

**YAVRU ALABALIKLARDA (*Oncorhynchus mykiss*) PSEUDOMONAD  
SEPTİSEMİSİ ÜZERİNDE BİR ÇALIŞMA**

Tülay AKAYLI\* Gülşen TİMUR\*

**A study on the pseudomonad septicemia in young rainbow trout  
(*Oncorhynchus mykiss*)**

**Summary:** In this study, the aetiological agent and histopathological changes of a infectious diseases induced high mortality in our Faculty Rainbow Trout Hatchery Unite fish (2-3 months old) located in Sapanca were investigated.

Bacteriological inoculations were made from kidney, liver and spleen to Tryptic Soy Agar (TSA) from the infected fish visceral organs. The bacterial colonies were obtained only from kidney inoculation after 5 days period incubation at 20°C. The isolate were comprised motile Gram negative rod shaped bacteria those strictly oxidative by the O/F glucose test, cytochrome oxidase positive and produced fluoresce under ultraviolet light and identified as *Pseudomonas fluorescens*. Affected fish showed darkening of the skin, fin or tail rot, haemorrhagic lesions on the skin and the base of the fins, anorexia, exophthalmia. Main histopathological changes were localized in the interstitial haemopoietic tissue of kidney and in the muscle cells of the underlying dermis. In addition to this findings diffuse oedema among the liver cells and focal necrosis in the liver and kidney tubul epithelium cells, necrosis in the gill epithelium and haemorrhagic were also seen.

**Key Words:** Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Pseudomonas fluorescens*, Pseudomonad septicemi, Strictly aerobe, fluorescens produced.

**Özet:** Bu çalışma Fakültemize bağlı Sapanca Gökkuşuğu Alabalık Üretim Ünitesi'ndeki 2-3 aylık genç alabalıklarında 2002 yılının Mart ayında görülen ve yüksek mortaliteye neden olan enfeksiyöz hastalığın etkenini ve histopatolojik değişiklikleri tespit etmek için yürütülmüştür.

Bakteriyel ekimler enfekte balıkların böbrek, karaciğer ve dalak gibi viseral organlarından Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine yapılmıştır. Hastalık etkeni olan bakteri sadece böbrekten yapılan ve 20°C'de 5 gün süre ile inkübe edilen besiyerinde izole edilebilmiştir. İzole edilen bakteri, hareketli, Gram negatif çomak şekilli basilden oluşup, sitokrom oksidaz pozitif ve O/F glukoz testinde kuvvetli oksidatif olduğu ve ultraviyole ışık altında floresans oluşturduğu için *Pseudomonas fluorescens* olarak identifiye edilmiştir. Histopatolojik olarak başlıca patolojik değişiklikler derinin dermis tabakası altındaki kas hücrelerinde ve böbreğin interrenal haemopoietik dokusunda gözlenmiştir. Bunlara ek olarak karaciğer hücreleri arasında yaygın ödem, karaciğer ve böbrek epitel hücrelerinde fokal nekroz ve solungaç epitel hücrelerinde nekroz ve hemoraji görülmüştür.

\* Istanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Laleli - İSTANBUL.  
e-mail :takayli@yahoo.com

**Anahtar Kelimeler:** Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), *Pseudomonas fluorescens*, pseudomonad septisemisi, kuvvetli aerob. floresans oluşturma.

### Giriş

Kültür ve akvaryum balıkları arasında yaygın olarak görülen ve sporadik veya epizootikler şeklinde oluşan pseudomonad septisemilerine etiyolojik ajan olarak *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas anguillaseptica* (1, 2, 7, 12), *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas (Alteromonas) putrefaciens* (1, 7) ve *Pseudomonas pseudoalcaligenes* gibi çeşitli *Pseudomonas* türleri neden olmaktadır (7). *Pseudomonas anguilla septica* yılan balıklarında deride ve ağız bölgesinde, operkulada ve karın ventral bölgesinde peteşiyal hemorajiler oluştururken, *Pseudomonas fluorescens*'in tilapia (*Sarotherodon niloticus*) balıklarında dalakta beyaz nodüller ve hava kesesinde apseler oluşturduğu bildirilmektedir. *P. fluorescens*'in tilapia balığından başka japon balığı (*Carassius auratus*), kadife balığı (*Tinca tinca*), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (1, 7, 14, 16), büyük baş sazan (*Aristichthys nobilis*), ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*), kara sazan (*Mylopharyngodon piceus*) ve gümüş sazanı (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val) (6) balıklarında da septisemi oluşturmaktadır (1, 7).

*P. anguillaseptica* yılan balıkları dışında karadeniz mercanı *Acanthopagrus schlegelii*, ayu (*Plecoglossus altivelis*), Atlantik salmonu (*Salmo salar*), deniz alası (*Salmo trutta*), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), beyaz balık (*Coregonus sp.*), Baltık Denizi ringa (*Clupea harengus membras*) balıklarında, çipura balıklarında (*Sparus aurata*) (3), deniz levreğinde (*Dicentrarchus labrax*) (11) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) balıklarından izole edilmiştir (1, 7).

*P. putrefaciens*'in Kızıldeniz'deki kültür tavşan balıklarında (*Siganus rivulatus*) hastalık çıkışına neden olan bir etken olarak tanımlanmıştır. Japonya'da bir çiftlikte *P. chlororaphis*'in Amago alabalıklarında (*Oncorhynchus rhodurus*) yüksek mortaliteye neden olduğu, *P. pseudoalcaligenes*'in ise *Yersinia ruckeri* ile enfekte gökkuşuğu alabalıklarının deri lezyonlarından izole edildiği bildirilmiştir (7).

Yurdumuzda Eğirdir Gölü sudak balıklarında (*Stizostedion Lucioperca* L. 1758) yüksek mortaliteye neden olan doğal epizootikte de hasta balıklardan fluorescent pigment üreten *Pseudomonas* türünün izole edildiği bildirilmiştir (15). Ayrıca Denizli yöresindeki bir alabalık işletmesinde bulunan kültür alabalıklarından da sarı-yeşil pigment üreten bir *Pseudomonas* türünün izole edildiği belirtilmiştir (8).

Bu çalışma ile Fakültemize bağlı Sapanca Alabalık Yetiştiricilik Ünitesi'ndeki yavru (2-3 aylık) alabalıklarda ağır kayıplara neden olan hastalığın etkeni tespit edilerek hasta balığın dokularında meydana gelen histolojik değişiklikler tespit edilerek hasta balıkların ilaçlı yem ile tedavisi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Bu çalışmada 3-4 g ağırlığındaki 10 adet hasta yavru balık materyal olarak kullanılmıştır. Bakteriyojik örneklemede kullanılan hasta balıkların iç organlarının ortaya çıkarılması için karın bölgesine ventral ve lateral insizyonlar yapılarak dalak, karaciğer ve böbrek gibi viseral organlardan Trypticase Soy Agara (TSA) öze ile ekimler yapılmıştır. 20°C'de inkübe edilen TSA besiyerinde 5 günde kolonilerin oluştuğu görülmüştür. İzole edilen etkenden morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin tespiti için Gram, boyalı preparatlar hazırlanmış, identifikasyon için hareket, sitokrom oksidaz, O/F glukoz, katalaz, amino asit dekarboksilaz testleri, karbonhidrat fermentasyon testleri gibi rutin bakteriyojik laboratuvar teknikleri uygulanmıştır (1, 2, 10, 13). TSA besiyerinde üreyen bakterilerin floresan oluşturma özelliği ultraviyole ışık altında tutulmak suretiyle tespit edilmiştir (1, 2, 12).

İzolatan flumequine, erthromycine, furozolidone, ampicillin, oxolinic asid, sulphamerazine, kanamycine ve chloramphenicol duyarlılığı in vitro olarak Bauer-Kirby Standart Disk Difüzyon yöntemine göre araştırılmıştır (17).

Enfekte balıkların iç organlarındaki patolojik değişikliklerin tespiti için bu organlardan alınan doku örnekleri %10'luk formalin içeren solüsyonda tespit edilmiştir. Daha sonra bu dokular rutin işleme yöntemi ile işlenerek 5 mikron kalında kesitleri alınmış, haemotoxylen ve eosin (H+E) boyama yöntemi ile boyanarak ışıklı mikroskop altında incelenmiştir (4, 5).

### Bulgular

#### Klinik ve Nekropsi Bulguları:

Fakültemiz Sapanca İç Su Ürünleri Üretim tesisinde üretilen 3-4 g ağırlığındaki gökkuşağı alabalık yavrularında 2002 yılının Şubat ayında ani ölüm nedeni ile yüksek mortalite (%40) görülmüştür. Hasta balıkların deri renginde koyulaşma, iştahsızlık (anorexia), zayıflık, yüzgeçlerde erime, dorsal yüzgeç diplerinde deride ülseratif yüzeysel lezyonlar, kızarıklık, exophthalmia ve solungaçlarda solgunluk tespit edilmiştir. İç bakıda hasta balıklarda karaciğerin solgun, dalağın büyümüş, böbreğin ise yumuşayarak eridiği dikkat çekmiştir.

#### Bakteriyojik Bulgular :

Hasta balıkların iç organlarından TSA'a yapılan ekimlerde sadece böbrekten yapılan ekimlerde sarımsı yeşil renkli etrafa doğru yayılan dalgalı kenara sahip yuvarlak kolonilerin ürettiği ve kolonilerin ultraviyole ışığı altında floresan özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Böbrekten izole edilen bakteri kolonilerin düz veya hafif kıvrık Gram negatif çomak şekilli tek veya çift çomaklardan oluştuğu (Şekil 1), hareketli oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 1. Frotide Gram negatif, tek ve çift, düz veya çomak şekilli basiller. (Gram x 2000)  
Figure 1. Straight or curved Gram negative rods, singly or in pairs in the smear.

Sitokrom oksidaz negatif ve O/F testinde oksidatif özellik gösterdiği dikkati çeken bu bakterinin 0/129 testine ise hassas olmadığı gözlenmiştir. Arginin dihidrolaz, katalaz ve oksidaz pozitif olan bu izolatın 4°C'de ürettiği fakat 37°C'de üreme göstermediği, β-galaktosidaz, H<sub>2</sub>S, indole ve üre testlerinin negatif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Tablo1). Böbrekten izole edilen bu bakteriye ait diğer biyokimyasal özellikler Tablo1'de verilmiştir. Fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre bu bakteri *P. fluorescens* olarak tanımlanmıştır.

Kemoterapötik duyarlılık testi sonucunda *P. fluorescens*'in flumequine ve eritromisine çok duyarlı olduğu saptanmıştır. Kemoterapötik duyarlılık testi sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Hasta gökkuşağı alabalığı yavrularından izole edilen *Pseudomonas fluorescens* suşuna ait fiziksel ve biyokimyasal özellikler.**Table 1.** The physical and biochemical features of the *Pseudomonas fluorescens* strain was isolated from diseased rainbow trout.

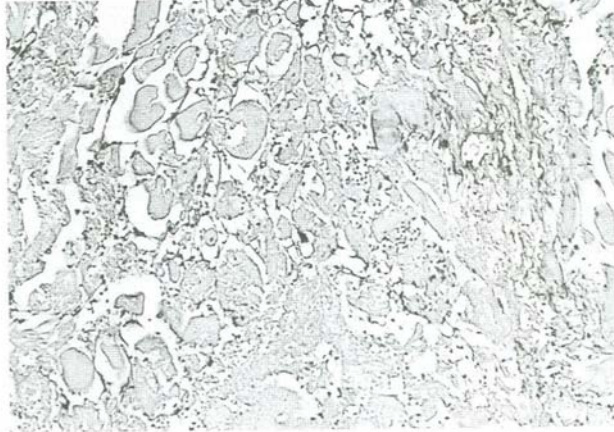
Testler	Gökkuşağı alabalığından elde edilen izolat
Gram	negatif
Hareket	flagella hareketi
Sitokrom oksidaz	+
O/F	oksidatif
Floresans pigment üretimi (UV altında)	+ (sarımsı-yeşil)
ONPG ( $\beta$ -galaktosidaz)	-
İndol	-
Metil red	+
Voges - Proskaur	+
Arginin dihidrolaz	+
Lizin dekarboksilaz	-
Ornitin dekarboksilaz	-
Karbonhidratlardan asit üretimi	
Galaktoz	+
Xyloz	+
Glukoz	+
Laktoz	-
Sukroz	-
Mannoz	+
Maltoz	-
Fruktoz	+
Arabinoz	+
İnositol	-
Glukozdan gaz oluşumu	-
4°C'de üreme	+
22°C'de üreme	+
37°C'de üreme	-
O/129 Vibriostat	-
Flumequine	hassas****
Erythromycine	hassas****
Furozolidone	hassas***
Ampicillin	hassas**
Oxolinic asid	hassas**
Sulphamerazine	hassas*
Kanamycin	hassas*
Chloramphenicol	hassas*

+ : pozitif

- : negatif

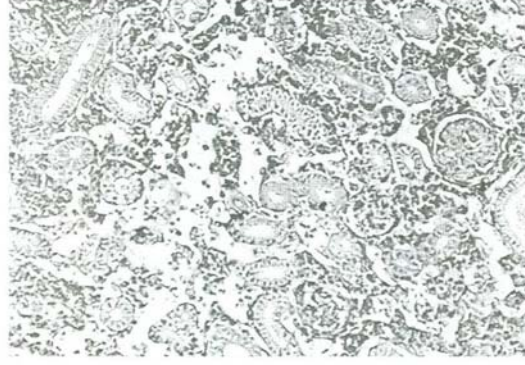
**Histopatolojik Bulgular:**

Histopatolojik olarak başlıca değişiklikler deri, kas, haemopoietik dokular, böbrek tübül epitelleri, karaciğer parankim hücrelerinde ve solungaç filamentlerinde görülmüştür. Yüzgeç diplerindeki deride görülen ülseratif lezyonların kaslara kadar ilerlediği, dejeneratif ve nekrotik kas hücrelerindeki miyofaji (inflamatoz selüler infiltrasyon)'den anlaşılmaktadır (Şekil 2). Böbreklerde bazı tübüllerin tübül epitel hücrelerinde dejenerasyon ve nekroz yanısıra interstitial haemopoietik doku hücrelerinde azalma ve geri kalan hücrelerde nekroz tespit edilmiştir (Şekil 3, 4). Karaciğer parankim hücrelerinde lokal nekroz ve ödem (Şekil 5, 6), solungaçların sekonder lemellalarının epitel hücrelerinde nekroz ve dökülme yanı sıra hemoraji tespit edilmiştir (Şekil 7).

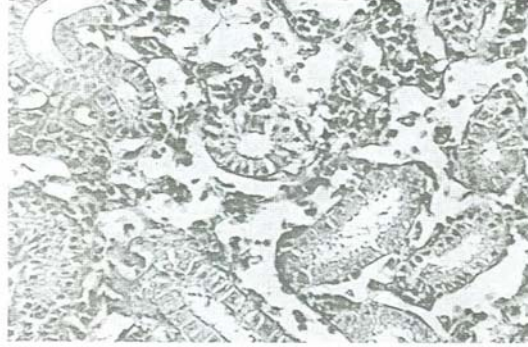


Şekil 2. Dejeneratif ve nekrotik kas hücrelerinde miyofaji (inflamatory selüler infiltrasyon) (H+E X 500).

Figure 2. Myophagia (inflammatory celluler infiltrasyon) in the degenerative muscle cells.

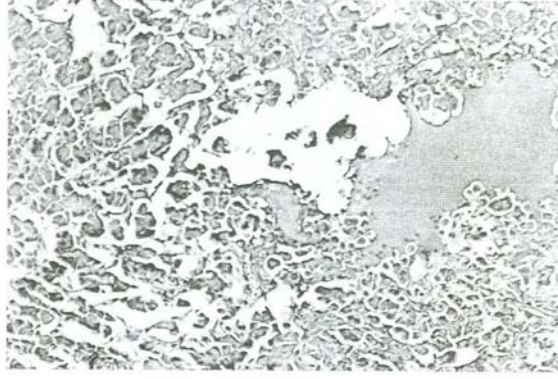


Şekil 3. Dejeneratif ve nekrotik tübül epitelleri yanısıra interstitial haemopoietik dokuda azalma (H+E X 500).  
Figure 3. Degeneration and necrose in the kidney tubul epithelium, with considerable reduced and necrotic interstitial haemopoietic tissue.



Şekil 4. Azalmış nekrotik interstitial haemopoietik doku ve dejeneratif böbrek tübülleri (H+E X 1000).  
Figure 4. Reduced and necrotic interstitial haemopoietic tissue and degenerative kidney tubules.





Şekil 5. Karaciğer hücrelerinde fokal nekroz ve karaciğer hücreleri arasında diffluz ödem (H+E X 500).  
Figure 5. Focal necrosis in the liver cells and severe diffuse oedema among the liver cells.



Şekil 6. Karaciğer hücreleri arasında diffluz ödem (Büyük büyütme) (H+E X 1000).  
Figure 6. Diffuse oedema among the liver cells (High magnification).





Şekil 7. Solungaç lamel epitel hücrelerinde nekroz ve hemoraji (H+E X 1000).  
Figure 7. Necrosis in the gill epithelium and haemorrhagic.

#### Tartışma ve Sonuç

Yılan balıklarında *P. anguilliseptica*'dan kaynaklanan pseudomonad septisemilerinde genellikle hasta balıkların yüzgeç tabanlarında, ağızda, alt çene etrafında ve anüs çevresinde kızarıklık görülürken (1, 7, 12). *P. fluorescens*'in neden olduğu septisemilerde cyprinid balıklarda genellikle aeromonad septisemilerinde görülen ascites'in görüldüğü bildirilmektedir. Bu bakteri cyprinid balıklarda deride geniş hemorajik lezyonlara neden olmaktadır (9). *P. chlororaphis* Amago balıklarında sazan balıklarında olduğu gibi ascites'e ve vücut yüzeyinde hemorajilere neden olurken (1), *P. fluorescens*, kadife balığı yavrularında (fry) %90 mortalite ve hasta balıklarda yüzgeç ve kuyruk yüzgecinde erime, deride ve yüzgeç diplerinde hemorajik lezyonlara neden olmaktadır. Yavru balıklarda ascites, solungaçlarda ve viseral organlarda peteşiyal hemorajiler görülmüştür (1). Eğirdir Gölü sudak balıklarında görülen doğal epizootikte hasta balıkların yüzgeç diplerinde ve derilerinde yaygın hemorajiler gözlemlendiği ve solungaçların solgun olduğu bildirilmektedir (15).

Bu çalışmada; hasta alabalıklarda yüksek mortaliteye neden olan bu epizootikten izole edilen *P. fluorescens*'in diğer araştırmacıların pseudomonad septisemilerinde (1, 3, 15) belirtmiş oldukları gibi yüzgeçlerde erime, dorsal yüzgeç diplerindeki deride ülseratif yüzeysel lezyonlar, kızarıklık, exophthalmia ve solungaçlarda solgunluk gibi benzer bulgulara neden olduğu tespit edilmiştir.

Hasta balıklardan izole edilen etkenin; kuvvetli aerob. Gram negatif çomak şekilli, UV ışığı altında fluoresans özelliği göstermesi ve diğer biyokimyasal, fizyolojik özellikleri ile diğer araştırmacıların *P. fluorescens* bakterisine ait bulgularına (1, 2, 7, 10, 15) uyum gösterdiği için *P. fluorescens* olarak tanımlanmıştır.

Denizli yöresindeki bir işletmeye ait kültür alabalıklarında görüldüğü bildirilen pseudomonad septisemi vakasında böbreklerdeki interrenal haemopoyetik dokuda görülen nekroz (8) ve hemoraji yanı sıra Eğirdir Gölü sudak balıklarının pseudomonad septisemisinde karaciğer parankim hücrelerinde görülen nekroz ve hemoraji, dalağın haemopoyetik doku hücrelerinde azalma ve geri kalan haemopoyetik doku hücrelerinde görülen nekroz (15), yılan balığı ve dikence balıklarında deri altı kas dokusunda ve haemopoyetic dokularda görülen dejeneratif ve nekrotik bulgular (9) bu çalışmada incelenen yavru alabalıklarda da benzer bulgular olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, hasta alabalık yavrularından izole edilen *P. fluorescens* suşunun flumequine ve eritromisine duyarlı olduğu tespit edilmiş ve flumequine (500 g ilaç / 100 kg yem dozunda) yem içinde balıklara bir hafta süre ile verilerek ölümler durdurulmuştur.

#### Kaynaklar

1. Austin, B., Austin, D.A.: Pseudomonads. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Chapter 12. Ellis Harword Ltd., 1987; 251-262.
2. Austin, B.: Bacteria of Fish. In: The Pseudomonadaceae. Methods in Aquatic Bacteriology. Ed. B. Austin, Chapter 5. Edinburg, 1988; 123-124.
3. Balebona, M.C., Zorrilla, I., Morinigo, M.A., Borrego, J.J.: Survey of Bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain From 1990 to 1996. Aquaculture 1988; 166. 19-35.
4. Bullock, A.M.: Laboratory Methods in Fish Pathology. Ed. by Roberts R.J., Bailliere Tindall, London, 1978; 235-267.
5. Culling, C.F.A.: Handbook of Histopathological Techniques. Second edition, Ed. H.E. Taylor, London. Butterworths, 1963; 235-267.
6. Csaba, G.Y., Prigli, M., Bekesi, E., Kovacs -Gayer, E., Bajmocy, E. and Fazekas, B.: Septicemia in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.) and Bighead (*Aristichthys nobilis*, Rich) Caused by *Pseudomonas fluorescens*. Proceeding of an International seminar on Fish, Pathogens and Environment in European Polyculture. June 23-27, Szarvas, Hungary, 1981; 111-123.
7. Daly, J. G.: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections . Ed. P.T.K.Woo and D.W. Bruno, 1999; 584-586.
8. Diler, Ö., Kubilay, A.: Gökkuşluğu Alabalıklarında Yüksek Mortaliteye Neden Olan Hemorajik Septisemi Ekeni *Pseudomonas* sp. Üzerinde Bir Çalışma (Poster). II. International Symposium on Aquatic Products September 21-23, 1996; İstanbul – Türkiye.

9. Frerichs, G.N., Roberts, R. J.: The Bacteriology of Teleost.Fish Pathology. Ed: Ronald J. Roberts. Bailliere Tindall, London, 1989; 300-301.
- 10 . Holt J.G., Krieg N.R.: Gram-Negative Aerobic/Microaerophilic Rods and Cocci. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition, Ed. William R. Hensyl, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994; 93-168.
11. Nedoluha, P.C. and Westoff, D.: Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. Food Microbiology, 1997; Vol. 14 (3), 255-264.
12. Post, G.: Bacterial Diseases of Fish. In: Textbook of Fish Health. Ed. Dr. George Post, T.F.H. Publications, 1987; 44-47.
13. Roberts, R.J.: The pathophysiology and Systematic Pathology of Teleosts. In: Fish Pathology. Ed. by Roberts R.J. Bailliere Tindall, London, 1978; 56-63.
14. Sakai, M., Atsuta, Kobayashi, M.: *Pseudomonas fluorescens* isolataed from the diseased rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. The Kitasato Archives of Experimental Medicine, 1989; 62 (4), 157-162.
15. Timur, G., Timur, M.: Eğirdir Gölü sudak (*Stizostedion lucioperca L. 1758*) balıklarında yüksek mortaliteye neden olan bakteriyel hemorajik septisemi hastalığı üzerinde bir Araştırma. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1985; 32 (1), 33-41.
16. Wiklund T., Länström L.: Occurence of *Pseudomonas anguilliseptica* in Finnish fish farms during 1986-1991. Aquaculture, 1994; 126. 211-217.
17. Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., and Schreckenberger, P.C.: Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Fourth Edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1992; 609-673.