

Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* İzalasyonu^[1]

Ayşegül KUBİLAY *  Soner ALTUN ** Behire Işıl DİDİNEN * Seçil EKİCİ * Öznur DİLER *

[1] Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir

* Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 32500 Eğirdir, Isparta - TÜRKİYE

** Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı - 16059 Görükle/ BURSA - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): 2009/093-A

Özet

Dört farklı gökkuşığı alabalığı kuluçkahanesinden alınan örneklerde *Flavobacterium psychrophilum*'un ortaya çıkış noktaları ve bulaşma yolları incelenmiştir. Bu amaçla yumurta inkubasyon suyu, ovaryum sıvısı, sperm, döllenmemiş yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta ve larval dönemlerden örneklemeler yapılmıştır. Araştırma sonucunda, ovaryum sıvısında, inkubasyon suyunda ve yumurtada *F. psychrophilum* tespit edilmiş, sperm örneklerinde ise etkene rastlanmamıştır. Dolayısıyla anaç balıkların bu patojenin latent taşıyıcısı olabileceği kanısına varılmıştır. Araştırmada Fethiye bölgesinde 4 farklı gökkuşığı alabalığı kuluçkahanesinden Ocak-Şubat 2007 tarihlerinde *F. psychrophilum*'un toplamda 44 izolatu elde edilmiştir. Farklı işletmelerden izole edilen *F. psychrophilum*'un fenotipik karakterleri homojen bulunmuştur. Bu izolatların biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri *F. psychrophilum*'u karakterize etmektedir. Enzim üretimleri API ZYM test kitleri kullanılarak yapılmıştır. API ZYM testleri sonucunda; *F. psychrophilum* izolatlarının proteolitik ve lipolitik enzimleri üretebilme yeteneğinde olduğu ancak karbonhidratları kullanmadığı tespit edilmiş, izolatların esteraz ve sistin arilamidaz enzim üretiminde de farklılık gösterdikleri saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*, Anaç balık, Kuluçkahane, Ovaryum sıvısı

Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Summary

Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* at four rainbow trout hatcheries was investigated to proved more knowledge about the reservoirs and transmission of this bacterium. Incubating water, ovarian fluid, milt, unfertilized eggs, fertilized eggs, eyed eggs and fry stages were sampled. *Flavobacterium psychrophilum* was not found in milt while the pathogen was found ovarian fluid. Indicating that broodstock may serve as a reservoir and are latent carriers of the pathogen. *F. psychrophilum* was determined on eggs and from water samples. *F. psychrophilum* 44 isolates was isolated from four rainbow trout hatcheries in Fethiye region during January and February 2007. The *F. psychrophilum* isolates obtained from different farms proved to be homogeneously phenotypic characteristics. The *F. psychrophilum* isolates represented a biochemical and physiological characteristics were observed. Enzyme production was tested using API ZYM strips. In the result of API ZYM test, the *F. psychrophilum* isolates produced lipolytic and proteolytic enzymes but not utilise simple or complex carbohydrates. Isolates from all of the four hatcheries studied showed differences in estrase and cyctin arylamidase production within a group.

Keywords: : *Oncorhynchus mykiss*, *Flavobacterium psychrophilum*, Broodstock, Hatchery, Ovarian fluid

GİRİŞ

Flavobacterium psychrophilum'un neden olduğu enfeksiyona Bakteriyel soğuksu hastalığı da denilmektedir. Hastalığa yakalanan balıkların sırt kısmında içeriye doğru bir oyuk olduğu için hastalığa "Eyer hasta-

lığı" da denilmektedir. Ayrıca gökkuşığı alabalığı fry sendromu (RTFS) olarak da isimlendirilmektedir¹⁻⁶. RTFS son 15 yıl boyunca Avrupa'nın büyük bir bölümünde özellikle gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinde ciddi



İletişim (Correspondence)



+90 246 3133447



aykub@yahoo.com

bakteriyel hastalıklardan biri olarak bildirilmiştir ⁷⁻¹⁴. Ülkemizde su ürünleri sektöründe önemli bir tür olan gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliğinde *F. psychrophilum*'un neden olduğu salgın hastalığa sıkça rastlanılmıştır ¹⁻⁶. RTFS ye daha çok Salmonidae familyasına ait yavru balıklar duyarlıdır. RTFS, yavru balıklarda ilk beslenmeden başlayarak 4 ve 7. haftalarda görülmekte ve mortalite oranı %50 - %80'lere ulaşmaktadır. *F. psychrophilum* salmonid balıkları özellikle kuluçkahane sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü sıcaklıklarda etkileyerek, larva ve yavrularında yüksek mortaliteye neden olmaktadır ^{1-6,15,16}. Alabalık yetiştiriciliğinin ilk basamağında bu hastalıktan balıkların zarar görmesi bu sektörde önemli bir ekonomik kayba yol açmaktadır. *F. psychrophilum*, sağlıklı balıkların vücut yüzeyinde, ovaryum, sperma, sindirim sisteminde ve solungaç mikroflorası içinde bol miktarda bulunduğu, ayrıca etkenin hasta anaç balıkların yumurtalarına buradan da yavru balıklara vertikal olarak bulaşabildiği bildirilmiştir ¹⁻⁶. Herhangi bir hastalık semptomunu göstermeyen *F. psychrophilum*'un latent taşıyıcıları, hastalığın potansiyel kaynağı olabilmektedirler. Bunun yanı sıra patojenin konakçı dışında da uzun bir süre canlı kaldığı bildirilmiştir. Derinin ve yüzgeçlerin mekanik yaralanması ile oluşan giriş yerlerinden *F. psychrophilum*'un konakçıya girebildiği belirtilmiştir ¹⁶. Hastalık, salmonid yumurtalarında kabuk yumuşamasına, yumurtanın erken çatlamasına ve yumurta kesesinin yırtılmasına neden olmaktadır ¹⁶⁻¹⁸. *F. psychrophilum*'un etken olduğu RTFS hastalığına 0.2-2gr'lık salmonid balıkların çok duyarlı olduğu, fingerling ve daha büyük balıkların ise bu hastalıktan etkilenebildiği ancak bunlarda mortalitenin daha düşük olduğu kaydedilmiştir ^{1-6,19}. *F. psychrophilum*'un 3 farklı serotipi (Th, Fd, FpT) ve 31-35 farklı ribotipleri olduğu bildirilmiştir ¹⁷.

Balık patojeni olan *Flavobacterium psychrophilum*, diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan gökkuşığı alabalığı larvalarında ve yavrularında ciddi ölümlerin ve hastalıkların başlıca sebeplerinden biridir. Ülkemizde farklı araştırmacılar; Ege, Marmara, Akdeniz, Karadeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgeleri'ndeki gökkuşığı alabalığı işletmelerinden *F. psychrophilum* izole ettiklerini bildirmişlerdir ^{2-4,20}. Ülkemizde yapılan araştırmalar enfekte larva ve yavrulardan patojenin izolasyonu ve identifikasyonu ile ilgilidir. *F. psychrophilum*'un kaynağı ve bulaşması ile ilgili çalışmalar azdır. Daha önceki çalışmalarda; *F. psychrophilum*'un yumurta yüzeyinden ^{21,22}, ovaryum sıvısından ^{7,14,22}, yumurtadan ^{23,24}, sperm ve fertilize yumurtaların yüzeyinden ¹⁴ izole edildiği bildirilmiştir.

F. psychrophilum enfeksiyonunun vertikal bulaşabileceği ve anaç balıkların bu enfeksiyonun potansiyel kaynağı olabileceği öne sürülmüştür ^{17,23-26}.

Bu çalışmada, Fethiye civarındaki 4 farklı gökkuşığı alabalığı kuluçkahanesinde, balık patojeni olan *Flavobacterium psychrophilum*'un ortaya çıkış noktaları ve bulaşma yollarının incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

İnceleme yapılan Gökkuşığı Alabalığı İşletmeleri

Bu araştırmada *F. psychrophilum*'un izolasyonu için Muğla alabalık yetiştiriciler birliğine üye olan 4 farklı alabalık işletmeden Ocak-Şubat 2007 tarihleri arasında örneklemeler yapılmıştır. Fethiye bölgesindeki bu dört üretim tesisinin; ikisi suyunu kaynak suyundan, diğer ikisi ise Eşen Çayı'ndan temin etmektedir.

Flavobacterium psychrophilum izolasyonu ve identifikasyonu

Flavobacterium psychrophilum izolasyonu bütün işletmelerindeki; anaç balıkların ovaryum sıvısı, sperm, döllenenmiş yumurta, döllenişmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli larva, inkübasyon kanalları, kuluçka dolaplarının su giriş-çıkışları ve 0.1-1.0 gr ağırlığındaki larvaların her birinden üç örnekleme yapılarak ekimler gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için Anacker-Ordal's Agar, Tryptone Yeast Extract Salts Agar (TYESA) ve *F. psychrophilum* medium, FPM ²⁷, kullanılmıştır. Kuluçkahane suyu, sperm ve ovaryum sıvısının 0.1 ml'lik örneklerinden besiyerlerine ilave edilerek aseptik koşullarda eküvyon ve öze kullanılarak mikrobiyolojik ekimler yapılmıştır. Larvaların dalak ve böbreklerinden iğne ile, keseli larva ve yumurtalardan ise steril makas yada enjektör kullanılarak alınan örneklerin ekimleri yapılmıştır. Ekim yapılan petriyeler 18°C'de 5 gün etüvde inkübe edilmiştir ^{15,16,28}. İzole edilen bakteriler saflaştırıldıktan sonra kanlı agara ekilerek bu ortamda üremeyen bakteriler *F. psychrophilum* olarak kabul edilmiştir ²⁹. *F. psychrophilum* suşlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenerek identifikasyonlarında, klasik kültür yöntemleri, API 20E, API 50CH ve API ZYM hızlı teşhis kitleri (BioMerieux) kullanılmıştır ^{16,28,30-32}. API 20E, API 50CH ve API ZYM testleri; kullanım kılavuzlarına uygun olarak yapılmıştır. Çalışmada NCIMB 1947 İspanya referans suşu da testlerde kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. *F. psychrophilum* suşları Tryptone Yeast Extract Salts (TYES) Broth'a steril gliserin eklenerek -70°C'de stoklanmıştır ¹⁶.

Klasik kültür yöntemleriyle *F. psychrophilum*'un feno-

tipik özellikleri belirlenmiştir^{28,33,34}. AO mediumda üretilen kolonilerin üzerine %20'lik potasyum hidroksit ilave edilerek fleksirubin pigmentin varlığı tespit edilmiştir²⁸.

BULGULAR

Gökkuşluğu alabalığı kuluçkahanelerinde yapılan mikrobiyolojik incelemelerde 4 ayrı işletmeden 3'er örnek olmak üzere 12 örnek alınmıştır. İzolasyon çalışmalarının sonuçları *Tablo 1*'de verilmiştir. Sperm, ovaryum sıvısı, yumurtalar, larvalar ve su örneklerinden yapılan ekimlerden toplam 44 adet *F. psychrophilum* izolatu tespit edilmiştir.

Bu izolatların beşi anaç (ovaryum sıvısı), 14'ü yumurta, 17'si larva, 8'ise kuluçkahane inkübasyon suyu örneklerine aittir.

Bir, 3 ve 4 nolu işletme kuluçkahanelerindeki erkek anaçların 0.1 ml'lik sperm örneklerinden yapılan ekimlerde beyaz koloniler üremiş, spesifik sarı koloniler ürememiştir. İki nolu işletmenin kuluçkahanesinde ise herhangi bir üreme tespit edilememiştir. Yapılan incelemelerde sperm örneklerinde *F. psychrophilum* bulunamamıştır. Bir, 2 ve 4 nolu işletmelerdeki dişi anaçların ovaryum sıvısı örneklerinden (0.1 ml'lik) yapılan ekimlerde 5 *F. psychrophilum* izolatu izole edilmiştir.

Tablo 1. Dört gökkuşluğu alabalığı kuluçkahanesinden *Flavobacterium psychrophilum*'un izolasyonu

Table 1. Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* at four rainbow trout hatcheries

Örnekleme yeri	İzole edilen <i>F. psychrophilum</i> 'un sayısı
Sperm	0
Ovaryum sıvısı	5
Döllenmemiş yumurta	3
Döllenmiş yumurta	6
Gözlü yumurta	5
Keseli larva	5
0.1-1g larva	12
Giriş suyu	3
Çıkış suyu	5

Döllenmemiş yumurtada örneklerinden yalnızca 1, 2, 3 nolu işletmelere ait kuluçkahanelerde *F. psychrophilum* izolatu elde edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı 4 kuluçkahaneden alınan hem döllenmiş yumurta hem de gözlü yumurta örneklerinde *F. psychrophilum* tespit edilmiştir.

Aynı şekilde larval periyotta dört kuluçkahaneden toplam 17 *F. psychrophilum* izolatu elde edilmiştir. Ayrıca larval dönemde hastalık belirtisi göstermeyen larvalarda da *F. psychrophilum* izole edilmiştir. İşletmelerin kuluçkahane inkübasyon dolapları ve kuluçkahane kanal suyu örneklerinde ise toplam 8 adet *F.*

psychrophilum izolatu tespit edilmiştir.

Anacker-Ordal's Agar, Tryptone Yeast Extract Salts Agar (TYESA) ve *F. psychrophilum* Medium (FPM)'da 4-5 gün sonra sarı pigmentli parlak düzgün konveks koloniler üremiştir. Bu koloniler saflaştırıldıktan sonra elde edilen suşlar bakteriyolojik olarak incelenmiştir. Bu izolatların Gram (-) uzun çomak biçiminde, kayma hareketi gösteren, katalaz, fleksirubin pigmenti yönünden pozitif olduğu, jelatini ve kazeini hidrolize ettiği, O/F testi sonucunda glukoz kullanmadığı ve nişastayı hidrolize edemediği tespit edilmiştir. Sitokrom oksidaz testinde suşlar arasında değişkenlik olduğu bazı suşlar pozitif sonuç verirken bazı suşlar negatif sonuç vermişlerdir. İzolatların biokimyasal özellikleri homojenlik göstermiştir (*Tablo 2*).

Kırkdört izolatin ve referans suşun enzim aktivitesi API ZYM test sistemine göre belirlenmiştir. Suşların bu test sonucuna göre alkalın fosfataz, esteraz lipaz, lösin arilamidaz, fosfat asit naftol -AS-BI-fosfohidrolaz testleri pozitif, lipaz, arilamidaz, valin arilamidaz, tripsin, α -Kemotripsin, α -Galaktosidaz, β -Galaktosidaz, β -Glukuronidaz, α -Glukosidaz, β -Glukosidaz, N-acetyl- β -glucosaminidaz, α -Mannosidaz, β -Fucosidaz testleri negatif sonuç vermiştir. Esteraz, sistin arilamidaz testlerinde suşlara göre farklı sonuçlar alınmıştır (*Tablo 3*). API 20 E test kitleri ile yapılan test sonuçlarında; arginine dehidrolaz, lysine dekarboksilaz, ornithine dekarboksilaz, H₂S, üreaz, tryptophane deaminaz, indol, β -galaktosidaz, sitrat kullanımı ve VP (acetoin production) üretimi negatif sonuç vermiş. Gelatinase testi pozitif sonuç vermiştir. Glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnnoz, sukroz, melibioz, amygdalin ve arabinoz gibi karbonhidratları kullanmadığı görülmüştür (*Tablo 4*). *F. psychrophilum* izolatlarının API 50CH (BioMeriux) testindeki sonuçlar bu bakterinin karbonhidratları kullanmadığını (karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretemediğini) göstermiştir.

F. psychrophilum izolatlarının; glycerol, erythritol, D-arabinose, L-arabinose, ribose, D-xylose, adonitol, β -methyl-D-xyloside, galactose, D-glucose, D-fructose, D-manose, L-sorbose, rhamnose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, α -methyl-D-mannoside, α -methyl-D-glucoside, N-acetyl glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin, melezitose, D-raffinose, starch, glycogen, xylitol, β -gentiobiose, D-turanose, D-lyxose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconate, 5-keto-gluconate karbonhidrat-larını fermente edemediği görülmüştür.

Tablo 2. *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının fenotipik özellikleri**Table 2.** Phenotypic characteristics of *Flavobacterium psychrophilum* isolates

İzolat No	Bakteri İzolatları	Örnekleme Yeri	Gram Boyama	Kayma hareketi	Katalaz	Sitokrom Oksidaz	Fleksirubin	O/F	Kazein	Nişasta	Congo Red Test
1	E2-2	Ovaryum Sıvısı	-	+	+	-	+	-/-	+	--	-
2	E2-1	Ovaryum Sıvısı	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
3	M1	Ovaryum Sıvısı	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
4	S1-3	Ovaryum Sıvısı	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
5	S1.1K)	Ovaryum Sıvısı	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
6	M2-2	Döllenmemiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
7	E2-1	Döllenmemiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
8	R2-1	Döllenmemiş Yumurta	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-
9	E5-1	Döllenmiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	--	-
10	S7	Döllenmiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
11	S3-3	Döllenmiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
12	E2-3	Döllenmiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
13	M2-5	Döllenmiş Yumurta	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-
14	R4	Döllenmiş Yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
15	M1-	Gözlenmiş yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
16	M1-3	Gözlenmiş yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
17	R3-2	Gözlenmiş yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	--	-
18	S8	Gözlenmiş yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
19	E5-1	Gözlenmiş yumurta	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
20	M4-2	Keseli Larva	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
21	M4-3	Keseli Larva	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
22	SX-2	Keseli Larva	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
23	E3-2	Keseli Larva	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-
24	M4-1	Keseli Larva	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
25	M13	Giriş Suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	--	-
26	S1-1	Giriş Suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
27	E3-1	Giriş Suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
28	M1-1	Çıkış Suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
29	S2-3	Çıkış Suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
30	M8	Çıkış Suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
31	E1-2	Çıkış suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
32	R4-1	Çıkış suyu	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
33	M4-1	Larva (0.2)	-	+	+	-	+	-/-	+	--	-
34	E1-8	Larva(1g)	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
35	E1-6	Larva (1g)	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-
36	E1-5	Larva (1g) K	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
37	M6-1	Larva (0.2g) S	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
38	R6-1	Larva (1g) K	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
39	R4-3	Larva (0.1gr) B	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
40	E3-2	Larva (0.1gr) B	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
41	M12-2	Larva (0.1gr) B	-	+	+	+	+	-/-	+	--	-
42	S1-4	Larva (0.2g) S	-	+	+	-	+	-/-	+	-	-
43	M5-1	Larva (0.2g) B	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-
44	M-11	Larva (0.8g) B	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-
45	NCIMB	Referans suş	-	+	+	+	+	-/-	+	-	-

Tablo 3. *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının API ZYM testindeki enzim özellikleri
Table 3. Enzymes characteristics of *Flavobacterium psychrophilum* isolates in API ZYM test

API ZYM	Flavobacterium psychrophilum izolatları																	
	R	1	2	3-8	9-13	14-15	16-20	21	22-24	25	26	27	28-29	30	31-34	35-38	39-42	43-44
Alkalin fosfatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esterase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
Esterase lipase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystine arylamidase	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Tyripsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phosphatase acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Napthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 4. *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının API 20 E testindeki fenotipik özellikleri

Table 4. Phenotypic characteristics of *Flavobacterium psychrophilum* isolates in API 20 E test

F. psychrophilum İzolatları	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1-44 (Tüm İzolatlar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45* (Referans Suş)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1- β-galactosidase, **2-** arginine dihydrolase, **3-** lysine decarboxylase, **4-** ornithine decarboxylase, **5-** citrate utilization, **6-** H₂S, **7-** urease, **8-** tryptophane deaminase, **9-** indol, **10-** VP, **11-** gelatinase deaminase, **12-** glucose, **13-** mannitol, **14-** inositol, **15-** sorbitol, **16-** rhamnose, **17-** sucrose, **18-** melibiose **19-** amygdalin, **20-** arabinose, * Referans suş

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliğinde *F. psychrophilum*'un neden olduğu salgınlar önemli bir yer tutmaktadır¹⁻⁶. Ülkemizde *F. psychrophilum*'un ilk izolasyonu 1990'lı yıllarda yapılmıştır. Daha sonra ülkenin farklı bölgelerinde geniş bir yayılım göstererek gökkuşağı alabalığı işletmelerinde ciddi sorunlara neden olmuştur. Bu çalışmada önemli kayıplara neden olan *F. psychrophilum*'un gökkuşağı alabalığı kuluçka hanelerindeki lokalizasyonları incelenerek epizootolojisi konusunda bilgi edinilmiştir.

Gökkuşağı alabalığı anaçlarında ovaryum sıvısından *F. psychrophilum*'un izole edilmesi önceki çalışmalarla^{7,14,22} paralellik göstermektedir. Ekman ve ark.¹¹,

anaç balıkların *F. psychrophilum* patojeninin taşıyıcısı olduğunu belirtmiştir. Madetoja ve ark.¹⁷, anaç balıkları bu patojenin neden olduğu enfeksiyonunun kaynağı olarak tanımlamıştır. Holt⁷ anaç balıkların internal organlarından *F. psychrophilum*'un varlığını tanımlarken, Rangdale ve ark.²² spermden bu bakteriyi izole edememiştir. Bu çalışma sonucunda da ovaryum sıvısından *F. psychrophilum* izole edilmiş ancak anaç erkek balıkların spermlerinden izole edilememiştir. İnceleme yapılan anaç balıklarda herhangi bir hastalık belirtisi olmaksızın *F. psychrophilum*'un izole edilmesi enfeksiyonun taşıyıcısı olduğunu göstermektedir.

F. psychrophilum izolatlarının lipolitik ve proteolitik enzim aktivitesine sahip olduğu, ancak, karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretme yeteneğinde

olmadığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir³⁵⁻³⁷. Bu çalışmada *F. psychrophilum* izolatlarının karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzimleri üretmediği tespit edilmiştir. *F. psychrophilum* izolatlarının API ZYM sonuçlarında referans suşla karşılaştırıldığında esteraz ve sistin aralamidas enzimleri dışında diğer tüm testlerin benzer olduğu ve tüm izolatların benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Madetoja ve ark.³⁷ yapmış oldukları çalışmada farklı ülkelerden 8 farklı salgın esnasında izole ettikleri *F. psychrophilum* suşları ve referans suşun API ZYM sonuçlarını karşılaştırdıklarında, suşlar arasında esteraz, esteraz lipaz, lipaz, sistin arilamidaz, tripsin enzimi üretimininde farklılıklar görüldüğünü belirtmişlerdir. Ostland ve ark.³⁶, gökkuşığı alabalıklarında enfeksiyonlara neden olan *F. psychrophilum*'un esteraz reaksiyonunun suşlar arasında farklı, esteraz lipaz, lipaz ve diğer tüm testlerin homojen olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada iki enzim dışında tüm testlerin homojen olması diğer araştırmacıların bulgularını desteklemektedir. Suşlar arasında bu iki testte görülen farklılıkların, çalışmada 4 farklı işletme bulunması ve yumurta, larva, inkübasyon suyu gibi farklı örneklerin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. API 20E sonuçları Austin ve Austin¹⁹, Buller²⁸'in bildirdiği sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Madsen ve ark.²⁹ larvalarda genellikle hastalıklarla ilişkili olarak sadece virülens suşların bulunduğunu, anaç balıklarda virulent ve virulent olmayan suşların birlikte bulunduğunu bildirmektedir. Kuluçkahanelerde hastalığın ortaya çıkışında, muhtemelen virülens bakterileri bulduran latent taşıyıcı anaçların sebep olduğunun belirtilmesine rağmen, anaç balıklardaki virulensi az olan suşların rolleri açıklanamamıştır.

Bu çalışmada *F. psychrophilum*'un anaçlardan, kuluçkahane suyundan ve yumurtalardan izole edilmesi, anaçlardan ve yumurtadan larvaya bulaşmanın mümkün olabileceğini göstermektedir. Bunun için işletmelerde iyi bir yönetimin uygulanması ve yumurtaların dezenfeksiyonu gerekmektedir.

F. psychrophilum'un tedavisinde yaygın olarak oksitetrasiklin ve florfenikol kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımına bağlı olarak direnç gelişimi nedeniyle hastalıkların tedavisinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu patojen gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinde yumurtadan çıkan larvaların ilk 4-8 haftalık dönemlerinde hastalık oluşturmaktadır. Bu dönemde gökkuşığı alabalığı larvalarında immun sistemin aktivasyonu tamamlanmamış olması nedeniyle etkin bir immunizasyon sağlanama-

maktadır. Kimyasallarla yapılan tedavilerden de etkili sonuçlar alınmamaktadır. Hastalığın en önemli korunma yolu bu bakterinin kuluçkahanelerde yayılmasına neden olan lokal odakların belirlenerek bu noktalarda koruyucu önlemlerin alınmasıdır. Salgınların önüne geçmede bakterilerin epidemiyolojilerinin ve genetik özelliklerinin bilinmesi fayda sağlamaktadır. Bu anlamda daha sonra yapılacak araştırmalarda farklı kaynaklardan izole edilen bu suşların genetik özelliklerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Madsen ve Dalsgaard¹⁴ yaptıkları çalışmada, kuluçkahanelerde *F. psychrophilum*'un neden olduğu hastalığın önüne geçilmesi için; kuluçkahanelerde kuyu suyu kullanılması ve yumurtalarında dezenfeksiyonunu kapsayan iyi bir yönetim uygulaması ile mümkün olabileceğini belirtmektedirler.

Bu çalışmada *F. psychrophilum*'un anaçlardan, kuluçkahane suyundan, yumurtadan ve larvalardan izole edilmesi, bu patojenin horizontal ve vertikal yolla bulaşabileceğini göstermektedir. Bu nedenle *F. psychrophilum*'un kontrolü için,

- İyi kalitede su kullanılması ve sürekli su kalitesinin korunması, bundan dolayı kuluçkahane tercih kaynak suyu veya kuyu suyu kullanılması,
- Kuluçkahaneye giren suyun filtre edilmesi, UV lambaları veya ozon ile steril edilmesi,
- Anaç balıklara profilaktik amaçla antibiyotik uygulanması,
- Yumurtaların 100mg/lt hidrojen peroksit ile 10 dak. veya 200 mg/lt glutaraldehit ile 20 dak. dezenfekte edilmesi,
- Kuluçkahane ekipmanının %1 -2 formalin ile 10 dak. veya %0.5 -1 klorin ile 2 dak. dezenfekte edilmesi,
- Larva yetiştiriciliğinde strese neden olan faktörlerin önüne geçilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Balta F:** Kültürü yapılan Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 19 Eylül 1997, Cilt II Eğirdir - İSPARTA, 621-648, 1997.
2. **Çağrgan H, Tanrıkul TT, Balta F:** Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eighth International Conference "Diseases of Fish and Shell Fish". 14-19 Sep. 1997. Edinburg, Scotland European Association of Fish Pathologists, 1997.
3. **Korun J, Timur G:** Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus*

mykiss) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. *İstanbul Üniv Su Ürünleri Derg.* 12,15-30, 2001.

4. **Diler Ö, Altun S, Işıklı BI:** Kültürü yapılan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. *Süleyman Demirel Üniv Fen Bil Enst Derg.* 7 (1): 1-8, 2003.

5. **Arda M, Seçer S, Sarıyüpoğlu M:** Balık Hastalıkları. Medisan Yayın Serisi 56, s. 142, Ankara, 2002.

6. **Timur G, Timur M:** Balık Hastalıkları. İstanbul Üniv Su Ürünleri Fak, Yayın No: 5, s. 538, Dilek Ofset İstanbul, 2003.

7. **Holt RA:** *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. *PhD Thesis.* Oregon State University, Corvallis OR, USA, 1987.

8. **Lorenzen E, Dalsgaard I, From J, Hansen EM, Horlyck V, Korsholm H, Mellergaard S, Olesen NJ:** Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 11, 77-79, 1991.

9. **Austin B:** The recovery of *Cytophaga psychrophila* from two cases of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, *Walbaum*) fry syndrome in the U.K. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 12, 207-208, 1992.

10. **Toranzo AE, Barja JL:** Fry mortality syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the causative bacterium *Flexibacter psychrophilus*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 13, 30-32, 1993.

11. **Ekman E, Börjeson H, Johansson N:** *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Dis Aquat Org*, 37, 159-163, 1993.

12. **Amita K, Hoshino M, Honma T, Wakabayashi H:** An investigation on the distribution of *Flavobacterium psychrophilum* in the Umikawa river (Japanese). *Fish Pathol*, 35, 193-197, 2000.

13. **Decostere A, Lammens M, Haesebrouck F:** Difficulties in experimental infection studies with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using immersion, oral, and anal challenges. *Res Vet Sci*, 69,165-169, 2000.

14. **Madsen L, Dalsgaard I:** Water recirculation and good management:potential methods to avoid disease outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis*, 31, 799-810, 2008.

15. **Wiklund T, Kaas K, Lönnström L, Dalsgaard I:** Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 14, 44-46, 1994.

16. **Madetoja J:** *Flavobacterium psychrophilum*: characterisation, experimental transmission and occurrence in fish and fish farming environments. Academic dissertation, Finland, 1-37, 2002.

17. **Madetoja J, Dalsgaard I, Wiklund T:** Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments. *Dis Aqua Org*, 52, 109-118, 2002.

18. **Cipriano RC, Schill WB, Teska JD, Ford LA:** Epizootiological study of bacterial cold-water disease in Pacific salmon and further characterization of the etiologic agent, *Flexibacter psychrophila*. *J Aquat Anim Health*, 8, 28-36, 1996.

19. **Austin B, Austin DA:** Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. Third (Revised) ed. p. 457, Praxis publishing, Chichester, U.K., 1999.

20. **İspir Ü, Şeker E, Sağlam N, Dörücü M:** Doğu Anadolu Bölgesinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde görülen *Flavobacterium psychrophilum*

enfeksiyonunun araştırılması. *Fırat Üniv Fen Müh Bil Derg*,16 (4): 718-724, 2004.

21. **Barker GA, Smith SN, Bromage NR:** The bacterial flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L., eggs and its relationship to developmental succes. *J Fish Dis*, 12, 281-293, 1989.

22. **Rangdale RE, Richards RE, Alderman DJ:** Isolation of *Cytophaga psychrophila*, causal agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) from reproductive fluids and egg surfaces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 16, 63-67, 1996.

23. **Brown LL, Cox WT, Levine RP:** Evidence that the causal agent of bacterial coldwater disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis Aquat Org*, 29, 213,218, 1997.

24. **Kumagai A, Yamaoka S, Takahashi K, Fukada H, Wakabayashi H:** Waterborne transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in coho salmon eggs. *F Pathol*, 35, 25-28, 2000.

25. **Holt RA, Rohovec JS, Fryer JL:** Bacterial coldwater disease. In, Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (Eds): Bacterial Diseases of Fish. pp. 3-23. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993.

26. **Dalsgaard I, Madsen L:** Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (*Walbaum*), reared at Danish freshwater farms. *J Fish Dis*, 23, 199-209, 2000.

27. **Daskalov H, Austin DA, Austin B:** An improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Lett Appl Microbiol*, 28, 297-299, 1999.

28. **Buller NB:** Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. CABI Publishing, UK. 2004.

29. **Madsen L, Moller JD, Dalsgaard I:** *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (*Walbaum*), hatcheries: Studies on broodstock, egg, fry and environment. *J Fish Dis*, 28, 39-47, 2005.

30. **Sarti M, Giorgetti G, Manfrin A:** Method for rapid diagnosis of visceral myxobacteriosis in reared trout in Italy. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 12, 53, 1992.

31. **Dalsgaard I:** Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other *Cytophaga*-like bacteria pathogenic for fish. *Annu Rev Fish Dis*, 1, 127-144, 1993.

32. **Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST:** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, 485-487, 1994.

33. **Collins CH, Lyne PM:** Microbiological Methods. Butterworths. p. 521, 1976.

34. **Cowan ST, Steel KJ:** Manual for the identification of medical bacteria. p. 216, Cambridge of University Press, 1970.

35. **Lorenzen E, Olesen NJ:** Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome 2: Serological studies. *D Aquat Org*, 31, 209-220, 1997.

36. **Ostland VE, McGrogan DG, Ferguson HW:** Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flavobacterium psychrophilus*, *J Fish Dis*, 20, 443-451, 1997.

37. **Madetoja J, Hanninen, ML, Hirvela-Koski V, Dalsgard I, Wiklund T:** Phenotypic and genotypic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from Finnish fish farms. *J Fish Dis*, 24, 469-479, 2001.