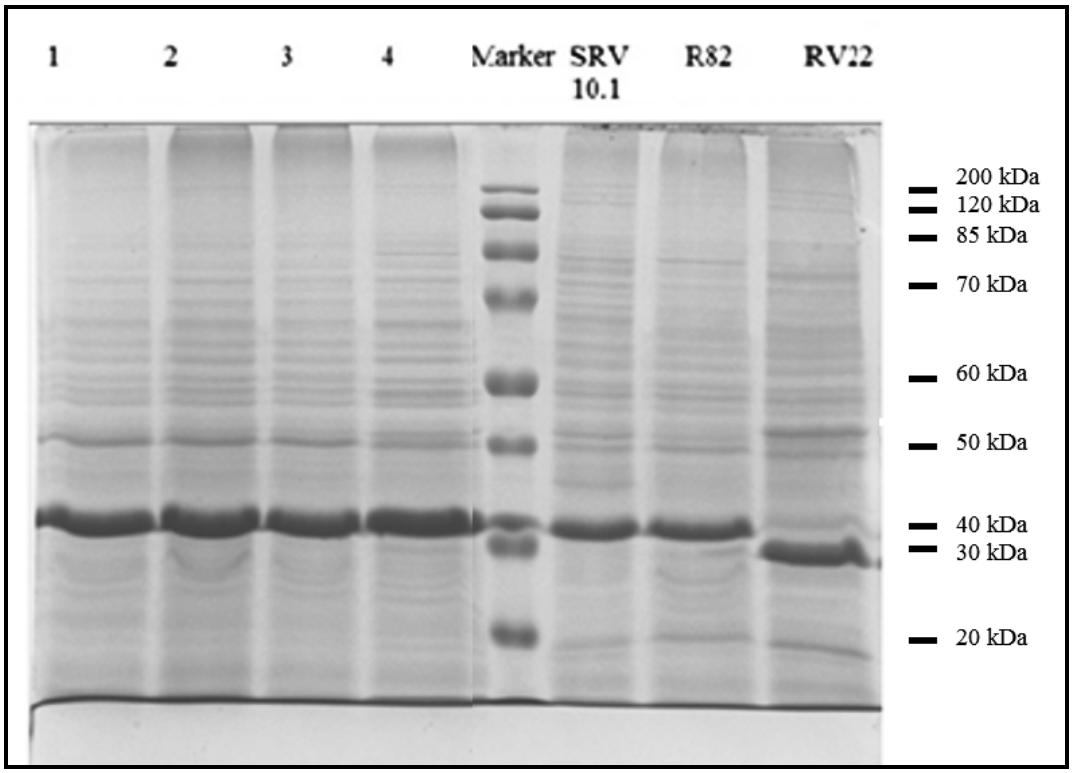


Şekil 4.18: Lam aglütinasyon testinin floresan ışık altında incelenmesi ve çökelme oluşumu (okla gösterilmiştir)

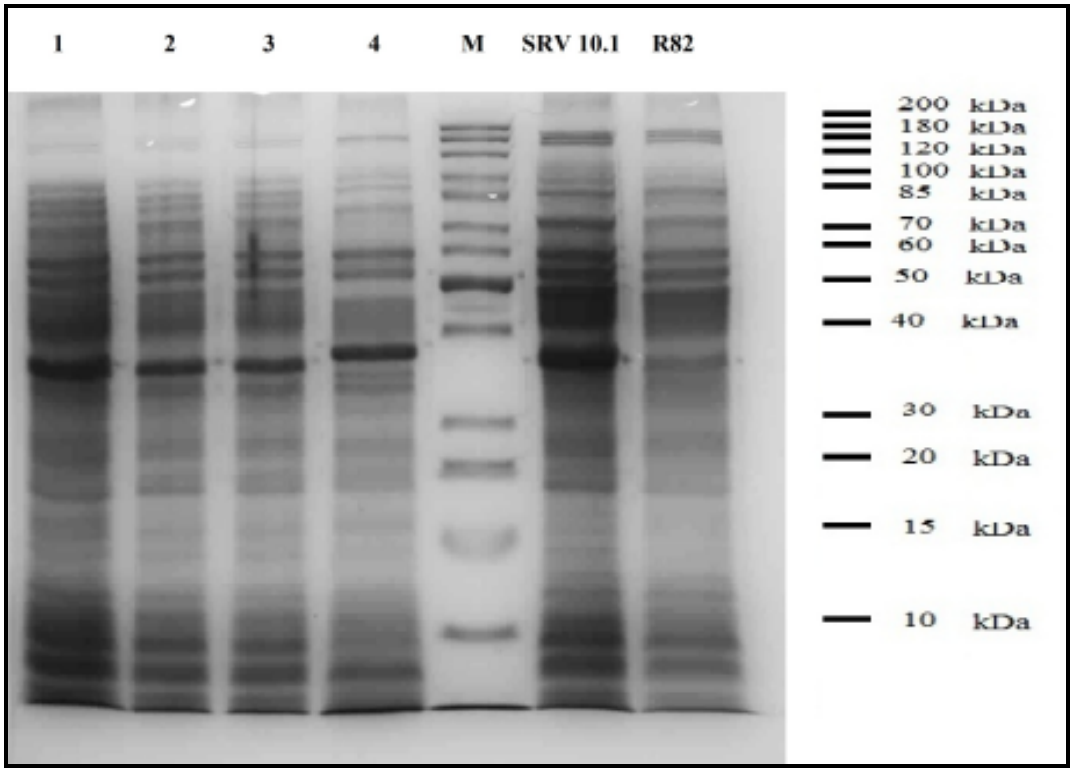
4.4 BAKTERİ PROTEİNLERİNİN SDS-PAGE ANALİZİ BULGULARI

SDS-PAGE analizlerinde her bir elektroforez denemesinde sekiz veya dokuz protein örneği ile birlikte bir kuyucuğa da molekül ağırlığı bilinen standart protein karışımı eklenmiştir.

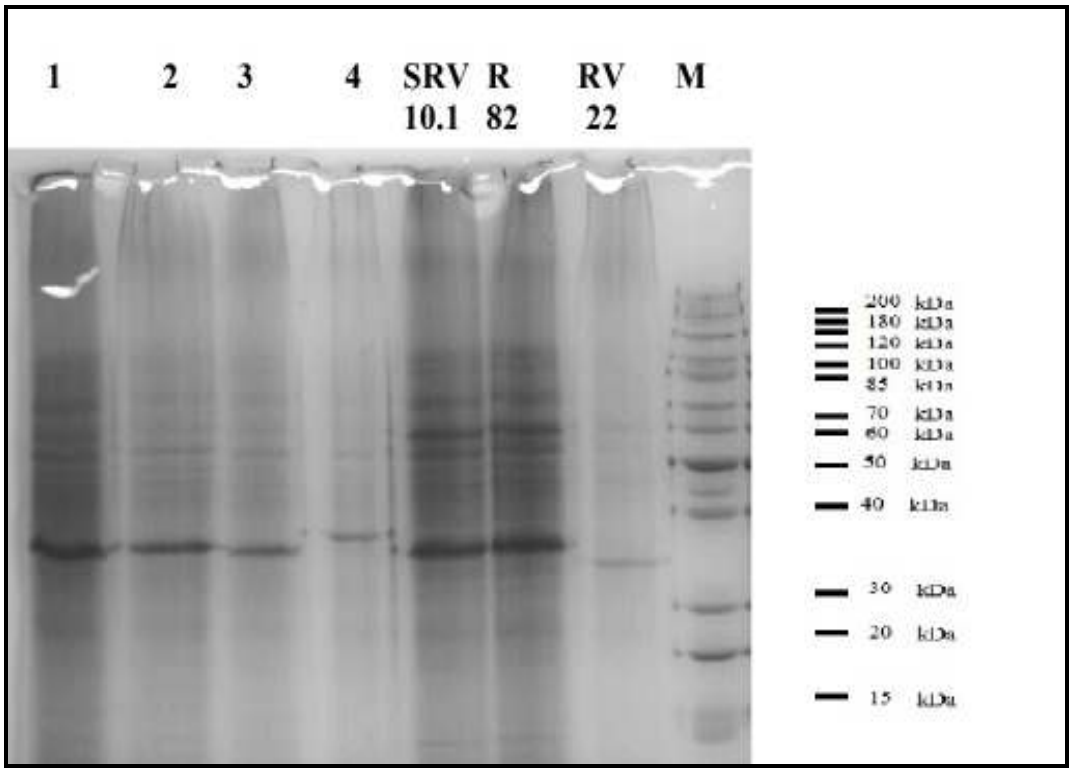
Birinci grupta, *V. anguillarum* olarak identifiye edilen beş adet izolat ile birlikte bu çalışmada referans olarak kullanılan *V. anguillarum* serotip O1 ve *V. anguillarum* serotip O2 suşları karşılaştırma amacıyla elektroforeze tabi tutulmuştur. *V. anguillarum* olarak identifiye edilen izolatların elektroforetik analizinde, serotip O1 olarak identifiye edilen 1, 2 ve 3 numaralı izolatların benzer protein profiline sahip oldukları, rutin laboratuar metoduyla gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunda bütün hücre protein analizinde (Şekil 4.19) bu türe özgü temel dış membran proteininin ağırlığının ise 41 kDa olduğu tespit edilmiştir. Aynı protein profili bu türün O1 serotipine ait referans suşlardan da elde edilmiştir. Biyokimyasal testler ve API 20E kiti ile *V. anguillarum* olarak identifiye edilen fakat lam aglütinasyon testinde serotipi belirlenemeyen 4 numaralı izolatta da benzer profil elde edilmiştir. Türe özgü temel dış membran proteininin ağırlığı yine 41 kDa olarak tespit edilmiştir. Aynı türün O2 serotipine ait referans suşta ise farklı olarak temel dış membran proteinin ağırlığının 38 kDa olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca serotip ayrımı olmaksızın bazı protein bantlarının ortak olduğu görülmüştür. *V. anguillarum* olarak identifiye edilen bakteri izolatlarına ait protein profillerinin belirlenmesinde protein kiti de kullanılmıştır ve bütün hücre proteinleri profiline benzer profiller tespit edilmiştir (Şekil 4.20). Aynı grubun dış membran proteinlerinin elektroforetik analizinde ise, daha az sayıda bant oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.19: Çalışmada izole edilen *V. anguillarum* izolatları ve referans bakteri suşlarının rutin laboratuar yöntemiyle elde edilen bütün hücre proteini analizi (1, 2, 3 4: *V. anguillarum*; SRV 10.1*: V. anguillarum* serotip O1, R82: *V. anguillarum* serotip O1 RV 22: *V. anguillarum* serotip O2)

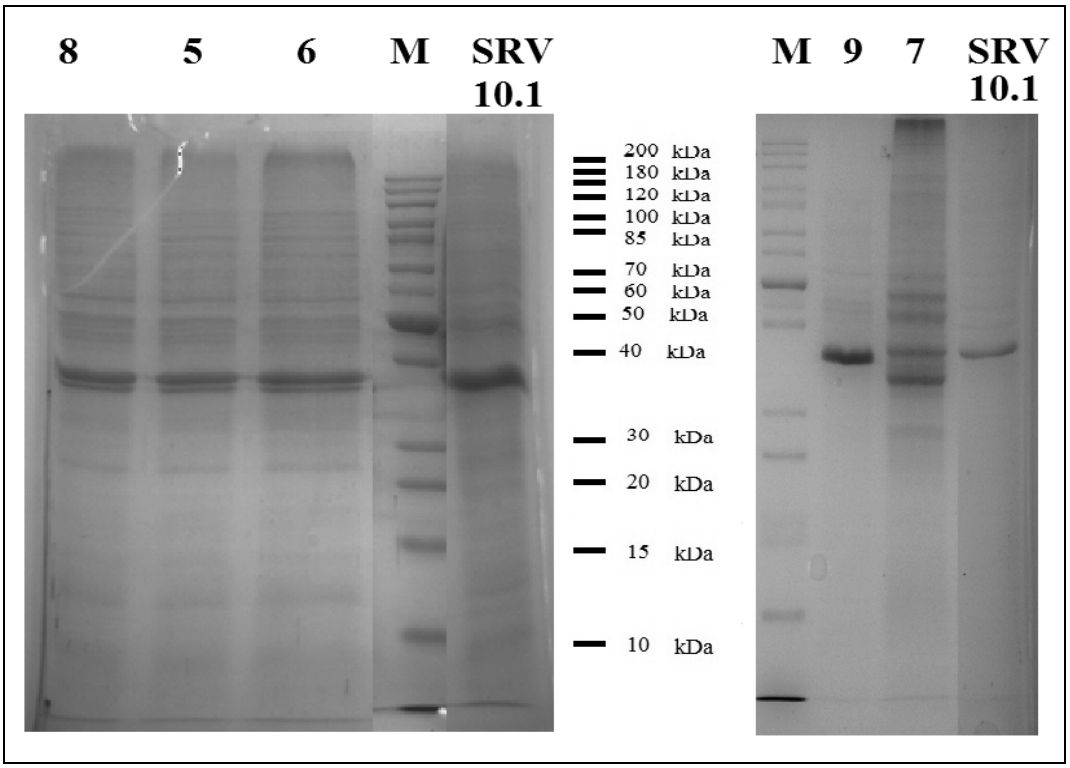


Şeklil 4.20: Çalışmada izole edilen *V. anguillarum* izolatları ve referans bakteri suşlarının protein saflaştırma kiti kullanılarak elde edilen bütün hücre proteini analizi (1, 2, 3 4: *V. anguillarum*; SRV 10.1*: V. anguillarum* serotip O1, R82: *V. anguillarum* serotip O1)



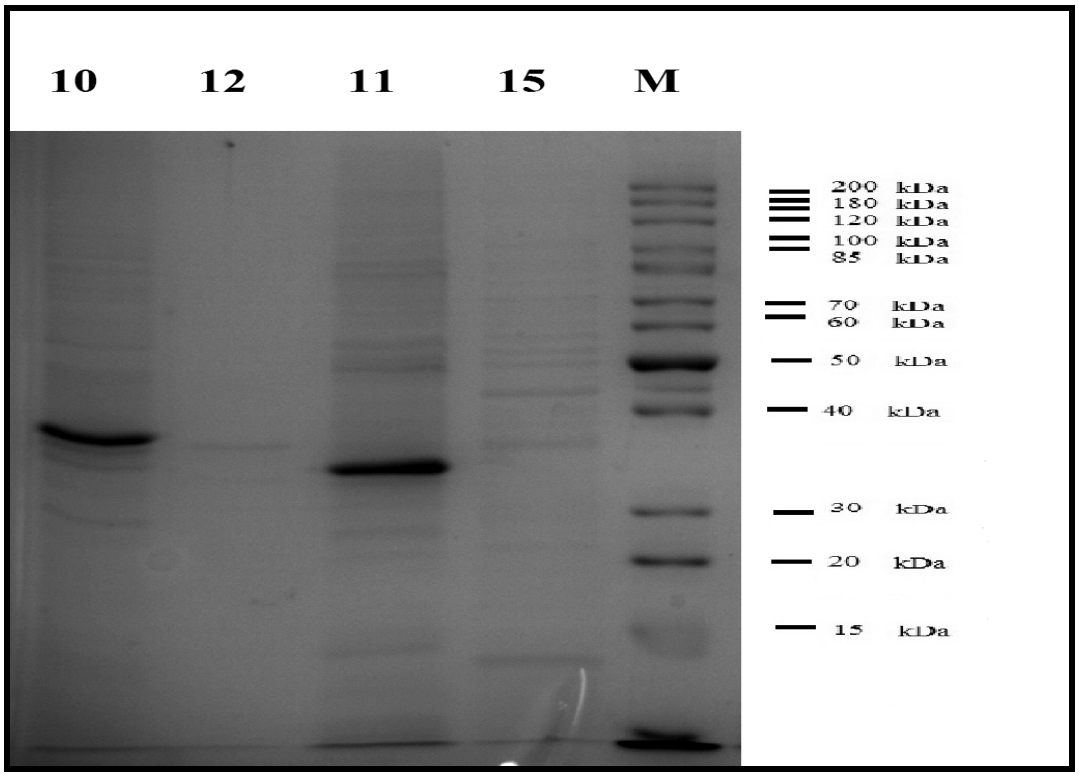
Şekil 4.21: Çalışmada izole edilen *V. anguillarum* izolatları ve referans bakteri suşlarının rutin laboratuar yöntemiyle elde edilen dış membran proteini analizi
(1, 2, 3 4: *V. anguillarum*; SRV 10.1*: V. anguillarum* serotip O1, R82: *V. anguillarum* serotip O1 RV 22: *V. anguillarum* serotip O2)

V. scophthalmi olarak identifiye edilen 5, 6 ve 8 numaralı izolatların dış membran proteinlerinin analizinde tamamen benzer bir profil oluşturduğu ve bu izolatların yakşlaşık 38 ve 37 kDa'lık iki temel dış membran proteinine sahip oldukları tespit edilmiştir. *V. harveyi* olarak identifiye edilen 7 numaralı izolatın 48, 38 ve 34 kDa'lık 3 adet dış membran proteinine sahip olduğu görülmüştür. *V. logei* olarak identifiye edilen 9 numaralı izolatın yaklaşık 38 kDa'lık tek bir temel dış membran proteinine sahip olduğu ve referans *V. anguillarum* suşu ile benzer bir protein profili oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.22).



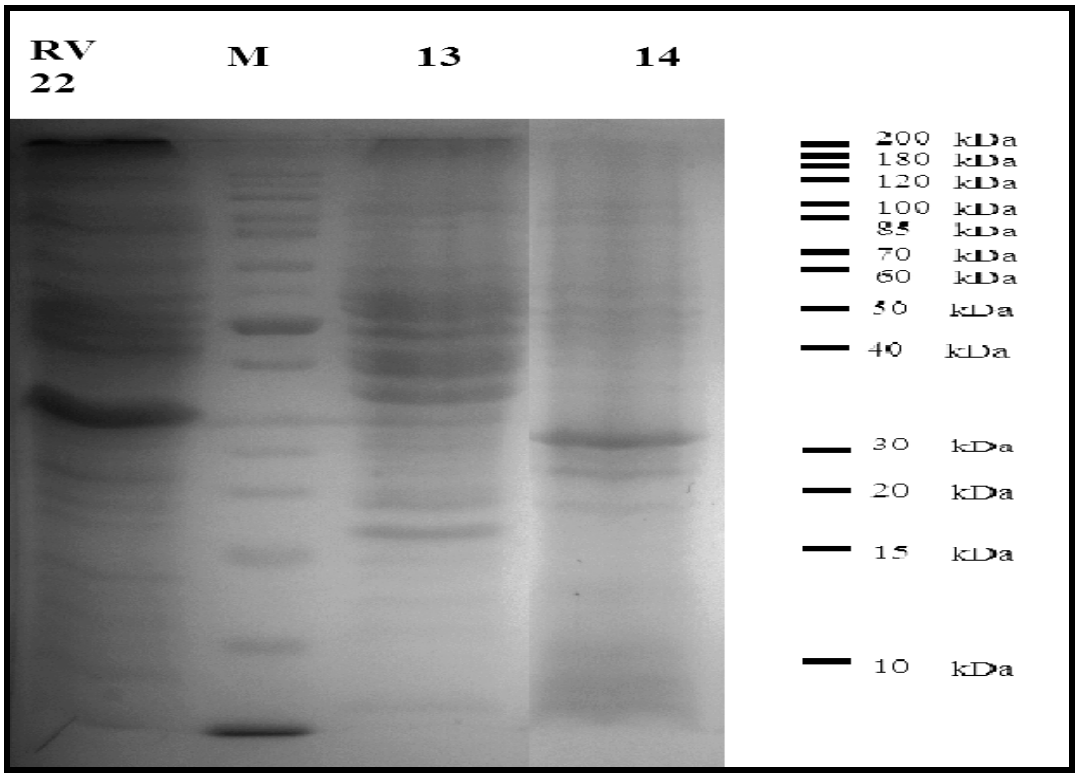
Şekil 4.22: Hasta kültür çipura balıklarından izole edilen 5-9 numaralı izolatların rutin yöntem ile elde edilen dış membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi
(8, 5, 6: *V. scophthalmi*, 9: *V. logei*, 7: *V. harveyi*, SRV 10.1: *V. anguillarum* serotip O1)

V. anguillarum olarak identifiye edilen 10 ve 12 numaralı izolatların yaklaşık 38 kDa'lık temel dış membran proteinine sahip olduğu, 10 numaralı izolatın farklı olarak 30-55 kDa arasında protein bantları oluşturduğu tespit edilmiştir. *P. stutzeri* olarak identifiye edilen 11 numaralı izolatın yaklaşık 35 kDa'lık bir temel dış membran proteinine sahip olduğu fakat 50-60 kDa aralığındaki proteinleri de hücre zarında bulundurduğu tespit edilmiştir. *P. anguilliseptica* olarak identifiye edilen 15 numaralı izolatın protein profili incelendiğinde ise yaklaşık 40 ve 42 kDa'lık iki dış membran proteini tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra 36, 30 ve 20 kDa'lık proteinler de tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Hasta kültür çipura balıklarından elde edilen 10, 11, 12 ve 15 numaralı izolatların dış membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi
(10: *V. anguillarum* 12: *V. anguillarum* 11: *P. stutzeri*, 15: *P. anguilliseptica*)

Hasta kültür çipura balıklarından izole edilen ve *Staphylococcus* sp. ve *Micrococcus luteus*. olarak identifiye edilen Gram-pozitif karakterdeki bakteri izolatlarının protein profilleri incelendiğinde *Staphylococcus* sp. olarak identifiye edilen 13 numaralı izolatın yaklaşık 17-58 kDa aralığındaki membran proteinlerine sahip olduğu görülmüştür. *Micrococcus luteus* olarak identifiye edilen 14 numaralı izolatın ise yaklaşık 32 kDa'lık temel bir membran proteinine sahip olduğu ve bunun yanı sıra yaklaşık 23-60 kDa aralığındaki proteinleri de hücre zarında bulundurduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.24: Hasta kültür çipura balıklarından izole edilen Gram-pozitif karakterdeki bakteri izolatlarının membran proteinlerinin SDS-PAGE analizi
(13: *Staphylococcus* sp. 14: *Micrococcus luteus* RV 22: *V. anguillarum* serotip O2)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çipura balığı yetiştiriciliğinde üretimi kısıtlayan en önemli faktörlerden biri hastalık problemleridir. Yetiştiricilik ortamlarında balıkların yoğun olması ve hastalık etkenlerinin su ortamında bir balıktan diğer balığa çok kolay yayılma riski taşımasından dolayı balık hastalıklarının tanısı ve kontrolü çok önemlidir (Joosten ve diğ., 1995). Bazı bakteriler çoğalmaları için uygun koşullar bulduklarında problemlere yol açarlar ve bu nedenle zorunlu patojenlerle fırsatçı patojenleri ayrımak zordur. Mevsimsel baskınlık gösteren bakteriler çipura için fırsatçı patojen olarak rapor edilmiştir (Pujalte ve diğ., 2003).

Nisan 2009–Temmuz 2010 tarihleri arasında Türkiye'nin Ege bölgesindeki 5 adet çipura balığı işletmesinden temin edilen, ağırlıkları 3-130 g arasında değişen ve çeşitli hastalık belirtileri gösteren ve bu araştırmada kulanılan kültür çipura balığı örneklerinde diğer araştırıcıların bildirdiği gibi karında şişkinlik, renkte solgunluk, alt çenede erime, küçük ve kanamalı lezyonlar, yüzgeç diplerinde hemorajiler, büyük balıklarda deride pul kaybı ve kaslara kadar inebilen lezyonlar ve iç organlarda karaciğerde solgunluk, böbreklerde erime gibi klinik ve otopsi bulguları gözlemlenmiştir. İncelenen hasta çipura balıkların vücut üzerinde görülen hemorajiler, karında şişkinlik, renkte solgunluk ve iç bakıda organlarda erime ve hemoraji gibi semptomlar bakteriyel hastalıklarda görülen ve birçok araştırıcı tarafından bildirilen klinik bulgulara benzerlik göstermiştir (Timur ve Timur, 2003; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007; Noga, 2010).

Çalışmada incelenen hasta balık örneklerinin tümünden yoğun şekilde ve bazı olgulardan birden fazla türde bakteri izole ve identifiye edilerek, Ege bölgesinde yetiştiriciliği yapılan hasta çipura balıklarında karma enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Hasta kültür çipura balığı örneklerinden balık patojeni olan toplam 15 adet bakteri izolatı identifiye edildikten sonra çalışmaya dahil edilmiş protein profilleri belirlenmiştir. İncelenen bütün balık örneklerinden baskın olarak *Vibrio* genusuna ait

bakteri türleri izole ve identifiye edilmiştir. Balebona ve diğ. (1998), Zorilla ve diğ. (2003a) ve Akaylı ve diğ. (2009) kültür çipura balıklarının hastalık olgularından %90-93 oranında Gram-negatif karaktede bakteri izole etmişlerdir. Aynı araştırıcılar Gram-negatif bakterilerin de yaklaşık %70'inin *Vibrio* genusu bireyleri olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da hasta balık örneklerinden 13 tane Gram-negatif ve 2 tane Gram-pozitif karakterde bakteri izole edilmiştir. Yine daha önceki raporlara benzer şekilde Gram-negatif karakterdeki 13 izolattan 11 tanesi *Vibrio* genusuna ait izolatlar olarak identifiye edilmiştir. İzole edilen bakterilerin ve özellikle *Vibrio* genusu üyelerinin çipura balıklarının temel patojenleri olduğu bu çalışma ile bir kez daha konfirme edilmiştir.

Vibrio genusu bakteriler birçok akuatik organizmayı enfekte edebildiğinden dolayı akuakültürdeki en önemli bakteri grubunu oluşturmaktadır. Yüksek biyokimyasal dağılım nedeniyle vibrioların fenotipik karakterizasyonu oldukça zordur ve yeni *Vibrio* türlerinin tanımlanması nedeniyle Vibrionaceae familyasının taksonomisi sürekli olarak değişmektedir (Alsina ve Blanch, 1994; Vanderberghe ve diğ., 2003).

Çalışmada incelenen 1, 2, 3, 4, 10 ve 12 numaralı izolatların biyokimyasal özellikleri Buller (2004), Austin ve Austin (2007) ile Noguerola ve Blanch (2008) tarafından *V. anguillarum* için bildirilen biyokimyasal test sonuçları sitrat kullanımı dışında paralellik göstermiştir. Çalışmada izole edilen bakterilerin rutin yöntemde Simon's sitrat agar besiyerinde sitratı karbon kaynağı olarak kullanmadıkları görülmüştür. Bu türün sitrat kullanımında farklı sonuçlar Buller (2004) ve Demircan ve Candan (2006) tarafından da bildirilmiştir.

V. anguillarum, başlangıçta Avrupa ülkelerindeki balıklarda hastalık oluşturmuş, ardından dünyanın diğer bölgelerine taşınarak 48 tür balıktan hastalık etkeni olarak izole edilmiştir (Austin ve Austin, 2007). Deniz balıklarının yanı sıra, kültür gökkuşağı alabalığı gibi tatlısu ortamlarındaki balıklarda da hastalık oluşturduğuna dair kanıtlar olması nedeniyle (Tanrıkul, 2007) akuakültürde oldukça yaygın bir problem olarak kabul edilmektedir. *V. anguillarum* akuatik çevrenin normal florasının bir parçasıdır ve sayıları rotiferlerin varlığına bağlı olarak yaz mevsiminde artarken, kış mevsiminde minimal düzeylere düşer (Austin ve Austin, 2007). *V. anguillarum* Türkiye'de kültür

Atlantik salmonlarından, (Candan, 2000), çipura balıklarından (Candan, 1993a), gökkuşağı alabalıklarından (Tanrıkul, 2007), kırmızı mercan balıklarından (Korun ve Gökoğlu, 2007) ve levrek balıklarından (Timur ve diğ., 2005; Demircan ve Candan, 2006; Korun ve Timur, 2008) izole edilmiştir.

Çalışma kapsamında, balıklarda yaygın bir şekilde ölümlere ve balık yetiştiriciliğinde büyük kayıplara neden olan *V. anguillarum*'un tanısı için Alsina ve diğ. (1994) tarafından geliştirilen *Vibrio anguillarum* Medium besiyeri bakteriyolojik teşhiste kullanılmıştır. Çalışmada hasta kültür çipura balıklarından izole edilen *V. anguillarum* izolatları bu vasat üzerinde bu araştırıcıların bildirdiği gibi diğer *Vibrio* türü izolatlarının aksine etrafında hareler bulunan sarı renkli koloniler oluşturmuştur. Bunun yanı sıra sorbitolden asit üretemeyen 10 ve 12 numaralı *V. anguillarum* izolatları bu besi üzerinde üremiş fakat yeşil renkli koloniler oluşturmuştur.

Günümüzde bakteriyel balık patojenlerinin teşhisinde konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra API 20E gibi hızlı tanı kitleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. *V. anguillarum* için birçok araştırıcı tarafından, bu türün kit içerisindeki testlerde değişken sonuçlar verdiği ve farklı API 20E profilleri oluşturduğu rapor edilmiştir (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007). Buller (2004) tarafından bu organizmaya ait 21 farklı API 20E profili olduğunu bildirmiştir. Bu türün API 20E profilleri incelendiğinde, sitrat kullanımı gibi bazı test sonuçlarının değişken olabileceği fakat ONPG ve arjinin dihidrolizi gibi bazı testlerin bütün profillerde benzer olduğu görülmektedir. Bu çalışmada farklı işletmelerden temin edilen hasta balık örneklerinden izole edilen ve *V. anguillarum* olarak identifiye edilen 6 adet izolatın 3 farklı API 20E profili oluşturdukları; ONPG, arjinin dihidrolizi, jelatinaz aktivitesi, sukrozdan asit üretimi gibi bazı testlerde hepsinin pozitif sonuç verdiği; hepsinin lizin ve ornitin dekarboksilasyonu, üre kullanımı, inositolden asit üretimi gibi testlerde negatif ve sitrat kullanımı ile sorbitolden asit üretimi gibi testlerde farklı sonuçlar verdiği görülmüştür.

V. anguillarum'un teşhisi, rutin biyokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Fakat bununla birlikte serotipe özgü poliklonal serumların kullanıldığı serolojik testlerle konfirmasyon da gereklidir. Her ne kadar vibriosisin hızlı tanısını sağlayan lam aglütinasyon veya ELISA tekniklerini içeren ticari tanı kitleri geliştirilmiş olsa bile, bu

kitler bakterilerin serotipin belirlenmesinde yeterli olmamaktadır (Romalde ve ark., 1995). Avrupa serotiplendirme sistemine göre (Sorensen ve Larsen, 1986; Pedersen ve ark., 1999) *V. anguillarum*'un 23 farklı serotipi bulunmaktadır. Dünya çapında kültür ve doğadaki balıklardaki hastalık olgularından bu türün O1, O2 (Sorensen ve Larsen, 1986) ve az miktarda da olsa O3 ve 04 (Myhr ve diğ., 1991; Santos ve diğ, 1995) serotipleri identifiye edilmiştir ve balıklarda ölümlere neden olduğu bildirilmiştir. Diğer serotipler ise çevresel suşlar olarak kabul edilmektedir ve çok nadiren balıklarda vibriosise olgularından izole edilmiştir ve (Sorensen ve Larsen, 1986; Toranzo ve ark. 2005). Bu çalışmada da *V. anguillarum* olarak identifiye edilen izolatlardan 3 tanesinin, lam aglütinasyon testleri sonucunda türün O1 serotipine ait oldukları tespit edilmiştir. Bu türün O1 serotipi Türkiye'de kültür gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir (Tanrıkul, 2007). *V. anguillarum* olarak identifiye edilen 4 numaralı izolat ise türün O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı deney tavşanlarında üretilen antikorla karşı çökelme oluşturmadığından serotipi belirlenememiştir. *V. anguillarum* olarak identifiye edilen 10 ve 12 numaralı izolatlara ise lam aglütinasyon testi gerçekleştirilmemiştir.

Çalışmada hasta kültür çipura balıklarından izole edilen arjinin test sonucu pozitif, lizin ve ornitrin test sonucu negatif, indol, MR ve VP test sonuçları negatif, jelatini ve nişastayı hidrolize edemeyen ve arabinozdan asit üretemeyen 5, 6 ve 8 numaralı izolatlar Cerda-Cuellar ve diğ. (1997), Buller (2004), Austin ve Austin (2007) ve Noguerola ve Blanch (2008) tarafından bildirilen sonuçlara göre *V. scophthalmi* olarak identifiye edilmiştir. Bu araştırıcılar tarafından bu organizmanın mannitolden asit üretemediği rapor edilmiştir. Fakat Cerda-Cuellar ve Blanch (2004) tarafından bu türün mannitolden asit üretebilen suşlarının varlığı tespit edilmiştir. Bu organizma kalkan balığı yetiştiriciliği yapılan tank suyundan izole edilmiş (Farto ve diğ., 1999) ve kalkan balıklarının barsak florasının baskın türlerinden biri olduğu tespit edilmiştir (Cerda-Cuellar ve Blanch, 2004). Fakat bu türün patojenik olmadığı rapor edilmiştir (Cerda-Cuellar ve diğ. 1997).

Çalışmada hasta kültür çipura balıklarından izole edilen, arjinin dihidrolizi, üre ve sitrat kullanımı ile ONPG test sonucu negatif olan ve arabinozdan asit üretemeyen ve lizin ve ornitin dekarboksilasyonu gerçekleştirebilen, %3 ve %5 tuzlulukta ve 35 °C'de üreyebilen fakat %0 tuzlulukta, %8 tuzlulukta ve 4 °C'de üreyemeyen 7 numaralı izolat

Noguerola ve Blanch (2008), Austin ve Austin (2007) ve Buller (2004) tarafından *V. harveyi* için bildirilen biyokimyasal özelliklerle mannozdan asit üretimi dışında benzerlik göstermektedir. Bu izolatın API 20E profilinin, Buller (2004) tarafından bildirilen *V. harveyi*'nin oluşturduğu profile büyük oranda benzemesine rağmen jelatinaz ve sorbitolden asit üretimi farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu organizma daha önce Balebona ve diğ. (1998) ve Zorrilla ve diğ. (2003a) tarafından kültür çipura balıklarının hastalık olgularından izole edilmiştir. Ülkemizde ise kültür levrek balıklarının karma hastalık olgularından izole edilmiş (Korun ve Akaylı, 2004; Korun ve Timur, 2008) fakat çipura balıklarının hastalık olgularından ilk kez bu çalışma ile identifiye edilmiştir.

Çalışmada kültür çipura balıklarından izole edilen arjinin, MR, jelatinaz ve amilaz test sonuçları negatif, lizin, ornitin, indol ve VP test sonuçları pozitif, eskulini hidrolize edebilen, kanlı agarda β-hemoliz yapan, üre ve sitratı kullanamayan 9 numaralı izolat, Buller (2004), Austin ve Austin (2007) ile Noguerola ve Blanch (2008) tarafından *V. logei* için bildirilen biyokimyasal özelliklere indol test sonucu dışında benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu izolatın Buller (2004) tarafından bildirilen test sonucunun aksine kanlı agarda β-hemoliz yaptığı gözlemlenmiştir. Benediksdottir ve diğ., (1998) referans *V. logei* suşları ile hasta balık örneklerinden izole edilen suşların biyokimyasal test sonuçları arasında farklılıklar olabileceğini bildirmiştir. Bu organizma daha önce Benediksdottir ve diğ. (1998) tarafından kültür Atlantik salmon balıklarının hastalık olgularından izole edilmiştir. Ülkemizde ise ilk kez bu çalışma ile *V. anguillarum* ile enfekte kültür çipura balıklarının karma hastalık olgularından izole ve identifiye edilmiştir.

Çalışmada hasta kültür çipura balıklarından izole edilen Oksidatif, hareketli, sitokromoksidaz ve katalaz test sonuçları pozitif, TCBS besiyerinde üremeyen ve O/129 (150 µg)'a karşı dirençli olan 11 ve 15 numaralı izolatların *Pseudomonas* genusuna ait olduğu anlaşılmıştır. Arjinin, lizin, ornitin, indol, MR, VP gibi birçok test sonucu negatif olan fakat jelatini hidrolize edebilen, sitratı kullanabilen, nitratları indirgeyebilen, 40 °C'de ve %8 tuzlulukta üreyemeyen 11 numaralı izolat Buller (2004), Lalucat ve diğ., (2006) ve Austin ve Austin (2007) tarafından bildirilen sonuçlara göre *P. stutzeri* olarak identifiye edilmiştir. Bu organizma daha önce

Akinbowale ve diğ. (2007) tarafından kültür gökkuşağı alabalıklarından izole edilmiştir. Farto ve diğ. (2003) ise bu organizmayı ahtapotlardan izole etmiştir. Atıksu, tatlısu, toprak ve denizel ortamlarda bulunan (Rosselo ve diğ., 1991; Sikorski ve diğ., 2002) bu organizma, Matyar ve diğ. (2010) tarafından Türkiye'de İskenderun Körfezi'nde gerçekleştirdikleri çalışmada deniz suyunda en baskın *Pseudomonas* türü olarak rapor edilmiştir. Bu organizma kültür çipura balıklarının karma hastalık olgularından ilk defa bu çalışma ile identifiye edilmiştir.

Hasta balık örneğinin böbreğinden izole edilen 15 numaralı izolat, biyokimyasal özellikleri bakımından Buller (2004), Austin ve Austin (2007) tarafından bildirilen sonuçlarla karşılaştırılarak *P. anguilliseptica* olarak identifiye edilmiştir. Bu tür, yılan balıklarının yanı sıra ayu ve sazan gibi balık türlerini de etkilemektedir (Muroga ve diğ., 1975). Bu patojenin gökkuşağı alabalıklarına karşı patojenitesinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Lönnström ve diğ., 1994). 1990'ların ortalarından itibaren bu patojenin çipura balıklarında kış hastalığı sendromuna yol açtığına dair raporlar yayınlanmıştır (Berthe ve diğ., 1995; Domenech ve diğ., 1997; Domenech ve diğ., 1999). Türkiye'de ise *P. anguilliseptica* nadir olarak çipura balıklarının hastalık olgularından izole edilmektedir (Çağırgan, 2009). Bu araştırıcılar tarafından çipura balıklarında *P. anguillispetica* enfeksiyonları sırasında böbreklerde hemorajiler, yumuşama ve erime, karaciğerde solgunluk ve bağırsaklarda sarı renkli sıvı birikimi olabileceği rapor edilmiştir. Bu çalışmada incelenen *P. anguilliseptica* ile enfekte balık örneklerinin, işletme sorumlusundan alınan bilgiye göre balıklar uzun süredir yavaş yüzme, iştahsızlık ve bunların yanı sıra deride kaslara inen ülseratif lezyonlar gibi bir takım hastalık semptomları göstermektedir. Bu nedenle hastalığın kronik formunda olduğu düşünülmektedir. Balık örneklerinde gözlemlenen yoğun miktarda pul kaybı, kaslara kadar inen kanamasız erime bölgelerinin varlığı, iç organların ve özellikle böbreklerin neredeyse tamamen erimiş olması ve peritonal boşlukta kanlı sıvı birikimi bu fikri desteklemektedir.

Bu çalışmada hasta kültür çipura balıklarından Gram-pozitif karakterde bakteriler de izole edilmiştir. Gram-pozitif, hareketsiz, fermentatif, sitokrom oksidaz negatif, katalaz pozitif ve Gram preparatında üzüm salkımı şeklinde görülen 13 numaralı izolat *Staphylococcus* sp. olarak identifiye edilmiştir (Koneman, 1992; Buller, 2004; Austin ve

Austin, 2007). TSA besiyerinde mat sarı renkli koloniler oluşturan, oksidatif, hareketsiz, katalaz test sonucu pozitif ve sitokromoksidaz test sonucu negatif olan ve Gram preparatında 4'lü kümeler halinde görüntü veren 14 numaralı izolat *Micrococcus luteus* olarak identifiye edilmiştir (Kloos ve diğ., 1974; Koneman, 1992; Buller, 2004; Austin ve Austin, 2007). Mikrokoklar, hem genus içerisinde, hem de tür içerisinde koloni rengi, morfolojisi ve sitokrom oksidaz aktivitesi gibi bazı biyokimyasal test sonuçlarında farklılıklar göstermektedir (Kloos ve diğ., 1974). Bu araştırıcıların rapor ettiği sonuçlara göre, bu çalışmada *Micrococcus luteus* olarak identifiye edilen izolat gibi katı besiyeri üzerinde mat sarı koloniler oluşturup sitokrom oksidaz test sonucu negatif olabilen *Micrococcus* türleri mevcuttur.

Gram-pozitif bakteriler genel olarak çipura balıklarının temel patojenleri değildir ve bu balık türünde vibiosis gibi diğer hastalık olgularından fırsatçı patojen olarak identifiye edilmişlerdir (Balebona ve diğ., 1998; Zorilla ve diğ., 2003a; Akaylı ve diğ., 2009). Ülkemizdeki jüvenil kültür çipura balıklarında septisemi ile seyreden bir hastalık olgusunda Kubilay ve Uluköy (2004) tarafından *Staphylococcus epidermidis* tek başına etken olarak identifiye edilmiştir. *Micrococcus* genusuna ait bireyler daha önce İspanya'da Balebona ve diğ. (1998) tarafından diğer hastalık etkenleriyle birlikte kültür çipura balıklarının karma enfeksiyon olgularından izole edilmiştir. Kültür çipura balıklarının ülkemizdeki hastalık olgularından *Micrococcus luteus* bu çalışma ile ilk kez izole ve identifiye edilmiştir.

Hasta kültür çipura balıklarından elde edilen bakteri izolatlarının ve referans bakteri suşlarının protein profilleri incelendiğinde aynı türlerin birbiriyle büyük oranda uyuşan fakat arasında küçük farklılıklar bulunan profillere sahip olduğu görülmüştür. *V. anguillarum* izolatlarının OMP profillerinde heterojeniteye sahip olduğu ve serotipe bağlı olarak farklı protein profillerine sahip olduğu ve temel dış membran proteininin farklı ağırlıklara sahip olduğu bildirilmiştir (Knappskog ve diğ., 1993; Santos ve diğ., 1995). Bu çalışmada *V. anguillarum*'un O1 ve O2 serotiplerine ait referans suşların protein profilleri incelendiğinde O1 serotipinde temel dış membran proteininin ağırlığı 41 kDa olarak tespit edilmiştir. Bu proteinin ağırlığı O2 serotipinde 38 kDa olarak tespit edilmiştir ve bu bulgular Santos ve diğ. (1995) tarafından bildirilen protein profillerine benzerlik göstermektedir. Lam aglütinasyon testi ile *V. anguillarum* serotip O1 olarak

identifiye edilen 1, 2 ve 3 numaralı izolatların, referans *V. anguillarum* serotip O1 suşu ile benzer protein profiline sahip olduğu görülmüştür. Konvansiyonel bakteriyolojik testler sonucunda aynı biyokimyasal ve fenotipik özelliklere sahip olmalarına rağmen farklı işletmelerden izole edilen ve *V. anguillarum* olarak identifiye edilen 10 ve 12 numaralı izolatların, SDS-PAGE analizinde protein profillerinde ufak farklılıklara sahip oldukları görülmüştür. Bu durum farklı coğrafi bölgelerden izole edilen aynı türe ait bakteriler arasında OMP profilleri bakımından farklılıklar bulunabileceği (Pacha ve Kien, 1969; Santos ve diğ., 1995; Zorilla ve ark., 2003b) fikrini desteklemektedir. *V. anguillarum*'un O1 serotipi kendi içinde homojen bir yapıya sahipken; O2 ve O3 serotiplerinde heterojen bir yapı görülmektedir ve bu serotipler 02α, O2β ile O3α ve O3β şeklinde alt gruplara ayrılmıştır (Bolinches ve diğ., 1990). Türün O2 ve O3 serotiplerinin temel dış membran proteinlerinin farklı ağırlıklara sahip olabileceği Santos ve diğ. (1995) tarafından rapor edilmiştir. *V. anguillarum* olarak identifiye edilen 10 ve 12 numaralı izolatların *V. anguillarum*'un O2β serotipine ait olan (Santos ve diğ., 1995) R82 kodlu referans suşun protein profili ile benzer profile sahip olduğu tespit edilmiştir.

V. logei olarak identifiye edilen ve *V. anguillarum* izolatları ile fenotipik olarak benzerlik gösteren 9 numaralı izolat da *V. anguillarum*'un O1 serotipine ait SRV 10.1 kodlu suş ile benzer bir protein profili oluşturmuştur. *V. scophthalmi*'nin protein profili ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiş olup, farklı işletmelerden temin edilen balık örneklerinden izole edilen bu izolatların protein profili bakımından homojen oldukları ve tamamen benzer protein profili oluşturdukları tespit edilmiştir. *V. harveyi* olarak identifiye edilen 7 numaralı izolatın Zhang ve Austin (2000) tarafından bildirilen sonuçlar ile benzer bir protein profili oluşturmuştur.

P. stutzeri suşlarının protein profillerinin heterojen bir yapıya sahip olduğu rapor edilmiştir (Lalucat ve diğ., 2006). *P. anguilliseptica* izolatları için, Nakajima ve diğ (1983) genel olarak 44, 42 ve 22 kDa'lık proteinleri bulunduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada *P. anguillispetica* olarak identifiye edilen 15 numaralı izolatın ise yaklaşık 42, 40 ve 20 kDa'lık proteinlere sahip olduğu tefspit edilmiştir. Çalışmada hasta kültür balıklarından izole edilen 14 numaralı *M. Luteus* izolatının ise bu tür için Piersen ve diğ. (1995) tarafından bildirilen protein profili ile benzer bir profil oluşturmuştur.

Bu çalışma ile *Vibrio* genusu üyesi bakterilerin, kültür çipura balıklarının temel patojenleri oldukları, akuatik ekosistemin doğal parçası olan bu organizmaların, yüksek stok yoğunluğu, su sıcaklığındaki, değişimler veya kirlilik durumunda balıklarda enfeksiyonlara ve ölümlere yol açtıkları, diğer bakterilerin de bu organizmalarla birlikte karma enfeksiyonlara neden oldukları görülmüştür.

Ülkemizdeki kültür balıklarında bakteriyel hastalıklara karşı önlem amacıyla kullanılan aşılar *Vibrio anguillarum* serotip O1 ve O2 ile *V. ordalii* antijenlerini içermektedir (Korun ve Timur, 2008). Bu çalışmada Türkiye'deki hasta kültür çipura balıklarından izole edilen ve *V. anguillarum* olarak identifiye edilen bakterilerin daha önceki çalışmalarda olduğu gibi türün O1 serotipine ait olduğu fakat bunun dışında birçok *Vibrio* türünün de mevsimsel baskınlık göstererek karma enfeksiyonlara yol açtığı görülmüştür.

Hasta çipura balıklarının iç organlarından izole edilen bakteri izolatlarının protein profillerinin incelenmesinde rutin yöntem ile protein ekstraksiyonunda daha başarılı sonuç elde edildiği, oluşan protein bantlarının daha keskin ve düzenli olduğu, protein saflaştırma kitinin Gram-negatif bakterilerde sitoplazmik membran proteinlerinin tamamını ortamdan uzaklaştıramadığı ve bu nedenle sadece dış membran proteinlerinin inceleneceği çalışmalarda çok başarılı sonuçlar elde edilemeyeceği ve kit ile elde edilen protein bantlarının rutin yöntemdeki kadar keskin ve belirgin olmadığı gerçekleştirilen SDS-PAGE analizlerinde görülmüştür.

Sonuç olarak; yürütülen bu tez çalışması ile Nisan, 2009 – Temmuz, 2010 tarihleri arasındaki dönemde Türkiye'nin Ege Bölgesi'ndeki balık çiftliklerinden temin edilen hasta çipura balıklarının bakteriyel patojenlerinin detaylı identifikasyonu gerçekleştirilmiş olup ülkemizde bilinenden farklı *Vibrio* türleri identifiye edilmiştir. Gram-negatif bakterilerden *P. stutzeri* ve Gram-pozitif bakterilerden *Micrococcus luteus* da bu çalışma ile ülkemizdeki kültür çipura balıklarının karma enfeksiyonlarından ilk defa izole ve identifiye edilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile SDS-PAGE tekniğinin bakterilerin teşhisinin doğrulanmasında ve tür içi karakterizasyonda faydalı bir araç olarak kullanılabileceği görülmüştür.

6. KAYNAKLAR

ADAMS, A., THOMPSON, K. D., 2006, Biotechnology offers revolution to fish health management, *Trends in Biotechnology*, 24 (5), 201-205.

ADAMS, A., THOMPSON, K. D., MORRIS, D., FARIAS, C., CHEN, S. C., 1995, Development and use of monoclonal antibody probes for immunohistochemistry, ELISA and IFAT to detect bacterial and parasitic fish pathogens, *Fish & Shellfish Immunology*, 5 (8), 537-547.

ADONE, R., PICCININNO, G., PISTOIA, C., BIANCHI, R., CIUCHINI, F., 1996, Detection of *Vibrio anguillarum* by a sandwich enzyme-linked immunosorbent asssay performed with monoclonal antibodies, *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 43, 479-584.

AINSWORTH, A., CAPLEY, G., WATERSTREET, P., MUNSON D., 1986 Use of monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for the diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*, *Journal of Fish Diseases*, 9, 439-444.

AKAYLI, T., 2001, *Kültür çipura balıklarında (Sparus auratus, L 1758) Vibriosis'in ELISA ve bakteriyolojik yöntemlerle teşhisi,* Doktora Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

AKAYLI, T., TIMUR, G., AYDEMIR, B., KIZILER, A.R., COŞKUN, O., ALBAYRAK, G., ARICAN, E., 2008, Characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates from diseased cultured gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 60 (2), 89-94.

AKAYLI, T., ÖZESEN ÇOLAK, S., YARDIMCI, E., 2009, Bacterial infections in *Sparus aurata* cultured in Turkey, *Indian Veterinary Journal*, 86 (11), 1294-1295.

AKAYLI, T., ÇANAK, Ö., BAŞARAN, B., 2011a, Gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) görülen *Aeromonas schubertii* enfeksiyonu üzerine bir çalışma, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4 (1), 99-106.

AKAYLI, T., ÇANAK, Ö., BAŞARAN, B., 2011b, Yavru kültür gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) görülen yeni bir Pseudomonas

türü: *Pseudomonas plecoglossicida*, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4 (1), 107-111.

AKHLAGHI, M., MAHJOR, A. A., 2004, Some histopathological aspects of streptococcosis in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 24 (3), 132-136.

AKINBOWALE, O. L., PENG, H., GRANT, P., BARTON, M. D., 2007, Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) farms in Australia, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 177-182.

ALPBAZ A., 2001, *Deniz balıkları yetiştiriciliği*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No: 20, İzmir,ISBN: 975-483-098-3.

ALPBAZ, A., 2005, *Su ürünleri yetiştiriciliği*, Alp Yayınları, İzmir, 975-97056-1-3.

ALDOVA, E., 1987, Serotyping of *Plesiomonas shigelloides* strains with our own antigenic scheme. An attempted epidemiological study, *Zentralbl Bakteriology Mikrobiology Hygiene A*, 265 (1-2), 253-262.

ALSINA, M., BLANCH, A., 1994, A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species, *Jouırnal of Applied Microbiology*, 76 (1), 79-85.

ALSINA, M., MARTINEZ-PICADO, J., JOFRE, J., BLANCH, A. R., 1994, A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (5), 1681-1683.

ALTINOK, İ., KAYIŞ, Ş., ÇAPKIN, E., 2006, *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout, *Aquaculture*, 261 (3), 850-855.

ALTINOK, İ., BALTA, F., ÇAPKIN, E., KAYIŞ, Ş., 2007, Diseases of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*, *Aquaculture*, 273 (4), 393-397.

AMLACHER, E., 1970, *Textbook of Fish Diseases*, Trans by Conroy, D. A., Herman, R. L., TFH Publications.

ANDERSON, D. P., 1993, *Fluorescent antibody test,* In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., van Muiswinkel, W. B., (ed.), Techniques in Fish Immunology: FITC1, 2nd edition, SOS Publications, New Jersey, 0-9625505-0-7.

ANGULO, L., LOPEZ, J. E., LEMA, C., VICENTE, J. A., 1992, *Vibrio pelagius* associated with mortalities in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, *Thalassas*, 10, 129-133.

ARAUJO, R. M., PARES, R., LUCENA, F., 1990, The effects of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* spp. in coastal waters, *Journal of Applied Microbiology*, 69 (3), 439-444.

ARDA, N., ERTAN, H., 2008, *Proteinlerin izolasyonu, analizi ve saflaştırılması*. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Ed. Temizkan, G., Arda, N. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul. 2008. ISBN: 9789754205831

ARKOOSH, M. R., KATTARI, S. L,1993, *Quantification of fish antibody to a specific antigen by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., van Muiswinkel, W. B., (ed.), Techniques in Fish Immunology: FITC1, 2nd edition, SOS Publications, New Jersey, 0-9625505-0-7.

ARMADA, S. P., FARTO, R., PEREZ, M. J., NIETO, T. P., 2003, Long-term survival and the viable but nonculturable state as part of the life cycle of *Listonella pelagia*, *Aquatic Microbial Ecology*, 33, 207-2016.

ARMAN, D., 2009, Yoğun bakımda Gram negatif bakteri sorunu. *ANKEM Dergisi*, 23 (Ek2), 148-156.

AUSTIN, B., 1998, Biotechnology and diagnosis and control of fish pathogens, *Journal of Marine Biotechnology*, 6, 1-2.

AUSTIN, B., AUSTIN, A., 2007, *Bacterial Fish Pathogens*, *Diseases of Farmed and Wild Fish,* Fourth Edition. Springer-Praxis Publishing, Chichester. 978-1-4020-6068-7.

AUSTIN, B., STOBIE, M., 1992, Recovery of *Micrococcus luteus* and presumptive *Planococcus* sp. from moribund fish during an outbreak of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fry syndrome in England, *Journal of Fish Diseases*, 15, 203-206.

AVENDANO-HERRERA, R., MAGARINOS, B., LOPEZ-ROMALDE, S., ROMALDE, J.L., TORANZO, A.E., 2004, Phenotyphic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes, *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 1-8.

AYDIN, S., GÜLTEPE, N., ÇİLTAŞ, A., 2005, Çanakkale ilindeki bir gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) işletmesinde *Pseudomonas* sp. enfeksiyonu, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (1), 39-43.

BAKOPOULOS, V., PERIC, Z., RODGER, H., ADAMS, A., RICHARDS, R., 1997, First report of fish Pasteurellosis from Malta, *Journal of Aquatic Animal Health*, 9, 26-33.

BALEBONA, M.C., ZORRILLA, I., MORINIGO, M.A., BORREGO, J.J., 1998, Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in Southwestern Spain from 1990 to 1996, *Aquaculture*, 166, 19–35.

BARAN, İ., TİMUR, M., AYDIN, N., İSTANBULLUOĞLU, E., AYDINTUĞ, M. K., 1981, Çifteler-Sakaryabaşı balık üretim ve araştırma istasyonunda alabalıklarda (*Salmo gairdneri irideus*) görülen bakteriyel hemorajik septisemi hastalığı üzerine incelemeler, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27, 467-473.

BENEDIKTSDOTTIR, E., HELGASON, S., SIGURJONSDOTTIR, H., 1998, *Vibrio* spp. isolated from salmonids with shallow skin lesions and reared at low temperature, *Journal of Fish Diseases*, 21, 19-28.

BERNARDET, J. F., SEGERS, P., VANCANNEYT, M., BERTHE, F., KERSTERS, K., CANDAMME, P., 1996, Cutting a gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. *(basonym, Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46, 128-148.

BERTHE, F.C.J., MICHEL, C., BERNARDET, J.F., 1995, Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France, *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 151-155.

BOLINCHES, J., LEMOS, M. L., FOUZ, B., CAMBRA, M., LARSEN, J. L., TORANZO, A. E., 1990, Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains, *Journal of Aquatic Animal Health*, 2 (1), 21-29.

BOS, M.P., TOMASSEN, J., 2004, Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane, *Current opinion in Microbiology*, 7, 610-616.

BOS, M.P., TEFSEN, B., GEURTSEN, J., TOMMASSEN, J., 2004, Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A,* 101 (25), 9417-9422.

BRUNETTE, W. N., 1981, "Werstern blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and

radiographic detection with antibody radioiodinated protein, *Analytical Biochemistry*, 112, 195-203.

BUCK, J., 1982, Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 44 (4), 992-993.

BULLER, N., 2004, *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*, CABI Publishing, Oxford, İngiltere, 0-85199-738-4.

BULLOCK, G. L., STUCKEY, H. M., SHOTTS JR., E. B., 1978, Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas, *Journal of Fish Diseases,*1 (4), 351-356.

CANDAN, A., 1993a, *Vibrio anguillarum* infection in *Sparus aurata* L. 1758, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 23, 25-27.

CANDAN, A., 1993b, *Vibrio ordalii* infection in *Sparus aurata* L. 1758, *İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1-2, 91-94.

CANDAN, A., 2000, Türkiye'de üretilen Atlantik salmon (*Salmo salar* L.)'nda tespit edilen ilk vibriosis olgusu, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 30, 107-108.

CANDAN, A., KARATAŞ, S., 2010, *Balık sağlığı*, Kalmak Ofset, İstanbul, Türkiye, 978-605-88665-0-8.

CANDAN, A., KÜÇÜKER, M. A., KARATAŞ, S., 1995, Motile aeromonad septicaemia in salmo salar cultured in the black sea in Turkey, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 15 (6), 195-196.

CERDA-CUELLAR, M., BLANCH, A. R., 2004, Determination of *Vibrio scophthalmi* and its phenotypic diversity in turbot larvae, *Environmental Microbiology*, 6 (3), 209-217.

CERDA-CUELLAR, M., ROSSELO-MORA, R. A., LALUCAT, J., JOFRE, J., BLANCH, A., 1997, *Vibrio scophthalmi* sp. Nov., a new species from turbot (*Scophthalmus maximus*), *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (1), 58-61.

CESCHIA, G., GIORGETTI, G., MAZZOLINI, E., DANIELIS, L., PASSERA, A., 1998, Vaccination against streptococcosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Applied Ichthyology*, 14, 185-187.

CHART, H., SHAW, D. H., ISHIGURO, E. E., TRUST, T. J., 1984, Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide, *Journal of Bacteriology*, 158 (1), 16-22.

CHATAIN, B., 1997, Development and achievements of marine fish-rearing technology in France over the last 15 years, *Hydrobiologia*, 358, 7-11.

CIPRIANO, R. C., PYLE, J. B., STARLIPER, C. E., PYLE, S. W., 1985, Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay, *Journal of Wildlife Diseases*, 21 (3), 211-218.

COLORNI, A., 1989, Pathology of marine warmwater finfish in Israel: problems and research, *Advances in Tropical Aquaculture*, 20 Feb-4 Mar 1989, Tahiti, 133-142.

COLORNI, A., 2004, Diseases of Mediterranean fish species: Problems, research and prospects, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 24 (1), 22-32.

COLORNI, A., DIAMANT, A., ELDAR, A., KVITT, H., ZLOTKIN, A., 2002, *Streptococcus iniae* infections in Red Sea cage-cultured and wild fishes, *Diseases of Aquatic Organisms,* 49, 165-170.

COONS, A. H., 1958, Fluorescent antibody methods, *Genetic Cytochemistry Methods*, 1, 399-422.

CRAIG, G., PAYNTER, D., COSCIA, I, MARIANI, S., 2008, Settlement of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. in a southern Irish Sea coastal habitat, *Journal of Fish Biology*, 72, 287-291.

CROSA, J. H., HODGES, L., 1981, Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775, *Infection and Immunity,* 31 (1), 223-227.

CUNNINGHAM, C.O., 2002, Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control, *Aquaculture*, 206 (1-2), 19-55.

CURTIS, M. J., HOWARD, A. J., 1993, *Economics of aquaculture*, Food Products Press, New York, 1-56022-019-8.

ÇAĞIRGAN, H., 1993, The first isolation of *Pasteurella piscicida* from cultured sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey, *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 3 (2), 17-19.

ÇAĞIRGAN, H., 2009, The use of veterinary drugs and vaccines in Turkey, *Options Mediterraneennes*, 86, 29-34.

ÇAĞIRGAN, H., TANRIKUL, T. T., 1995, A new problem *Enterococcus*-like infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Turkey, *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi*, 19 (33), 9-19.

ÇELİKKALE, M.S., DÜZGÜNEŞ, E., OKUMUŞ, İ., 1999, *Türkiye Su Ürünleri Sektörü Potansiyeli, Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri*, İstanbul Ticaret Odası, Yay. No. 1999-2. İstanbul, 975-512-321-0.

ÇOBAN, D., SAKA, Ş., FIRAT, K., 2004, Türkiye'deki çipura (*Sparus aurata* L., 1758) larva üretim tesislerinin anaç yönetim teknikleri, *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 21 (1-2), 133-138.

DAVIS, P. S., 1988, Two occurrences of gilthead, *Sparus aurata* Linneaeus 1758, on the coast of Northumberland, England, *Journal of Fish Biology*, 33, 951.

DEMİRCAN, D., CANDAN, A., 2006, Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpo*N gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30, 305-310.

DIEZEL, W., KOPPERSCHLÄGER, G., HOFMANN, E., 1972, An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brillant blue, *Analytic Biochemistry*, 48 (2), 617-620.

DİLER, Ö., ALTUN, S., 1994, Gökkuşağı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) hemorajik septisemi etkeni olarak izole edilen bazo *Aeromonas hydrophila* suşlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 4, 169-178.

DİLER, Ö., ALTUN, S., ADİLOĞLU, A. K., KUBİLAY, A., IŞIKLI, B., 2002, First occurrence of Streptococcosis affecting farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 22 (1), 21-26.

DOMENECH, A., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F., LAWSON, P., GARCIA, J.A., CUTULI, M.T., BLANCO, M., GIBELLO, A., MORENO, M.A., COLLINS, M.D., DOMINGUEZ, L., 1997, Winter disease outbreak in sea-bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection, *Aquaculture*, 156 (3-4), 317-326.

DOMENECH, A., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F., GARCIA, J. A., CUTULI, M. T., BLANCO, M., GIBELLO, A., MORENO, M. A., DOMINGUEZ, L., 1999, Association of *Pseudomonas anguilliseptica* infection with "winter disease" in sea bream, *Sparus aurata* L., *Journal of Fish Diseases,* 22, 69-71.

DOOLEY, J. S. G., LALLIER, R., TRUST, T. J., 1986, Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12 (1-4), 339-344.

EDWARDS, P. R., EWING, W. H., 1995, *Identification of Enterobacteriaceae*, Burgess Publishing, Minneapolis, 0838540627.

ELDAR, A., GORIA, M., GHITTINO, C., ZLOTKIN, A., BERCOVIER, H., 1999, Biodiversity of *Lactococcus garviae* strains isolated from fish in Europe, Asia and Australia, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (3), 1005-1008.

ELLIS, A. E., 1999, Immunity to bacteria in fish, *Fish and Shellfish Immunology*, 9, 291-308.

FAHY, E., GREEN, P., QUIGLEY, D. T. G., 2005, Juvenile *Sparus aurata* L., on the south coast of Ireland, *Journal of Fish Biology*, 66, 283-289.

FALLER, A., SCHLEIFER, K. H., 1981, Modified oxidase and benzidine tests for separation of Staphylococci from Micrococci, *Journal of Clinical Microbiology,* 13 (6), 1031-1035.

FARMER III, J. J., JANDA, J. M., 2005, *Family I. Vibrionaceae Veron 1965, 5245,* In: GARRITY, G. M. (Ed) Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd edition Volume 2 the proteobacteria part B the gammaproteobacteria, Springer, New York, 0-387-95040-0.

FARTO, R., MONTES, M., PEREZ, M. J., NIETO, T. P., LARSEN, J. L., PEDERSEN, K., 1999, Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures, *Journal Applied Microbiolgy*, 86, 796-804.

FARTO, R., ARMADA, S. P., MONTES, M., GUISANDE, J. A., PEREZ, M. J., NIETO, T. P., 2003, *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*), *Journal of Invertebrate Pathology*, 83, 149-156.

FILIP, C., FLETCHER, G., WULFF, J. L., EARHART, C. F., 1973, Solubalization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate, *Journal of Bacteriology*, 115 (3), 717-722.

FLIERMANS, C. B., HAZEN, T. C., 1980, Immunofluorescence of *Aeromonas hydrophila* as measured by fluorescence photometric microscopy, *Canadian Journal of Microbiology*, 26, 161-168.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) [Online]: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en [Ziyaret Tarihi 6 Kasım 2009].

FRERICHS, G. N., ROBERTS, R. J., 1989, *The bacteriology of teleosts,* In: Roberts, J. R., (ed.), Fish Pathology 2nd edition, Bailliere Tindall, Toronto, Kanada.

FRIEDMAN, M., 1996, Nutritional value of proteins from different food sources. A review, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 44 (1), 6-29.

FULOP, M., MANCHEE, R., TITBALL, R., 1995, Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia, *Vaccine*, 13 (13), 1220-1225.

GHUYSEN, J. M., HAKENBECK, R., 1994, Bacterial cell wall, Elsevier, Hollanda, 0-444-88094-1.

GUDMUNDSDOTTIR, S., MAGNADOTTIR, B., BJORNSDOTTIR, B., ARNADOTTIR, H., GUDMUNDSDOTTIR, B. K., 2009, Specific and natural antibody response of cod juveniles vaccinated against *Vibrio anguillarum*, *Fish & Shellfish Immunology*, 26, 619-624.

GUVEN, E., ÇOLAK, S., ÇOLAK, A., 2001, Ege Denizi'nde deniz balıkları yetiştiriciliği ve yeni türler, *Ulusal Ege Adaları 2001 Toplantısı Bildiriler Kitabı*, 10-11 Ağustos 2001 – Gökçeada Türkiye, İstanbul: Türk Deniz Araştırmaları Vakfı, 204-223.

HANCOCK, R.E.W., 1997, The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology*, 5 (1), 37-42.

HEDRICK, R. P., 1998, Relationships of the host, pathogen and environment: implications for diseases of cultured and wild fish populations, *Journal of Aquatic Animal Health*, 10 (2), 107-111.

HEIDELBERGER, M., 1956, *Lectures in immunochemistry*, Academic Press Inc., Newyork- ABD.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., WILLIAMS, S. T., (ed), 1994, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, A. B. D., 978-0-683-00603-2.

HORSLEY, R. W., 1977, A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis, *Journal of Fish Biology*, 10 (6), 529-523.

HOSSENLOPP, P., SEURIN, D., SEGOVIA-QUINSON, B., HARDOUIN, S., BINOUX, M., 1986, Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using wester blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies, *Analytical Biochemistry,* 154 (1), 138-143.

INGRAM, G. A., 1993, *Diffusion in Gel Techniques,* In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., van Muiswinkel, W. B., (ed.), Techniques in Fish Immunology: FITC1, 2nd edition, SOS Publications, New Jersey, 0-9625505-0-7.

JANEWAY, C. A., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. J., 2001, *Immunobiology 5TH edition, the immune system in health and disease*, Garland Science, New York, A. B. D., 0-8153-3642-x.

JEANNIN, P., MAGISTRELLI, G., GOETSCH, L., HAEUW, J.F., THIEBLEMONT, N., BONNEFOY, J.Y., DELNESTE, Y., 2002, Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells – impact on vaccine strategies, *Vaccine*, 20 (4), A23-A27.

JOOSTEN, P. H. M., AVILES-TRIGUEROS, M., SORGELOOS, P., ROMBOUT, J. H. W. M., 1995, Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin, *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 289-299.

KABATA, Z., 1985, Parasites and diseases of fish cultured in the tropics, Taylor & Francis Ltd., 0-85066-285-0.

KAPETANOVIC, D., KURTOVIC, B., VARDIC, I., TESKEREDZIC, E., TESKEREDZIC, Z., 2006, Gill disease in a gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), *Medycyna Weterynaryjna*, 62 (11), 1239-1241.

KARATAŞ DÜĞENCİ, S., CANDAN, A., 2003, Isolation of *Aeromonas* strains from the intestinal flora of Atlantic salmon (*Salmo salar* L. 1758), *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27, 1070-1075.

KARATAŞ, S., CANDAN, A., DEMİRCAN, D., 2005, Atypical Aeromonas infecton in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black Sea, *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 57 (4), 255-263.

KARATAŞ, S., ERCAN, D., STEINUM, T. M., TURGAY, E., MEMİŞ, D., CANDAN, A., 2010, First isolation of *Flavobacterium johnsoniae* like bacterium from cultured Russian sturgeon in Turkey, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(14), 1943-1946.

KAYIŞ, Ş., ÇAPKIN, E., BALTA, F., ALTINOK, İ., 2009, Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern Black Sea region of Turkey, *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 61 (4), 339-344.

KIMBERLEY, A. W., MACNAIR, N. G., 2004, *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: techniques and procedures*, Iowa State Press, Iowa, USA, 0-8183-1952-0.

KIRKAN, Ş., GÖKSOY, E. Ö., KAYA, O., 2003, Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms, *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50 (7), 339-342.

KITAO, T., 1993, *Streptococcal infections* in: V. Inglis, R. J. Roberts and N. R. Bromage (Ed) Bacterial Diseases of Fish, Blackwell, Oxford, İngiltere.

KLOOS, W. E., TORNABENE, T. G., SCHLEIFER, K. H., 1974, Isolation and characterization of Micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae*, *International Journal of Systematic Bacteriology,* 24 (1), 79-101.

KNAPPSKOG, D.H., RODSETH, O.M., SLINDE, E., ENDERSEN, C., 1993, Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from Vibriosis, *Journal of Fish Diseases*, 16, 327-338.

KOEBNIK, R., LOCHER, K. P., VAN GELDER, P., 2000, Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Molecular Microbiology*, 37 (2), 239-253.

KONEMAN, E. W., 1992, *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, J. B. Lippincott, Philedelphia, 0397512015.

KORUN, J., 2006, Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. *E.Ü. Su ürünleri Dergisi*, 23 (1/2), 259-263.

KORUN, J., AKAYLI, 2004, Kültür levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında parazitik bir isopod: Ceratothoa oestroides ve sekonder bakteriyel infeksiyonlar olgusu, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30 (2), 123-132.

KORUN, J., GÖKOĞLU, M., 2007, *Listonella anguillarum* isolated from hatchery-cultured red porgy *Pagrus pagrus* in Turkey, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (6), 823-827.

KORUN, J., TİMUR, G., 2008, Marine vibriosis associated with diseased seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Journal of Fisheriessciences.com*, 2 (1), 66-76.

KÖPRÜCÜ, S., SARIEYYÜPOĞLU, 2010, *Aeromonas hydrophila* ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) histopatolojik bir araştırma, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 22 (1), 11-17.

KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., APPEL, L. J., 2003, Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease, *Arteriosiclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 23, e20-e31.

KUBİLAY, A., TİMUR, G., 2001, Determination of antibody production by IFAT and ELISA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunized by *Yersinia ruckeri* bacterin, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25, 437-445.

KUBİLAY, A ULUKÖY, G., 2004, First Isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 24(3): 137-143.

KUBİLAY, A., ALTUN, S., DİLER, Ö., EKİCİ, S., 2008, Isolation of *Flavobacterium columnare* from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Turkey, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 165-169.

KUEHN, MJ., KESTY, N.C., 2005, Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes and Development*, 19, 2645-2655.

KUSUDA, R., SUGİYAMA, A., 1981, Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes, 1: on the morphological, biological and biochemical properties, *Fish Pathology*, 16 (1), 15-24.

LAEMMLI, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970; 227:680-685.

LALUCAT, J., BENNASAR, A., BOSCH, R., GARCIA-VALDES, E., PALLERONI, N. J., 2006, Biology of *Pseudomonas stutzeri*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (2), 510-547.

LEBLANC, D., MITTAL, K. R., OLIVIER, G., LALLIER, R., 1981, Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish, *Applied and Environmental Microbiology*, 42 (1), 56-60.

LE BRETON, A.D.,1999, Mediterranean finfish pathologies: Present status and new developments in prophylactic methods. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 19 (6):250-253

LIMA DE FARIA, A., 1969, *Handbook of Molecular Cytology*, North-Holland Publications, Londra, İngiltere.

LÖNNSTRÖM, L., WİKLUND, T., BYLUND, G., 1994, *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from Baltic herring *Clupea harengus membras* with eye lesions, *Diseases of Aquatic Organisms*, 18, 143-147.

LOPEZ, J. E., ANGULO, L., 1995, Survival of *Vibrio splendidus* biotype 1 in sea water, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 15 (2), 70-72.

LOPEZ-ROMALDE, S., MAGARINOS, B., RAVELO, C., TORANZO, A.E., ROMALDE, J.L., 2003, Existence of two O-serotypes in the fish pathogen *Pseudomonas anguilliseptica*. *Veterinary Microbiology*, 94, 325-333.

LUBZENS, E., MINKOFF, G., BARR, Y., ZMORA, O., 1997, Mariculture in Israel-past achievements and future directions in raising rotifers as food for marine fish larvae, *Hydrobiologia*, 358, 13-20.

MAGARINOS, B., ROMALDE, J. L., SANTOS, Y., CASAL, J. F., BARJA, J. L., TORANZO, A.E., 1994, Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*, *Aquaculture*, 120 (3-4), 201-208.

MAGARINOS, B., ROMALDE, J.L., LOPEZ-ROMALDE, S., MORINIGO, M.A., TORANZO, A.E., 2003, Pathobiological characterisation of *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*), *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 23 (4), 183-190.

MAO, Z., YU, L., YOU, Z., WEI, Y., LIU, Y., 2007, Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003, *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 567-575.

MANDRELL, R. E., ZOLLINGER, W. D., 1977, Lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by hemagglutination inhibition, *Infection and Immunity*, 16 (2), 471-475.

MARTIN-CARNAHAN, A., JOSEPH, S. W., 2005, *Order XII. Aeromonadales ord. nov.* In: GARRITY, G. M. (Ed) Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd edition Volume 2 the proteobacteria part B the gammaproteobacteria, Springer, New York, 0-387-95040-0.

MATYAR, F., AKKAN, T., UÇAK, Y., ERASLAN, B., 2010, *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from İskenderun bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea), *Environmental Monitoring and Assessment,* 167 (1-4), 309-320.

MC CARTHY, D. H., 1975, Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue, *Journal of General Microbiology*, 88, 384-386.

MEMİŞ, D., DEMİR, N., EROLDOĞAN, O.T., KÜÇÜK, S., 2002, Aquaculture in Turkey. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 54 (1), 3-9.

MONTERO, C., 2003, The antigen-antibody reaction in Immunohistochemistry, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51 (1), 1-4.

MORETTI, A., FERNANDEZ-CRIADO, M., P., CITTOLIN, G., GUIDASTRI, R., 1999, *Manual on hatchery production of sea bass and gilthead seabream*, *Volume 1*, FAO, Roma-İtalya, 92-5-104380-9.

MULERO, V., ANGELES ESTEBAN, M., MESEGUER, J., 1998, Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66, 185-199.

MUROGA, K., SAWADA, T., JO, Y., 1975, Studies on red spot disease of pond-cultured eels, 2: pathogenicty of the causative bacterium, *Pseudomonas anguilliseptica*, Fish Pathology, 9 (2), 107-114.

MYHR, E., LARSEN, L.J., LILLEHAUG, A., GUDDING, R., HEUM, M., HASTEIN, T., 1991, Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway, *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (9), 2750-2757.

NAKAJIMA, K., MUROGA, K., HANCOCK, R. E. W., 1983, Comparison of fatty acid, protein, and serological properties distunguishing outer membranes of *Pseudomonas anguilliseptica* strains from those of fish pathogens and other Pseudomonads, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33 (1), 1-8.

NAYLOR, R. L., GOLDBURG, R. J., PRIMAVERA, J. H., KAUTSKY, N., BEVERIDGE, M. C. M., CLAY, J., FOLKE, C., LUBCHENCO, J., MOONEY, H., TROELL, M., 2000, Effects of aquaculture on world fish supplies, *Nature*, 405, 1017-1024.

NOGA, E. J., 2010, *Fish Disease: Diagnosis and Treatment, 2nd Edition,* Blackwell Publishing, Singapore, 978-0-8138-0697-6.

NEWMAN, S. G., 1993, Bacterial vaccines for fish, *Annual Review of Fish Diseases,* 3, 145-185.

NOGUEROLA, I., BLANCH, A. R., 2008, Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomus keys, *Journal of Applied Microbiology*, 105 (1), 175-185.

NORQVIST, A., HAGSTROM, A., WOLF-WATZ, H., 1989, Protection of rainbow trout against vibriosis and furunculosis by the use of attenuated strains of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (6), 1400-1405.

OKUMUŞ, İ., DENİZ, H., 2007, *Past, Present and Future of the marine aquaculutre*, In: CANDAN, A., KARATAŞ, S., KÜÇÜKTAŞ, H., OKUMUŞ, İ. (Ed.), Türk Deniz Araştırmaları Vakfı, İstanbul, 1-10.

OSORIO, C. R., TORANZO, A.E., 2002 *DNA-based diagnostics in sea farming*, In: FINGERMAN, M., NAGABHUSHANAM, R. (ed.), Recent advances in marine biotechnology vol 7 seafood safety and human health, Science Publishers Inc., Enfield-USA, 253-310.

ÖZER, S., BULDUKLU, P. S., DÖNMEZ, E., 2008, Mersin ilinde yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) streptokokkozis varlığı, *Journal of Fisheries Sciences*, 2 (3), 272-283.

ÖZESEN ÇOLAK, S., GÜVEN, E., DOĞAN, K., 2007, Diseases management of marine fish hatcheries in Turkey, *Abstract Book*, 24-27 October 2007 – İstanbul Turkey, 416-417.

PACHA, R. E., KIEN, E. D., 1969, Characterization and relatedness of marine vibrios pathogenic to fish: physiology, serology and epidemiology, *Journal of Bacteriology*, 100 (3), 1242-1247.

PALLERONI, N. J., 2005, *Genus I Pseudomonas Migula 1894, 237 (nom. cons. Opin. 5 of the Jud Comm 1952, 121,)* In: GARRITY, G. M. (Ed) Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd edition Volume 2 the proteobacteria part B the gammaproteobacteria, Springer, New York, 0-387-95040-0.

PAPOUTSOGLOU, S. E., 2000, Monitoring and regulation of marine aquaculture in Greece: Licensing, regulatory control and monitoring guidelines and procedures, *Journal of Applied Ichthyology*, 16, 167-171.

PEDERSEN, K., GRISEZ, L., HOUDT, R. V., TIAINEN, T., OLLEVIER, F., LARSEN, J. L., 1999, Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups, *Current Microbiology*, 38, 183-189.

PIERSEN, C. E., PRINCE, M. A., AUGUSTINES, M. L., DODSON, M. L., LLOYD, R. S., 1995, Purification and cloning of *Micrococcus luteus* ultraviolet endonuclease, an N-glycosylase/abasic lyase that proceeds via a imino enzyme-DNA intermediate, *Journal of Biological Chemistry*, 270 (40), 23475-23484.

PITT, R., TSUR, O., GORDIN, H., 1977, Cage culture of *Sparus aurata*, *Aquaculture*, 11, 285-296.

PUJALTE, M. J., SITJA-BOBADILLA, A., ALVAREZ-PELLITERO, P., GARAZ, E., 2003, Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranen fish farms, *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 119-126.

PUJALTE, M.J., SITJA-BOBADILLA, A., MACIAN, M.C., ALVAREZ-PELLITERO, P., GARAY, E., 2007, Occurence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Molecular and phenotypic characterization of *P. undina* strain U58. *Aquaculture*, 271, 47-53.

QIAN, R., CHU, W., MAO, Z., ZHANG, C., WEI, Y., YU, L., 2007, Expression, characterization and immunogenicity of a major outer membrane protein from *Vibrio alginolyticus*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39 (3), 194-200.

QIAN, R.H., XIAO, Z.H., ZHANG, C.W., CHU, W.Y., WANG, L.S., ZHOU, H.H., WEI, Y.W., YU, L., 2008a, A conserved outer membrane protein as an effective vaccine candidate from *Vibrio alginolyticus*, *Aquaculture*, 278, 5-9.

QIAN, R., XİAO, Z., ZHANG, C., CHU, W., MAO, Z., YU, L., 2008b, Expression and purification of two major outer membrane proteins from *Vibrio alginolyticus*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 245-251.

RAMOS, P., 2000, Visceral granuloma in sea bream (*Sparus aurata* L.) with presumptive etiology of mycobacteriosis, *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*, 95(536), 185-191.

RAYMAN, M. P., 2000, The importance of selenium to human health, *The Lancet*, 356 (9225), 233-241.

REAL, F., ACOSTA, B., DENIZ, S., OROS, J., RODRIGUEZ, E., 1994, *Aeromonas salmonicida* infection in *Sparus aurata* in the Canaries, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 14 (5), 153-155.

ROBERSON, B. S., 1993, *Bacterial agglutination,* In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., van Muiswinkel, W. B., (ed.), Techniques in Fish Immunology: FITC1, 2nd edition, SOS Publications, New Jersey, 0-9625505-0-7.

RODGERS, C.J., FURONES, M.D., 1998, Disease Problems in Cultured Marine Fish in the Mediterranean, *Journal* of *Fish Pathology*, 33 (4), 157-164.

ROMALDE, J. L., MAGARINOS, B., FOUZ, B., BANDIN, I., NUNEZ, S., TORANZO, A. E., 1995, Evaluation of Bionor mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens, *Diseases of Aquatic Organisms*, 21, 25-34.

ROSSELO, R., GARCIA-VALDES, E., LALUCAT, J., URSING, J., 1991, Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*, *Systematic and Applied Microbiology*, 14 (2), 150-157.

RUFFOLO, C.G., ADLER, B., 1996, Cloning, Sequencing, Expression and Protective Capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen, *Infection and Immunity*, 64 (8), 3161-3167.

SANCHEZ-MATA, A., MORA, J., 2000, A review of marine aquaculture in Spain: production, regulations and environmental monitoring, *Journal of Applied Ichthyology*, 16, 209-213

SANTOS, Y., PAZOS, F., BANDIN, I., TORANZO, A. E., 1995, Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2 and O3, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (7), 2493-2498.

SANTOS, Y., PAZOS, F., TORANZO, A. E., 1996, Biochemical and serological analysis of *Vibrio anguillarum* related organisms, *Diseases of Aquatic Organisms*, 26, 67-73.

SANTOS, Y., PAZOS, F., NUNEZ, S., TORANZO, A.E., 1997, Antigenic characterization of *Vibrio anguillarum*-related organisms isolated from turbot and cod, *Diseases of Aquatic Organisms*, 28, 45-50.

SAR, N., ROSENBERG, E., 1987, Fish skin bacteria: colonial and hydrophobicity, *Microbial Ecology,* 13 (3), 193-202.

SARGENT, J. R., 1997, Fish oils and human diet, *British Journal of Nutrition*, 78 (1), S5-S13.

SEHDEV, H. S., MCBRIDE, J. R., FAGERLUND, U. H. M., 1963, 2-Phenoxyethanol as a general anaesthetic for sockeye salmon, *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 20 (6), 1435-1440.

SHAH, K. L., TYAGI, B. C., 1986, An eye disease in silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*, held in tropical ponds, associated with the bacterium *Staphylococcus aureus*, *Aquaculture*, 55 (1), 1-4.

SHANG, Y. C., 1981, *Aquaculture economics: basic concepts and methods of analysis,* Westview Press, A.B.D., 0-86531-047-5.

SHIMADA, T., ARAKAWA, A. E., ITOH, K., OKITSU, T., MATSUSHIMA, A., ASAI, Y., YAMAI, S., NAKAZATO, T., NAIR, G. B., ALBERT, M. J., TAKEDA, Y., 1994, Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*, *Current Microbiology*, 28, 175-178.

SHOTTS, E. B., GAINES, J. L., MARTIN, L., PRIESTWOOD, A. K., 1972, *Aeromonas* induced deaths among fish and reptiles in an eutrophic inland lake, *Journal of American Veterinary Medical Association*, 161, 603-607.

SIKORSKI, J., MOHLE, M., WACKERNAGEL, W., 2002, Identification of complex composition, strong strain diversity and directional selection in local *Pseudomonas stutzeri* populations from marine sediment and soils, *Environmental Microbiology*, 4 (8), 465-476.

SIMIDU, U., TSUKAMOTO, K., 1985, Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family *Vibrionaceae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (4), 781-790.

SIMON, M., MATHES, A., BLANCH, A., ENGELHARDT, H., 1996, Characterization of a porin from the outer membrane of Vibrio anguillarum, *Journal of Bacteriology*, 178 (14), 4182-4188.

SMITH, P. D., 1981, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of *Aeromonas salmonicida* in diseased fish tissue, *Developments in Biological Standardization*, 49, 97-100.

SNIESZKO, 1974, The effects of environmental stres on outbreaks of infectious diseases of fishes, *Journal of Fish Biology*, 6 (2), 197-208.

SNOUSSI, M., HAJLAOUI, H., NOUMI, E., ZANETTI, S., BAKHROUF, A., 2008, Phenotypic and genetic diversity of *Vibrio alginolyticus* strains recovered from juveniles and older *Sparus aurata* reared in a Tunisian marine farm, *Annals of Microbiology*, 58 (1), 141-146.

SORENSEN, U. B. S., LARSEN, J. L., 1986, Serotyping of *Vibrio anguillarum*, *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (3), 593-597.

SOUTHGATE, P., 1993, Disease in aquaculture, aquaculture for veterinarians: fish husbandary and medicine, pp 91-131, first ed., Pergamon Press Ltd., Oxford, İngiltere, 0-08-0408-35-4.

SUZUKI, M., NAKAGAWA, Y., HARAYAMA, S., YAMAMOTO, S., 2001, Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov. and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1639-1652.

SÜZER, C., ÇOBAN, D., KAMACI, H. O., AYTEPE, B., SAKA, Ş., FIRAT, K., 2007, Çipura (*Sparus aurata* L., 1758) larvalarında mikropartikül yeme geçiş döneminde sindirim enzimlerindeki değişmeler, *E. Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 24 (3-4), 253-259.

ŞAHRİKOĞLU, L., CANDAN, A., 2002, A research on *Aeromonas hydrophila* infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *İ. Ü. Su ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14, 59-70.

TANRIKUL, T.T., 2006, Outbreaks of *Vibrio alginolyticus* in gilthead sea bream in Turkey, *Indian Veterinary Journal*, 83, 599-601.

TANRIKUL, T. T., 2007, Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10 (10), 1733-1737.

TANRIKUL, T. T., GÜLTEPE, N., 2011, Mix infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): *Lactococcus garviae* and *Vibrio anguillarum* O1, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (8), 1019-1023.

TEMİZKAN, G., ARDA, N., 2008, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler 3. Baskı*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 9789754205831

THUVANDER, A., HONGSLO, T., JANSSON, E., SUNDQUIST, B., 1987, Duration of protective immunity and antibody titres measured by ELISA after vaccination of

rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis, *Journal of Fish Diseases*, 10 (6), 479-486.

TIDWELL, J. H., ALLAN, G. L., 2001, Fish as food: aquaculture's contribution, *EMBO Reports*, 21 (111), 958-963.

TİMUR, G., AKAYLI, T., 2003, First study of Staphylococcosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) fry in Turkey, *International Symposium of Fisheries and Zoology*, 23-26 October, 2003, Istanbul: Istanbul University Press, 67-79.

TİMUR, G., KORUN, J., 2004, First outbreak of vibriosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey, *İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 18 (18), 1-9.

TİMUR, G., TİMUR, M., 2003, *Balık Hastalıkları*, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No. 5, İstanbul, 975-404-699-9. 2003.

TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T., ÇAMLIBEL, U. R., 2004, Oodinium and vibrio co-infections in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*), *İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 17, 9-18.

TİMUR, G., TİMUR, M., AKAYLI, T., KORUN, J., THOMPSON, K. D., 2005, First observation of *Rickettsia*-like organisms in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey, *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 25 (5), 196-202.

TİMUR, G., AKAYLI, T., KORUN, J., YARDIMCI, R. E., 2009, A bacteriological and histopathological study of bacterial septicemia in farmed young russian sturgeon *Acipencer gueldenstaedtii* in Turkey, *6th International Symposium on Sturgeon*, 25-31 Ekim 2009, Wuhan, Hubei, Çin.

TORANZO, A.E., BARJA, J.L., COLWELL, R.R., HETRICK, F.M., CROSA, J.H., 1983, Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic Coast, *FEMS Microbiology Letters*, 18 (3), 257-262.

TORANZO, A. E., BAYA, A. M., ROBERSON, B. S., BARJA, J. L., GRIMES, D. J., HETRICK, F. M., 1987, Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens, *Aquaculture*, 61, 81-97.

TORANZO, A.E., BARREIRO, S., CASAL, J.F., FIGUERAS, A., MAGARINOS, B., BARJA, J.L., 1991, Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): First report in Spain, *Aquaculture*, 99 (1-2), 1–15.

TORANZO, A.E., MAGARINOS, B., ROMALDE, J.L., 2005, A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture*, 246, 37-61.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9), 4350-4354.

TURGAY, E., 2009, *Kültür balıklarında görülen stafilokokkal enfeksiyonlar üzeribe bir araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

TÜRKİYE İSTATİSTİK KURUMU (TUİK) [Online]: www.tuik.gov.tr [Ziyaret Tarihi 5 Nisan 2011].

VANDENBERGHE, J., THOMPSON, F., GOMEZ-GIL, B., SWINGS, J., 2003, Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems, *Aquaculture*, 219 (1-4), 9-20.

VENDRELL, D., BALCAZAR, J. L., RUIZ-ZARZUELA, I., DE BLAS, I., GIRONES, O., MUZQUIZ, J. L., 2006, *Lactococcus garvieae* in fish: a review, *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 177-198.

VESTERBERG, O., 1989, History of electrophoretic methods, *Journal of Chromotography A*, 480, 3-19.

VESTERBERG, O., 1993, A short history of electrophoretic methods, *Electrophoresis*, 14 (1), 1243-1249.

WANG, S.Y., LAURITZ, J., JASST, J., MILTON, D.L., 2003, Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation, *Microbiology*, 149, 1061-1071.

WEDEMEYER, G. A., MEYER, F. P., SMITH, L., 1976, Book 5: Environmental stress and fish diseases, TFH Publications Inc., Neptune City, NJ, A. B. D.,

WESSEL, D., FLUGE, U. I. A., 1984, A method for the quantitative recovery of proteins in dilute solution in the presence of detergent and lipids, *Anals of Biochemistry*, 138 (1), 141-143.

WHEELER, A., 1969, *The fishes of the British Isles and north-west Europe*, McMillan, Londra, İngiltere, 0-333-05955-7.

WHITEHEAD, P. J., BAUCHOT, M. L, HUREAU, J. C., NIELSEN, J., TORTONESE, E., 1986, *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean Vols 1-3*, UNESCO, Paris Fransa, 9230023094.

WOO, P. T. K., BRUNO, D. W., 1999, *Fish diseases and disorders volume 3:Viral, bacterial and fungal infections,* CABI Publishing, İngiltere, 0-85199-194-7.

YOSHIMIZU, M., KIMURA, T., 1976, Study on the intestinal microflora of salmonids, *Fish Pathology*, 10 (2), 243-259.

YOUNG, V. M., MOODY, M. R., 1974, Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Infectious Diseases*, 130, 47-52.

ZHANG, X.H., AUSTIN, B., 2000, Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids, *Journal of Fish Diseases*, 23 (2), 93-102.

ZOHAR, Y., ABRAHAM, M., GORDIN, H., 1978, The gonadal cycle of the captivity reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* during the first two years of life, *Annales Biologie Animale Biochemie Biophysique*, 18, 877-882.

ZORRILLA, I., CHARBILLON, M., ARIJO, S., DIAZ-ROSALES, P.D., MARTINEZ-MANZANARES, E., BALEBONA, M.C., MORINIGO, M.A., 2003a, Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain, *Aquaculture*, 218, 11-20.

ZORRILLA, I., MORINIGO, M.A., CASTRO, D., BALEBONA, M.C., BORREGO, J.J., 2003b, Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1106-1116.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İstanbul'da doğdum. İlkokulu Beyazıt İlkokulunda tamamladıktan sonra Özel Boğaziçi Lisesi ve Üsküdar Anadolu Lisesi'nde eğitim gördüm. 2002 yılında İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi'ni kazandım. 2008 yılında Su Ürünleri Mühendisi ünvanıyla mezun oldum. Aynı yıl İ. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Balık Hastalıkları Programı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2010 yılında İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandım ve halen görevime devam etmekteyim. Aynı yıl yüksek lisans eğitimim sırasında ERASMUS programı kapsamında burslu olarak Santiago de Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Anabilim Dalı'nda (İspanya) eğitim gördüm. İyi derecede İngilizce ve orta derecede Almanca bilmekteyim.