



Fırtına Deresindeki Gökkuşluğu Alabalık Çiftliklerinde izole edilen *Aeromonas* spp. İzolatlarının Antimikrobiyel Hassasiyetin Belirlenmesi ^[*]

Fikri BALTA

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, Rize/Türkiye

Geliş/Received: 25.07.2020

Kabul/Accepted: 16.09.2020

Atıf yapmak için: Balta, F. (2020). Fırtına Deresindeki Gökkuşluğu Alabalık Çiftliklerinde izole edilen *Aeromonas* spp. İzolatlarının Antimikrobiyel Hassasiyetin Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hayv. Dergisi*, 5(3), 397-407.

How to cite: Balta, F. (2020). Determination of the Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from Rainbow Trout Farms on the Fırtına River. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(3), 397-407.

<https://orcid.org/0000-0002-1823-5823>

***Sorumlu yazarın:**

Fikri BALTA
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Zihni Deri.n Yerleşkesi, Fener Mah. 53100 / Rize, Türkiye
✉: fikri.balta@erdogan.edu.tr
Cep telefonu : +90 (532) 427 64 89
Telefon : +90 (464) 223 33 85 / 1436
Faks : +90 (464) 223 41 18

Öz: Bu çalışmada, Fırtına deresi üzerinde kültürü yapılan gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde hastalıklı balıklarda *Aeromonas* spp.'nin varlığı araştırılmıştır. Tipik hastalık belirtileri gösteren balıkların dalak ve böbrek örneklerinden besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 20±2°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri izolatlarına hareket, katalaz, oksidaz ve OF besiyerinde oksidatif/fermentasyon testleri yapılmıştır. API 20NE test kiti kullanılarak şuşlar biyokimyasal olarak tanımlanmıştır. Motil *Aeromonas* spp. izolatlarının antimikrobiyellere karşı olan hassasiyetleri disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir. En yüksek direnç ampicillin ve amoxicillin %100, sulfametoksazola %79.31, oksitetrasikline %62,07 olarak tespit edilmiştir. Daha düşük direncin sırasıyla, eritromisin %51.72, trimetoprim/sulfametoksazol %48.27, oksolinik asid %37.93, florfenikole %17.24 ve en az oranda bir kinolon olan enrofloksasine %10.34 karşı şekillendiği belirlenmiştir. Oksitetrasikline dirençli olduğu saptanan 20 izolatın 7'sinde *tetA* varlığı tespit edilmiştir. Sekiz izolatın sınıf 1 integron ve 16 izolatın ise sınıf 2 integron gen yapılarını taşıdığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Aeromonas* spp., integron gen yapıları, *tetA*, *tetB*, antimikrobiyal direnç.

Determination of the Antimicrobial Susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from Rainbow Trout Farms on the Fırtına River

Abstract: In this study, the presence of *Aeromonas* spp. isolated from diseased rainbow trout in aquaculture on Fırtına River was investigated. Specimens from spleens and kidneys obtained from diseased fishes showing typical clinical signs were inoculated in media. The samples were incubated at 20±2 °C for 48 hours. Motility, catalase, oxidase and oxidative/fermentative tests were performed to the bacterial isolates. According to these test results, strains were biochemically identified by using API 20NE Kit. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. isolates were tested by disk diffusion method. The highest resistance level to antimicrobials using in the treatment of bacterial fish diseases was detected against ampicillin and amoxicillin as 100%, sulfamethoxazole 79.31%, oxytetracycline as 62.07%. The lower resistance levels were to erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, oxolinic acid as 51.72%, 48.27%, and 37.93%, respectively. The lowest resistance level was determined to florfenicol and enrofloxacin as 17.24% and 10.34%. In PCR typing for 20 oxytetracycline-resistant strains, we detected seven strains had *tetA*. Eight strains were detected to harbor class 1 integron. Sixteen strains were detected to harbor class 2 integron.

Keywords: *Aeromonas* spp., integron gene structures, *tetA*, *tetB*, antimicrobial resistant.

***Corresponding author's:**

Fikri BALTA
Recep Tayyip Erdoğan University, Fisheries Faculty, Department of Diseases. Fener Mah., Zihni Derin Campus, 53100 / Rize, Türkiye.
✉: fikri.balta@erdogan.edu.tr
Mobile telephone: +90 (532) 427 64 89
Telephone : +90 (464) 223 33 85 / 1436
Fax : +90 (464) 223 41 18

[*] , Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenen 2008.103.02.1 numaralı projeden üretilmiştir.

This study was produced from the project numbered 2008.103.02.1 supported by the Scientific Research Unit of Recep Tayyip Erdoğan University.

GİRİŞ

Gökkuşluğu alabalığı ülkemizde kültürü yapılan önemli bir tür olup iç su balıkları üretiminin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Ülkemizde 1970'li yıllarda yurtdışından yumurta getirilmesi ile başlayan gökkuşluğu alabalık üretimi, son yıllarda ülkemiz geneline yayılmış ve sayıları 1000'ni aşkın işletme ile devam etmektedir. Ülkemizde kültürü yapılan gökkuşluğu alabalık çiftliklerinde yavru ve porsiyonluk boydaki balıkların yoğun stoklaması, düşük su kalitesi (pH, amonyak, nitrit vs) ve su sıcaklığına bağlı ani değişimler nedeniyle balıklarda stres kaynaklı Motil *Aeromonas* enfeksiyonlarına sıklıkla rastlanılmaktadır. Motil *Aeromonas* enfeksiyonları balıkların yoğun stoklamasına ve suyun organik yükündeki artışa bağlı olarak %87,6'a varan yüksek miktardaki ölüm nedeni ile büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Toranzo vd., 1984; Lee vd., 2000).

Aeromonas türleri tatlı su balıklarında hemorajik septisemi ile seyreden enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Munro, 1982; Diker, 1999). Balıklarda fırsatçı patojen olarak enfeksiyona neden olan bu patojenler özellikle organik atıklarla kirlenmiş sularda bol miktarda ve ayrıca tuzlu sularda dahil olmak üzere her türlü su kaynaklarında bulunduğu bildirilmektedir (Southage, 1993; Diler & Altun, 1994).

Balıklardaki bakteriyel hastalık etkenlerinin balık sağlığı ve ülke ekonomisine olan etkileri değişmekle birlikte, bu etki erken müdahale edilmediği takdirde büyük ekonomik kayıplara neden olabilmektedir. Akut enfeksiyonlar, balıklarda yüksek oranda ölümlere neden olurken, kronik vakalarda düşük seviyede kayıplara yol açmakta, balıklarda istenmeyen dış semptomlar oluşturan enfeksiyonlar tüketici tarafından tercih edilmemesi ekonomik değerini düşürmektedir (Stoskopf, 1993). Balıklardaki bakteriyel enfeksiyonlara neden olan türler arasında *Aeromonas* cinsi bakterilerde bulunmaktadır. *Aeromonas*lar, karakteristik olarak tatlı su bakterileri olup hareketli türleri *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* sucul hayvanların mikrobiyal florasının bileşenleri olmakla birlikte alabalık, koi, sazan gibi tatlı su balık türlerinde de hemorajik septisemiye neden oldukları rapor edilmiştir (Aoki, 1999; Noga, 1996). *Aeromonas* spp. Gram-negatif bir bakteri türü olup, hem tatlı suda hem de tuzlu suda yaygın olarak bulunmakta ve sağlıklı balıkların normal barsak mikroflorasının bir kısmını oluşturduğu bildirilmektedir. Dünya genelinde yaygın olan motil *Aeromonas* cinsi bakterilerin, daha çok tatlı sularda görülmekle birlikte acı sularda, lağım sularında, denizde ve klorlanmış içme sularında bulunduğu bildirilmiştir. Sucul ortamın doğal unsurlarından olan *Aeromonas*'lar, amfibilerde (kurbağalarda), reptillerde (sürüngenlerde), kuşlarda, balıklarda, yumuşakçalarda ve insanlarda akut, subakut, kronik veya latent olarak enfeksiyonlara neden olduğu ve

hastalık etkenleri saf olarak izole edildiği çeşitli kaynaklarda rapor edilmiştir (Austin & Austin, 1993; Bremer vd., 2003; Mcnicol vd., 1980; Rahim vd., 1984; Saavedra vd., 2004). Özellikle, *A. hydrophila* kahverengi alabalık, chinook salmonlarda, gökkuşluğu alabalığı, ayu balığı, sazan, yayın balığı, yılan balığı, goldfish ve tilapia gibi doğal balıklarda ve kültürü yapılan balıklarda hemorajik septisemiye neden olduğu bildirilmiştir (Egusa, 1978; Schaperclaus vd., 1992; Yavuzcan Yıldız vd., 2005).

Bu çalışma kapsamında gökkuşluğu alabalık çiftliklerinden *Aeromonas* spp.'lerin varlığı ortaya konulmuştur. İzole edilen izolatların API 20E test kitleri ile birlikte bazı tamamlayıcı biyokimyasal test sonuçları ile tür ayrımı yapılmıştır. Edilen izolatlara karşı tedavi amaçlı kullanılan antimikrobilyellere karşı hassasiyet testleri yapılmıştır. Ayrıca, izolatların PZR ile integron taşıyan R-plazmidlerinde bulunan tetrasiklin direnç genleri (*tetA* ve *tetB*) ve *Class I ve II* integronların varlığı da araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hasta Balıkların örnekleme ve Muayenesi:

Çalışmada 2008-2010 yılları arasında Fırtına deresi ve kolları üzerinde bulunan 15 farklı gökkuşluğu alabalık çiftliğinden örnekleme yapılmıştır. İşletmelerde 0,5-2gr'dan porsiyonluk(200-250 gr) boya kadar hastalıklı balıklardan örnekleme yapılmıştır. Balık örnekleri mevsimsel periyotlar halinde 15 gün aralıklarla ayda iki kez olarak alınmıştır. Fakat kış aylarında bazen hava şartlarına bağlı olarak ayda tek örnekleme yapılmıştır.

Denizle bağlantılı olan bazı balık çiftliklerine Haziran ayında deniz suyunun ısınması nedeniyle Karadeniz'deki yüzer ağ kafeslerde bulunan balıkların tatlı suya nakledildiği gözlenmiştir. Tatlı suya taşıma ve adaptasyona bağlı meydana gelen strese bağlı olarak renkte kararırma, deride ülser, gözlerde kanama ve exophthalmus, solungaç kapaklarında ve deri üzerindeki yaygın hemorajilerin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Hastalığa ait semptomların Motil *Aeromonas* spp. veya *Vibrio* spp. enfeksiyonu belirtileri ile benzerlik göstermesi nedeniyle hastalığın *Aeromonas* veya *Vibrio* enfeksiyonu olabileceği göz önüne alınarak balıkların böbrek, dalak ve derideki ülserli bölgeden uygun besi yerlerine ekimler yapılmıştır.

Hastalık Etkeninin İzolasyonu: Hastalıktan ölen balıklarda görülen semptomlara benzer tipik hastalık semptomları gösteren balıklardan uygun besi yerlerine ekimler yapılmıştır. Hastalıklı balıkların özellikle böbrek, dalak, derideki veya kuyruk sapındaki ülserli lezyonlarından Anacker Ordal Agar (AOA) ve Broth (AOB), Tryptone Soy Agara (TSA) ve Broth (TSB), Brain Heart Infusion Agar (BHIA) ve Broth (BHIB), ayrıca Shotts ve Rimler tarafından bildirilen Differensial Rimer-Shotts Agara (RS Agar)

ekimler yapılmıştır. Denizden tatlı suya nakledilen balıkların vibriosis olabileceği göz önüne alınarak balıkların böbrek, dalak ve derideki ülserli bölgelerden %1,5 tuz (NaCl) ilave edilmiş TSA ve BHIA ekimler yapılmıştır. Ayrıca *Vibrio* lar için selektif besi yeri olan TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) Agara ekimler yapılmıştır. Ayrıca, *Aeromonas* ve *Pseudomonas*'ları ayırt edici glutamate starch phenol red (GSP) agara ekimler yapılmıştır. Bu besi yerleri 20±1°C'de bakterilerin üremesi için 3-5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır ve hastalık etkenleri saf olarak izole edilmiştir. Bu besi yerlerinde saf olarak izole edilen basil şeklindeki bakterilerin hareketli ve Gram negatif olduğu tespit edilmiştir. Test sonuçlarına göre bakterilerin *Aeromonas*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* cinsine ait olma ihtimaline karşı bakteriler selektif besiyerlerine ekimler yapılarak cins bazında ayırt edilmiştir. İzole edilen 330 adet saf koloniye antimikrobiyel hassasiyet testleri yapılmıştır. Saf izolatlar sıvı besi yerlerinde üretilip %20 gliserol içeren ependorf tüplerde homojenize edilerek biyokimyasal testler yapılabileceği kadar -20°C'de derin dondurucuda stoklanmıştır.

İzole Edilen Bakterilerin Teşhisi: Stoktan çıkarılıp TSA'ya ekilen izolatların 24 saatlik taze saf kolonilerine ilk önce hareket muayenesi yapılmıştır. Hareket muayenesinde hareketli olan bakterilere sırasıyla Gram boyama, oksidaz ve katalaz testleri yapılmıştır. Ayrıca hareket pozitif, Gram negatif, katalaz ve oksidaz testleri pozitif olan bakteri şuşların *Aeromonas*, *Pseudomonas* ve *Vibrio* olma ihtimaline karşı selektif besiyerleri kullanılarak, *Aeromonas* spp. ve *Pseudomonas* spp. ayırt etmek için GSP agara, *Vibrio* spp.'ler için spesifik besi yerleri TCBS agara ekim yapılmıştır. GSP agarda meydana gelen renk değişimine göre sarı olan şuşlar *Aeromonas* spp. ve menekşe (eflatun) renkte olan şuşlar *Pseudomonas* spp. olarak değerlendirilmiştir. TCBS agarda meydana gelen sarı koloniler ise *Vibrio* spp. olarak değerlendirilmiştir. Oksidatif-fermantasyon test sonucu pozitif olan şuşları *Vibrio* spp. olma ihtimaline karşılık O/129 vibriostatik (150 µg) ajana duyarlılık testi de yapılmış ve O/129 testine dirençli şuşların *Aeromonas* spp. olabileceği düşünülerek idenfikasyonu için API 20NE test kitleri kullanılmıştır. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e göre *Aeromonas* spp.'lerin tür teşhisini yapmak için Tablo 1'de bildirilen biyokimyasal testlerin yapılmasına gereksinim duyulmuştur.

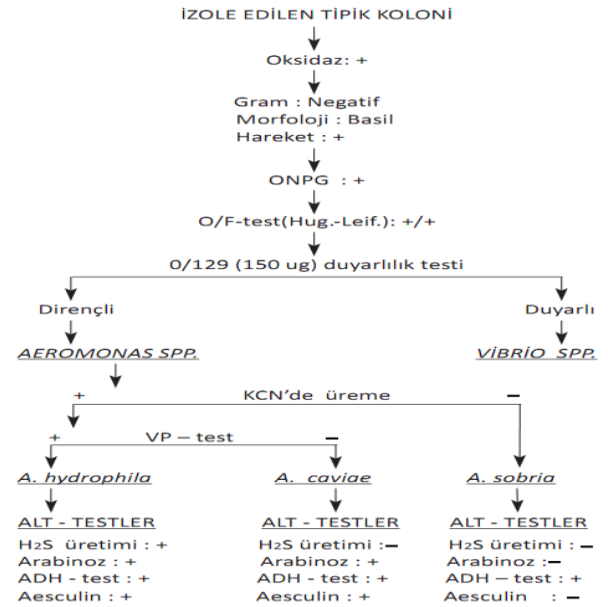
Bu testlere ilaveten, hareketli, basil ve koko-basil şeklindeki, Gram negatif, katalaz ve oksidaz testi (+), oksidatif/fermantatif testinin her ikisinde pozitif (+/+) olan şuşlara Austin ve Austin, (1999) tarafından bildirilen yonteme göre API 20NE (bioMérieux) test kitleri kullanılarak idenfikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kısaca, TSA'da üretilen 24 saatlik taze kültürlerdeki bakteri kolonilerinden 3-5 koloniden alınan örnekler steril API %0,85 NaCl içeren fizyolojik tuzlu suda vorteks yardımıyla

homojenize edilerek MacFarland 0,5'e ayarlanmıştır. Bu süspansiyon steril Pasteur pipeti yardımıyla API 20NE test kitlerindeki NO₃-PNPG kuyucuklarına kadar prosedüre uygun bir şekilde doldurulmuştur. Bu süspansiyondan 200µl alınarak API AUX Medium'a ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra GLU-PAC aralığındaki kuyular doldurulmuştur. Test kitleri 25±1°C'de 24 saat ve 48 saat inkübasyona bırakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca, klasik biyokimyasal testlerden OF testi, OPNG testi, indol testi, nitrat testi, simon sitrat testi ve triple sugar iron (TSI) agarda üçlü şeker testi yapılmıştır. Bu testlere ait test sonuçları Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 1. *Aeromonas* spp.'lerin Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'e göre teşhisi.

Table 1. Diagnosis of *Aeromonas* spp. According to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Biyokimyasal testler	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. veronii</i>
O/129	-	-	-	-
KCN growth	+	+	-	d
ONPG	+	+	-	+
Esculin hydrolysis	+	+	-	+
Citrat, Simons	d	d	-	+
H ₂ S production	+	-	-	-
D-glikoz, gaz	+	-	-	+
D-glikoz, asit	+	-	+	+
VP	+	-	d	+
Metil red	+	+	-	+
İndol test	+	+	+	+
L-Arabinose, asit	+	-	-	-
Lysine decarboxylase	d	-	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	+
Oksidaz	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+
Üreaz	-	-	-	-



Şekil 1. Motil *Aeromonas* spp.'lere ait idenfikasyon şeması.

Figure 1. Identification scheme of Motil *Aeromonas* spp.



Şekil 2. Bakteri süspansiyon ile doldurulmuş API 20NE test kitinin ilk görünümü.

Figure 2. First view of API 20NE test kit filled with bacteria suspension.

Antimikrobiyel Direnç Testi: Antimikrobiyal hassasiyet deneyleri *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014) ölçütlerine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile Mueller Hinton agarda (MHA) yapılmıştır. Hazırlanan steril MHA'nın kalınlığı dijital kompas yardımı ile ölçülerek standarda yakın bir kalınlık (4 mm) oluşturulmuştur. *Aeromonas* izolatları 25°C'de TSA'da üretilen 24 saatlik kültürlerden steril olarak alınan koloniler steril izotonik tuzlu suda McFarland No: 0,5 bulanıklığına ayarlanmıştır. Disk-dağıtıcı yardımı ile antibiyotik diskleri besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. MHA'da 25°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dijital kompas yardımıyla okunmuştur.

Bu çalışmada, antibiyotik diskleri sırasıyla ampisilin (10µg), amoksisilin (25µg), enrofloksasin (5 µg), eritromisin (15µg), florfenikol (30µg), oksalidik asit (2µg), oksitetrasiklin (30µg), sulfametoksazol (25µg), streptomisin (10 µg) ve trimetoprim+sulfametoksazol (25 µg) kullanılmıştır. Ölçülen zon çapları Tablo 2'deki antibiyotik standart zon çaplarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Antibiyotik hassasiyet testinde ölçülen standart zon çapı ölçüleri.

Table 2. Standard zone diameter measurements measured in antibiotic sensitivity test.

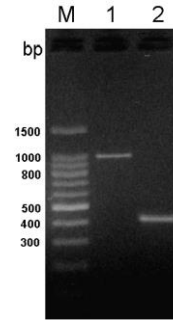
Antibiyotikler	Hassas	Orta Hassas	Dirençli
Ampisilin (AM-10 µg)	≥17	14-16	≤13
Amoksisilin (AX 25 µg)	≥18	14-17	≤13
Enrofloksasin (ENR-5 µg)	≥22	18-21	≤17
Eritromisin (E-15 µg)	≥23	14-22	≤13
Florfenikol (FFC-30 µg)	≥18	13-17	≤12
Okzalidik Asit (OA-2 µg)	≥13	11-12	≤10
Oksitetrasiklin (OTC-30 µg)	≥ 19	15-18	≤14
Streptomisin (SR-10 µg)	≥15	12-14	≤11
Sulfametoksazol (RL-25 µg)	≥17	13-16	≤12
Trimetoprim+Sulfametoksazol (SXT-25 µg)	≥16	11-15	≤10

Sınıf 1 ve 2 integronların varlığının belirlenmesi:

Sınıf 1 ve 2 integronların varlığı PZR testi ile belirlenmesinde Tablo 3'de verilmiş olan oligonükleotid primer dizileri kullanılmıştır (Levesque vd., 1995; White vd., 2001; Aarestrup vd., 2003). Standart PZR testleri 50µL hacimde yapılmıştır. 5µL 10X PZR tamponu (100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, %1 Triton X-100), 5µL 10X deoksiniükleotid trifosfat karışımı (her biri 2mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2µL her bir primer

(25pmol/µL) (5'CS/3'CS), 34µL PZR suyu, 1µL *Taq* DNA polimeraz ve 1µL kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Çoğaltım için döngü koşulları: 5 dk 94°C, 1 dk 55°C, 3 dk 72°C (bir döngü); 15 sn 94°C, 30 sn 55°C, 3 dk 72°C (24 döngü) ve son sentez için 5 dak. 72°C ve en son olarak 4-10°C'de saklama şeklinde ayarlanmıştır. PZR ürünleri 0,5 µg/mL etidiyum bromür içeren % 1'lik agaroz jelde 40 Volt doğru akımda 0,5-3 saat yürütülmüş ve ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

Tetrasiklin direnç genlerinin varlığının belirlenmesi: Fenotipik olarak oksitetrasikline dirençli olduğu belirlenen 20 izolat *tetA* ve *tetB* gen taşıyıcılığı açısından analiz edilmiştir. Bu amaçla, standart PZR çalışması 50µL hacimde yapılmıştır. Beş mikro-litre 10 x PZR tamponu (100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, %1 Triton X-100), 5µL 10 x deoksiniükleotid trifosfat karışımı (her biri 2mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2µL her bir primer kaynağı (25pmol/µL), 34µL arınık iyonsuz su, 1µL *Taq* DNA polimeraz ve 1µL kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Çoğaltım için döngü koşulları: 2 dk 94°C, 1 dk 55°C, 3 dk 72 °C (bir döngü); 15 sn 94°C, 30 sn 55°C, 3 dk 72°C (24 döngü) ve son sentez 5 dk 72 °C ve en son olarak 4-10°C'de saklama şeklinde kullanılmıştır. PZR ürünleri agaroz jelde 40 Volt doğru akımda 0,5-3 saat yürütülmüştür. Ultraviyole ışığı altında *tet* DNA amplikonları gözlenilmiştir ve görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. *tet(A)* ve *tet(B)* spesifik PZR'ler sırasıyla 917 bp ve 375 bp ürünün görünümü Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3. OTC direnç determinantlarının PZR analizi. M, 100bp DNA Ladder (Promega, ABD); 1. *tetA* amplikon; 2. *tetB* amplikon. **Figure 3.** PCR analysis of OTC resistance determinants. M, 100bp DNA Ladder (Promega, USA); 1. *tetA* amplicon; 2. *tetB* amplicon.

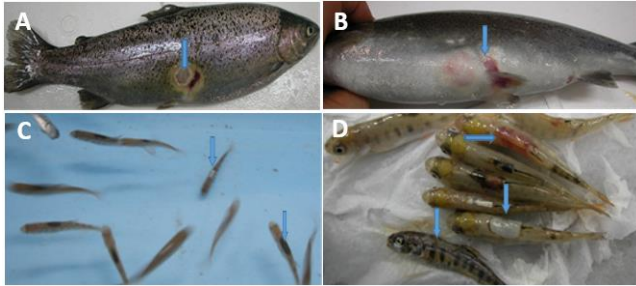
Tablo 3. PCR analizlerinde kullanılan primerler ve özellikleri.

Table 3. Primers used in PCR analysis and their properties.

Primer	Hedef Gen	DNA dizisi	Referans
5'-CS 3'-CS	Sınıf 1 integron değişken bölge	5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	Levesque vd. (1995)
hep51 hep74	Sınıf 2 integron değişken bölge	5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3' 5'-CGGGATCCCGACGGATGCACGATTGTA-3'	White vd. (2001)
<i>tet(A)</i> -1 <i>tet(A)</i> -2	<i>tet(A)</i> geni	5'-GTAATTCTGAGCACTGTCGC-3' 5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	Aarestrup vd. (2003)
<i>tet(B)</i> -1 <i>tet(B)</i> -2	<i>tet(B)</i> geni	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3' 5'-ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	Aarestrup vd. (2003)

BULGULAR

Hastalık semptomları: Çalışmanın yapıldığı dönemlerde ortalama ölçülen su sıcaklığı 4,4-21,8°C, oksijen değerleri 8.85 ± 2.35 mg L⁻¹, suyun pH'sı 6,96-8,10 aralığında ve toplam sertlik 92.5±2.3 mg L⁻¹ olarak ölçülmüştür. Balık çiftliklerinde hastalık vakaları varlığında örnek seçimi kolay yapılmasına rağmen hastalık vakalarının olmadığı zamlarda bütün çiftlikteki havuzlar gezilerek renkte kararma, halsiz, kaşektik, deri yüzeyinde ve kuyruk sap kısmında ülser olan balıklar toplanmıştır. Balıkların dış muayenesinde renkte kararma ve ülser, gözlerde tek ve çift taraflı exophthalmus, ağız etrafında, operkulum üzerinde ve anüs çevresinde lezyonlar görülmüştür. Bazı balıkların vücut yüzeyinde, kuyruk sapında ve dorsal yüzgeç etrafında yüzeysel ve derin ülserlerin varlığına rastlanmıştır. Dorsal yüzgecin hemen altında ve etrafında sınırlı bir kararmayı takiben dorsal yüzgeci de içine alan eğer benzeri ülserlerin varlığı 8°C'deki su sıcaklığında rastlandığında bize hastalığın *Flavobacterium psychrophilum* veya *Pseudomonas putida* enfeksiyonu olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca balıkların deri, solungaç ve bağırsakların mikroskopik muayenesinde herhangi bir parazite rastlanılmamıştır. Tipik hastalık semptomu gösteren balıkların görünümü Şekil 4'de verilmiştir.

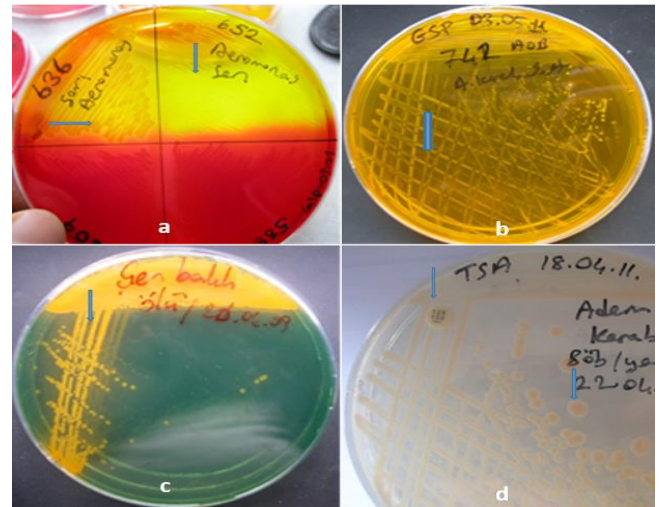


Şekil 4. Tipik hastalık belirtisi gösteren balıklar; A) Deride kararma ve ülser, Karında şişlik, B) Deride kararma, karında şişlik ve pektoral yüzgeç kaidesinde kanamalar, DC) Dorsal yüzgecin etrafında kararma ve erozyon, D) Dorsal yüzgeç de kanama, erozyon ve ülser.

Figure 4. Fish showing typical signs of disease; A) Blackening of the skin and ulcer, Swelling in the abdomen, B) Blackening of the skin, swelling in the abdomen and bleeding on the pectoral fin base, DC) Blackening and erosion around the dorsal fin, D) Bleeding, erosion and ulcer on the dotted fin

***Aeromonas* spp.'lerin idenfikasyonu:** Solungaç, bağırsak ve böbrek örneklerinin mikroskopik bakısında hastalık etkeni olarak hareketli bakterilerin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca, hastalıklı balıkların dış semptomlarına göre hastalığın *Aeromonas* spp. enfeksiyonu olma ihtimali göz önünde bulundurularak gerekli bakteriyolojik besi yerlerine ekimler yapılmıştır. TSA'da üreyen bakteriler hareket muayenesi, Gram boyama, oksidaz ve katalaz tesleri yapılarak oksidaz ve katalaz testleri pozitif olan bakteri izolatlar *Vibrio*, *Pseudomonas* ve *Aeromonas* 'lar için ayırt edici bir besi yeri olan TCBS ve GSP agar ekilmiş ve

izolatların 12 saat içinde TCBS agarda sarı renkli koloniler oluşturması *Vibrio* spp. olarak, GSP agarda ise oluşan sarı koloniler ve besiyerinin sarıya dönüşmesi *Aeromonas* yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. İzole edilen hastalık etkeni TSA'da beyaz-krem renginde yuvarlak koloniler, Gram boyamada, Gram negatif, tek ya da çiftler halinde ve çomak şeklinde bakteriler görülmüştür. İzolatların GSP, TCBS ve TSA agarlardaki oluşturduğu kolonilerin görünümü şekil 5'de verilmiştir. AOA ve AOB'da üreyen bakterinin *F. psychrophilum* olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak 30 izolatın *Aeromonas* spp. olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlara yapılan API 20NE test kiti sonuçları apiwep sisteminde değerlendirilerek izolatların *A. hydrophila/caviae/sobria* olabileceği ve tam identifikasyon yapılabilmesi için ek fiziksel ve biyokimyasal testlere ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir. Suşlara ait API 20NE test kitindeki biyokimyasal testler sonuçlarının görünümü şekil 6'da ve izolatların 24 saat sonundaki API 20NE test kitlerindeki biyokimyasal testlerin sonuçları Tablo 4'de verilmiştir. Apiweb sisteminden API 20NE test sonucu kodlarına göre yapılan değerlendirmeler Tablo 5'de verilmiştir.



Şekil 5. İzolatların GSP, TCBS ve TSA agarlarda oluşturduğu kolonilerin görünümü; a-b) GSP agarda sarı koloniler (*Aeromonas*), c) TCBS agarda sarı koloniler (*Vibrio*), d) TSA'da O/129 dirençli kahverengi koloniler (*Aeromonas*).

Figure 5. View of the colonies formed by the isolates on GSP, TCBS and TSA agars; a-b) Yellow colonies on GSP agar (*Aeromonas*), c) Yellow colonies on TCBS agar (*Vibrio*), d) O/129 resistant brown colonies (*Aeromonas*) on TSA.



Şekil 6. API 20NE test kiti reaktifler döküldükten sonra biyokimyasal test sonuçlarının görünümü.

Figure 6. View of biochemical test results after reagents are poured into the API 20NE test kits.

Tablo 4. API 20NE'deki çeşitli biyokimyasal testlerin 24 saat sonundaki sonuçları.**Table 4.** Results of various biochemical tests at API 20NE after 24 hours.

İzolat No	API 20NE TEST SONUÇLARI																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
357	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
636	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
652	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
678	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
696	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
704	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
706	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
709	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
710	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
711	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
712	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
722	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
727	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
734	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
741	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
742	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
745	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
748	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
751	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
754	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
762	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
766	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
768	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
769	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
770	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
772	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
773	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
774	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
778	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
779	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1. Nitrat indirgeme, 2. İndol, 3. Glikoz fermantasyonu, 4. Arjinin dihidrolaz, 5. Üre, 6. Esculin, 7. Jelatin hidroliz, 8. B-Galaktosidaz, 9. D-glikoz, 10. L-Arabinoz, 11. D-Mannoz, 12. D-Mannitol, 13. N-Asetil-glikozamin, 14. D-Maltoz, 15. Potasyum glukonat, 16. Kaprik asit, 17. Adipik asit, 18. Malik asit, 19. Trisodyum sitrat, 20. Trisodyum sitrat, 21. Trisodyum sitrat

Tablo 5. API 20NE' test sonucu kodlarına göre benzerlik (%) oranları.**Table 5.** Similarity (%) rates according to codes of API 20NE test result.

İzolat no	Api 20NE kod	Bakteri Türü	Benzerlik Oranı
357	5577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,8
636	5577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,8
652	7577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,7
678	5577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,8
696	5577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,8
704	7577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,9
706	5577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,8
709	5577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,8
710	5777755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,7
711	5777755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,7
712	5577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,0
722	7476754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%98,2
727	5577775	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,6
734	5577775	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,6
741	5577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,0
742	5577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,0
745	5476745	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%86,2
748	7577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,7
751	7577775	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,9
754	7577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,9
762	7577775	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,9
766	7476754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%98,2
768	7577754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,9
769	7477755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,5
770	5476754	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%97,8
772	5577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,0
773	5146755	<i>Aeromonas sobria</i>	%96,9
774	5116755	<i>Aeromonas sobria</i>	%97,7
778	7577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,7
779	7577755	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	%99,7

Antimikrobiyel Hassasiyet Test Sonuçları

Disk difüzyon metoduna göre yapılan antimikrobiyel hassasiyet testinde Mueller Hinton Agarda oluşan zon çapları dijital kompas yardımı ile okunmuş ve Tablo 2'de verilen antibiyotik hassasiyet testinde standart zon çapı ölçüleri kullanılarak suşlara ait antibiyotik hassasiyet belirlenmiştir. Disk difüzyon metoduna göre suşlara yapılan antimikrobiyel hassasiyet test sonuçlarına göre elde edilen direnç yüzdeleri hesaplanarak Şekil 7'de grafik olarak gösterilmiştir. Motil *Aeromonas* hastalığının sağaltımında antibiyogram test sonuçlarına göre en duyarlı antimikrobiyel ajanın

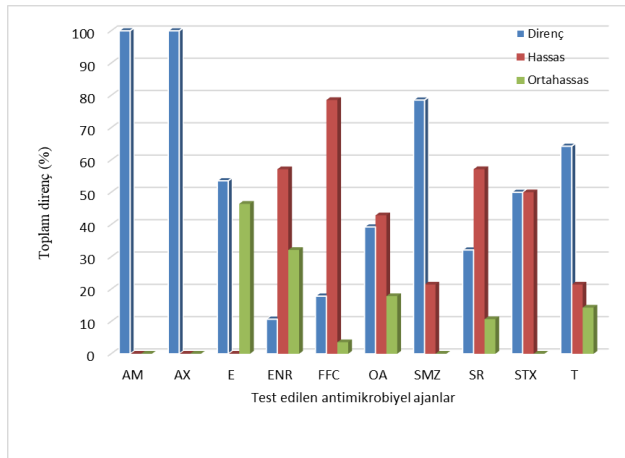
enrofloksasin ve florfenikol olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın test edilen *Aeromonas* izolatları diğer antimikrobiyellere karşı orta düzeyde hassas ve dirençli olduğu bulunmuştur. Buna göre ampisiline ve amoksisilin karşı en yüksek direnç %100 tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla, %78,57 ile sulfametoksazol, %64,28 oksitetrasiklin ve daha az oranda (%53,57) eritromisin, %50 trimetoprim/sulfametoksazol, %39,29 oksolinik asit, %32,14 streptomisin, %17,86 florfenikol ve en az %10,72 oranda bir kinolon olan enrofloksasin izlediği belirlenmiştir.

Tablo6. *Aeromonas* spp. izolatlarına ait fiziksel ve biyokimyasal klasik test sonuçları.
Table 6. Physical and biochemical classical test results of *Aeromonas* spp. strains.

Klasik Biyokimyasal Testler	Bakteri izolatları/Bacteria isolates														
	357	636	652	687	696	704	706	709	710	711	712	722	727	734	741
Hareket	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF testi O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+
OF/gaz(G)	+	-/-	+/-	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/+	-/-
O/129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Simons sitrat	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glikoz, gaz	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D-glikoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Metil red	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
İndol test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	S+	S+	S+	S+	S+	G+	S+	S+	S+	S+	S+	-	S+	S+	+
TSI Gaz (G)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
TSI (H ₂ S)	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Klinger-İron Agar	-	-	G+	+	G+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
KIA/(H ₂ S) / (G)	-	-	-/-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-	-/+	-/-	-
Pept-İron-A (H ₂ S)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Klasik Biyokimyasal Testler	Bakteri izolatları/Bacteria isolates														
	742	745	748	751	754	762	766	768	769	770	772	773	774	778	779
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF testi O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
OF/gaz(G)	+/+	-/-	+/-	+/+	+/+	+/+	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+
O/129	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KCN üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin hidroliz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Simons sitrat	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
H ₂ S production	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glikoz, gaz	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-glikoz, asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
Metil red	Z	+	+	Z	Z	+	+	Z	-	Z	Z	-	+	+	+
İndol test	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI	+	+	+	+	+	+	S+	+	+	+	+	+	+	+	S
TSI Gaz (G)	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
TSI (H ₂ S)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Klinger-İron Agar	-	-	-	-	+	-	G+	-	-	-	-	+	+	+	L
KIA/(H ₂ S) / (G)	-	-	-	-	+	-	-/-	-	-	-	-	-/-	-/-	-/-	+/+
Pept-İron-A (H ₂ S)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Z: Zayıf.



Şekil 7. *Aeromonas* spp. izolatlarının antimikrobiyel hassasiyet profilleri.

Figure 7. Antimicrobial susceptibility profiles of *Aeromonas* spp. isolates.

Antibiyotik direncinin moleküler analizi: Fırtına deresi üzerindeki alabalık çiftliklerinden izole edilen ve tanımlanan toplamda 30 adet *Aeromonas* izolatına yapılan test sonuçlarına göre 8 izolatın *Class-I* gen kasetine ve 16 izolatın ise *Class-II* gen kasetine sahip olduğu belirlenmiştir. *Class-I* için 3., 4., 16., 25., 26., 27., 28. ve 29. nolu izolatlar pozitif iken *Class-II* gen kaseti için ise 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 9., 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17. ve 19. izolatlar pozitif olarak tespit edilmiştir.

Antibiyogram test sonuçlarına göre oksitetrasikline dirençli olan 20 izolatın DNA'sından *tetA* ve *tetB* genleri için yapılan PCR analizi sonuçlarına göre toplamda 7 *tetA* geni tanımlanmış, fakat *tetB* genine rastlanılmamıştır. Agaroz jel elektroforezinde *tetA* amplifikasyonları 2., 5., 11., 14., 16., 18. ve 22. suşlarında pozitif olduğu ortaya konulmuştur.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada hastalık etkenlerinin genellikle ikincil enfeksiyonlara neden olan ve fakültatif fırsatçı bir patojen olan Motil *Aeromonas* türlerinden olduğu belirlenmiştir. Balıklarda görülen deri lezyonları ve ülserlerinden sıklıkla *Aeromonas* etkenlerinin izole edildiği tespit edilmiştir. Kötü beslenme, oksijen yetersizliği gibi konakçı direncini azaltan faktörlerin bulunması durumunda etken enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmada *A. hydrophila* ve *A. sobria* iç organlardan izole edilirken deri lezyonu saptanan balıklardan *A. hydrophila*'nın yanı sıra *A. caviae* izole edilmiştir. Daha önceki bir çalışmada eğer benzeri semptomlar gösteren gökkuşağı alabalığı yavrularından etken olarak *F. psychrophilum* izole edilmesine karşın (Balta, 1997), başka bir çalışmada ise sırtında at eğeri benzeri semptom gösteren hastalıklı gökkuşağı alabalığı yavrularından *P. putida* izole edildiği bildirilmiştir (Altınok vd., 2006), diğer bir çalışmada Türkiyenin farklı bölgelerinden 6,1-21.2°C su sıcaklığı aralığındaki 0,1-3000 g ağırlığındaki balıkların 20 farklı dorsal lezyonlu balıklarından farklı Motil *Aeromonas* spp.'lerin izole edildiği rapor edilmiştir (Duman ad., 2018).

Bu çalışmanın Api 20NE ve klasik biyokimyasal test sonuçlarına göre 30 izolatın 17'sinin *A. hydrophila* (357, 652, 678, 696, 704, 734, 741, 742, 745, 748, 751, 754, 766, 768, 769, 770, 772 ve 778), 11'nün *A. caviae* (636, 706, 709, 710, 711, 712, 722, 727, 762, 769 ve 779) ve 2'sinin *A. sobria* (773 ve 774) olduğu belirlenmiştir. Ülkemizin üç farklı (Ege, Akdeniz ve Karadeniz) bölgesinden toplanan balık ve sulardan izole edilmiş toplam 45 *Aeromonas* spp. izolatın, 20'si *A. sobria*, 10'u *A. hydrophila*, 9'u *A. salmonicida*, 4'ü *A. bestiarum* ve 2'si ise *A. veronii* olarak tanımlanmıştır (Onuk vd., 2015). Başka bir çalışmada alabalık işletmelerinden izole edilen 21 suş *A. hydrophila*, 24 suş *A. caviae* ve 7 suş ise *A. sobria* olarak tanımlandığı rapor edilmiştir (Durmaz & Türk, 2009). *Aeromonas*lar, karakteristik olarak tatlı su bakterileri olup *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* akuatik hayvanların mikrobiyel florası olmakla birlikte, koi, sazan gibi tatlı su balık türlerinde de hemorajik septisemiye neden oldukları bildirilmiştir (Aoki, 1999; Noga, 1996). Ülkemizdeki diğer bir çalışmada hastalıklı Japon balıklar (*Carassius auratus*)'ndan da *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin izole edildiği bildirilmiştir (Korun & Betül Toprak, 2007). Bu sonuçlar, tatlı su balıklarından izole edilen tüm *Aeromonas* izolatlarının, yalnızca fenotipik karakterler ve biyokimyasal test sonuçları ile doğru bir şekilde tanımlanamayacağını ortaya koymaktadır. Başka bir çalışmada, fenotipik karakterler ile *Aeromonas*ların tanımlanamadığı için mikropilaka hibridizasyon

yönteminin kullanılması ile daha doğru tanımlamanın yapılacağı bildirilmiştir (Sugita vd., 1994).

Bu çalışmada, ampisilin ve amoksisilin'e karşı %100, sulfametoksazol %79,31, oksitetrasiklin %62,07, eritromisin %51,72, trimetoprim + sulfametoksazol kombinasyonuna karşı %48,27 direnç gelişmiş olması kaygı uyandırıcı olması yanında sucul ortamdaki diğer mikroorganizmalar ile antibiyotiklerin direkt veya metabolitlerinin teması ile direnç şekillenmesine neden olduğunu bildiren birçok yayın mevcuttur (Alzainy, 2011; Balta, 2016; Balta & Dengiz Balta, 2016; Balta vd., 2016; Balta & Dengiz Balta, 2017; Balta & Dengiz Balta, 2019; Balta & Yılmaz, 2019; Samal vd., 2014). Gökkuşağı alabalık yavrularından izole edilen *A. caviae* (636, 706, 709, 710, 711, 712, 722, 727, 762, 769 ve 779) ve *A. sobria* (773 ve 774) izolatlarının enrofloksasin ve trimetoprim+sulfametoksazol kombinasyonuna karşı duyarlı, amoksisilin, basitrasin, oksitetrasiklin ve streptomisin'e karşı dirençli, eritromisin ve gentamisin'e karşı orta hassasiyette olduğu tespit edilmiştir. Florfenikol karşı *A. Caviae* (636, 706, 709, 710, 711, 712, 722, 727, 762, 769 ve 779) suşunun dirençli olmasına karşın *A. sobria* (773 ve 774) suşu hassas olduğu tespit edilmiş, fakat trimetoprimde ise bu durumun tam tersi olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada motil *Aeromonas* enfeksiyonları 3, 5, 10, 20 50 ve 100 gr'lık balıklardan izole edilmiştir. Bu enfeksiyonlardan izole edilen *Aeromonas* spp.'lere karşı yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre saha uygulamalarında enrofloksasin ve florfenikolün başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Kültür balıkçılığı sistemlerinde ilaç direnci, virülens veya enterotoksin üretimi gibi plazmit aracılığı ile aktarılabilen özelliklerin ilgili veya ilgisiz bakterilere transfer kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Toranzo vd., 1984). Bu nedenle, balık bakterilerinde konjugatif plazmitlerin varlığı, potansiyel bir insan sağlığı tehlikesinin göstergesi olarak kabul edilmiş, çünkü plazmitler, balık tanklarında bulunan insan patojenlerine aktarılabılır olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, bu R plazmitlerinin yayılmasının nasıl önleneceğini öğrenmede epidemiyolojik çalışmalar açısından oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Toranzo vd., 1984). Mikroorganizmalarda tanımlanan antibiyotik direncinin çeşitli nedenleri mevcuttur. Dirençten sorumlu olan genler bakteri genomu üzerinde olabileceği gibi plazmit üzerinde de olabilir. Özellikle bazı genler integron olarak isimlendirilen kasetlerde plazmit üzerinde taşınabilir. Bu durumda başka mikroorganizmalara transfer edilebildiği rapor edilmiştir (Ozgumus vd., 2008). Ayrıca, balıkların tedavisi amacı ile kullanılan bir antibiyotikğin sedimentte uzun süre bulunması sediment bakterilerinde ilaç karşı direncinin oluşmasına neden olacağı bildirilmiştir. Tetrasiklinler de dahil olmak üzere birçok antibakteriyel

ajanın sucul mikroflorada ve patojenik balık bakterinde plazmit aracılı ilaç direncini indüklediği rapor edilmiştir (Austin, 198; Toranzo vd., 1984). Bu çalışmada hem integron 1 (Class-I) ve hem de integron 2 (Class-II) gen kasetlerinin varlığı tespit edilmiştir. Tetrasiklin direncine neden olan genler de moleküler olarak tiplendirilebilir ve bu çalışma kapsamında tetrasiklin direnci gözlenen 20 örnekten 7 tanesinde *tetA* geninden kaynaklanan direncin olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, farklı coğrafi bölgelerde insanlar ve su ürünleri yetiştiriciliği arasında tetrasikline dirençli plazmidlerin *A. hydrophila* ve *E. coli* arasında yayıldığını bildirmişlerdir (Stratev & Odeyemi, 2016). Bununla birlikte, *A. hydrophila*'nın antibiyotiklere direncindeki artış bir halk sağlığı sorunu olduğu için, küresel olarak bu fırsatçı patojenin varlığını izlemek ve sürekli bir şekilde araştırmaların yapılarak takip edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Alabalık işletmelerinden izole edilen *Aeromonas* spp.'lere karşı yapılan antibiyogram testlerinde enrofloksasin'e karşı suşların hemen hemen tamamı (%96'sı) duyarlı iken oksitetrasiklin ve streptomisin ise dirençli olması bizim bulgularımızla örtüştüğü görülmüştür (Durmaz & Türk; 2009). Başka bir araştırmada ise Japon (*Carassius auratus*) balıklarından izole edilen *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* türlerinin antibiyotiklere hassasiyet durumları değerlendirildiğinde ampicilin'e direnç göstermekle birlikte, tetrasiklin'e de dirençli oldukları bildirilmiştir (Korun & Betül Toprak, 2007). Bu araştırmanın sonuçları ile bizim bulgularımız paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak; bu araştırmada gökkuşluğu alabalığı yavru kuluçkahanelerinde yoğun stoklamadan kaynaklanan strese bağlı olarak farklı *Aeromonas* spp. enfeksiyonlarının zaman zaman ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Hastalık semptomlarına bakılarak yapılan hastalık teşhislerin doğru olmadığı ve hastalık etkeninin tam teşhisinin yapılabilmesi için etkenin mutlaka izole edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Antimikrobiyel hassasiyet profilinin belirlenmesi üzerine yapılan araştırmalarda farklı antibiyotiklere karşı gelişen dirençli suşların rapor edilmesi antibiyotik kullanılmasının gelişmiş yapılmaması, hastalığın sağaltımı için mutlaka antibiyogram testinin yapılması tedavide başarı şansını ve üretimde verimliliği artırılacağı gibi ekonomik kayıpların azaltılması bağlı olarak sürdürülebilir karlılığın sağlanması açısından oldukça önemli olduğu saptanmıştır.

ÖNERİLER

Doğu Karadeniz Bölgesinde karasal havuzlarda, baraj gölü ve denizel ortamlarda yüzer ağ kafeslerde kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklarında su sıcaklığına bağlı olarak stres faktörleri ile birlikte ortaya çıkan motil

Aeromonas spp. hastalığının büyük ekonomik kayıplara neden olması nedeni ile önemli bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bu hastalığın yayılmasının önlemek için çiftlikler ve bölgeler arası balık hareketleri kontrol altına alınmalıdır. Gelişmiş ilaç kullanımının önüne geçilmesi için Tarım ve Orman Bakanlığının uyguladığı kimyasal rezidü analiz tarama programları sonuçlarının iyi takip edilmesi, gerekli caydırıcı önlemlerin alınması ve yasal yaptırımların uygulanması gerektiği kanısındayız.

Bu araştırma sonuçlarından elde edilen bilgi ışığında mevcut balık hastalıklarının sağaltımında kullanılan antibiyotiklere yüksek oranda direnç şekillenmesi tedavide antibiyotik kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca kullanılan kimyasalların bakteriyel direnç oluşması yanı sıra sucul ortamın kirlenmesine neden olmaktadır. Antibiyotiklerin dış bağımlılığı olması nedeniyle yurt dışına döviz aktarılması ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle izole edilen yerli suşlar kullanılarak aşılardan hazırlanması, geliştirilmesi, patentli ve ruhsatlı ticari aşılardan piyasaya sürülmesi hem ülke ekonomisine hem de üreticiye katkı sağlayacağı kanısındayız. Ayrıca aşı kullanımı ile antibiyotiklerin kullanımını sonucu oluşan direnç kazanımı ve çevresel kirlenmenin de önüne geçilmiş olacaktır. Kültür balıkçılığı bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde kullanılan kimyasal ajanlarla tedavi bazı sakıncaları da beraberinde getirmektedir. Bu bağlamda bu konu ile ilgili araştırma çalışmalarına devam edilmesi kanaatindeyiz. Hastalık vakalarında gelişmiş antibiyotik kullanılmadan önce hastalıklı balıkların muayene edilerek hastalık etkeninin izole edilmesi, bu etkenlere karşı antibiyogram testlerinin yapılması ve uygun kimyasalların kullanılması, balık salığı açısından önemli olduğu gibi çevre, hayvan ve insan sağlığı yönünden de çok önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 2008.103.02.1 nolu projeden sağlanan destekle ile gerçekleştirilmiştir. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi ne sağladığı destek için teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Altınok, I., Kayis, S. & Capkin, E. (2006).** *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, **261**(3), 850-855. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2006.09.009](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.009).
- Alzainy, Z.A.A. (2011).** The Occurrence, Hemolytic, Cytotoxic Activity and Antibiotic Susceptibility of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish

- Samples in Baghdad. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, **35**(2), 123-135.
- Aoki, T. (1999).** *Motile aeromonads (Aeromonas hydrophila). Fish diseases and disorders*, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections (Eds. P. T. K. Woo and D. W. Bruno), Cab International, 427-453pp.
- Arestrup, F.M., Lertworapreecha, M., Evans, M.C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R.S. & Wegener, H.C. (2003).** Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**(4), 715-718. DOI: 10.1093/jac/dkg426.
- Austin, B. & Austin, D.A. (1993).** *Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. Second Edition, Ellis Horwood, London, 376p.
- Austin, B. (1985).** Antibiotic pollution from fish farms: Effects on aquatic microflora. *Microbiological Sciences*, **2**(4), 113-117.
- Balta, F. (1997).** Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) görülen “*Flexibacter psychrophila*” enfeksiyonu, 621-648s. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 17-19 Eylül, Eğirdir/Isparta.
- Balta, F., Sandalli, C., Kayis, S. & Ozgumus, O.B. (2010).** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **30**(6), 211-219.
- Balta, F. (2016).** Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *V. anguillarum*, isolated from cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in the Southeast Black Sea, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, **25**(10) 4393-4400.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2016).** Deniz suyuna nakledilen gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında görülen vibrio enfeksiyonu ve tedavisi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, **1**(1), 14-20
- Balta, F., Dengiz Balta, Z., Ozgumus, O.B. & Çağırğan, H. (2016).** Doğu Karadeniz Bölgesi’ndeki gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) çiftliklerinde *Yersinia ruckeri*’nin portörlük yönünden tetkiki ve antimikrobiyal direncin tespiti. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, **3**(1), 72-76.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2017).** Doğu Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen *Vibrio anguillarum* suşlarının serotiplendirilmesi, genetik karakterizasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **64**, 321-328.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2019).** The isolation of *Lactococcus garvieae* from eyes of diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exophthalmia. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, **4**(1), 27-33. DOI: 10.35229/jaes.527258.
- Balta, F. & Yılmaz, H. (2019).** Kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* enfeksiyonu. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, **4**(2), 104-110. DOI: 10.35229/jaes.544439.
- Bremer, P.J., Fletcher, G.C. & Osborn, C. (2003).** *Aeromonas* spp. in seafoods. New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, 1-6.
- CLSI. (2014).** *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement*. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230s.
- Diker, K.S. (1999).** *Aeromonas ve aeromonas enfeksiyonları*. In, M, Mimbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS (Eds): Özel Mikrobiyoloji. 59-62s, Medisan Yayın Serisi. No: 26, Ankara.
- Diler, Ö. & Altun, S. (1994).** Gökkuşuğu alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) hemorajik septisemi etkeni olarak izole edilen bazı *Aeromonas hydrophila* suşlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *SDÜ Eğirdir Su Ürün Fak Derg*, **4**, 169-178.
- Duman, M., Saticioglu, I.B., Janda, M. & Altun, S. (2018).** The determination of the infectious status and prevalence of motile *Aeromonas* species isolated from disease cases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and aquarium fish. *Journal of Fish Diseases*, **41**, 1843-1857. DOI: 10.1111/jfd.12896.
- Durmaz, Y. & Türk, N. (2009).** Alabalık işletmelerinden motil aeromonasların izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. **5**(3), 357-361. DOI: 10.9775/kvfd.2008.121-A.
- Egusa, S. (1978).** *Infectious diseases of fish*. Tokyo: Kouseisha Kouseikaku, 554p.
- Korun, J. & Betül Toprak, H. (2007).** Japon (*Carassius auratus*) balıklarından izole ve tanımlanmış *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria*

- türlerinin antibiyotik hassasiyetleri, hemolitik aktiviteleri ve siderofor üretimleri üzerine bir çalışma. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3-5(5-8), 776-782.
- Lee, S., Kim, S., Oh, Y., & Lee, Y. (2000).** Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Rainbow Trouts in Korea. *The Journal of Microbiology*, 38(1), 1-7.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C. & Roy, P.H. (1995).** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 185-191. DOI: [10.1128/AAC.39.1.185](https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185).
- Mcnicol, L.A., Aziz, K.M., Huq, I., Kaper, J.B., Lockman, H.A., Remmers, E.F., Spira, W.M., Voll, M.J. & Colwell, R.R. (1980).** Isolation of drug-resistant *Aeromonas hydrophila* from aquatic environments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17(3), 477-483. DOI: [10.1128/AAC.17.3.477](https://doi.org/10.1128/AAC.17.3.477)
- Munro, A.L.S. (1982).** *The pathogenesis of bacterial diseases of fishes*. In, Roberts JR (Ed): Microbial Diseases of Fish. 131-151pp., Academic Pres, London.
- Noga, E.J. (1996).** *Fish disease, diagnosis and treatment*. Mosby, London. 367p.
- Onuk, E.E., Tanrıverdi Çaycı, Y., Çoban, A.Y., Çiftci, A., Balta, F., Didinen, B.I., Pekmezci, G.Z., Altun, S., Sögüt Ünlü, M. & Devenci, A. (2015).** Türkiye’de Su Kaynaklı *Aeromonas* spp. İzolatlarında Saptanan İlk *QnrS* Gen Pozitifliği. *Microbiology Bulletin*, 49(1), 114-123.
- Ozgunus, O.B., Tosun, I., Aydın F. & Kilic, A.O. (2008).** Horizontal dissemination of TEM- and SHV-typr beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 636-643. DOI: [10.1590/S1517-83822008000400007](https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000400007)
- Rahim, Z., Sanyal, S.C., Aziz, K.M., Huq, M.I. & Chowdhury, A.A. (1984).** Isolation of enterotoxigenic, hemolytic, and antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 865-867.
- Saavedra, M.J., Guades-Novais, S., Alves, A., Rema, P., Tacão, M., Correia, A. & Martínez-Murcia, A.M. (2004).** Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Microbiology*. 7(3), 207-211.
- Samal, S.K., Das, B.K. & Pal, B.B. (2014).** Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(12), 259-267.
- Schaperclaus, W., Kulow, H. & Schrenkenbach, K. (1992).** Infections abdominal dropsy. In Schaperclaus, W (Eds). *Fish Disease*, Vol I. Akademie-Verlag, Berlin., 401-458p.
- Southage, P. (1993).** *Disease in aquaculture*. In, Brown L (Ed): *Aquaculture for Veterinarians*. 1st ed. pp. 84-102, Pergamon Pres, New York.
- Stoskopf, M.K. (1993).** Bacterial Diseases of Goldfish, Koi, and Carp. *Fish Medicine*. Chapter 48, 473-475.
- Stratev, D. & Odeyemi, O.A. (2016).** Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 9(5), 533-544. DOI: [10.1016/j.jiph.2015.10.006](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006).
- Sugita, H., Nakamura, T., Tanaka, K. & Deguchi Y. (1994).** Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 3036-3038.
- Toranzo, A.E., Combarro, P., Lemos, M.L. & Barja, J L. (1984).** Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), 872-877.
- White, P.A, McIver, C.J. & Rawlinson, W.D. (2001).** Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2658-62.
- Yavuzcan Yıldız, H., Bekcan, S., Karasu Benli, A.C. & Akan, M. (2005).** Some blood parameters in the eel (*Anguilla anguilla*) spontaneously infected with *Aeromonas hydrophila*. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 60(3), 91-92.