

KÜLTÜR GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*)'NDAN İZOLE EDİLEN GRAM-NEGATİF PATOJENLERİN LİPOLİSAKKARİT PROFİLLERİ

Tülay AKAYLI, Özgür ÇANAK, Çiğdem ÜRKÜ

İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, Laleli İstanbul/Türkiye

Received: 23.12.2014

Accepted: 25.01.2015

Published online: 02.02.2015

Corresponding author:

Tülay AKAYLI, İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, Ordu Cad. No:200 34134 Laleli İstanbul /Türkiye

E-mail: takavli@yahoo.com

Öz:

Bu çalışma, Türkiye'nin farklı bölgelerindeki kültür gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen patojenik Gram-negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS) profillerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, hasta balık örneklerinden izole edilen *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *A. schubertii*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Yersinia ruckeri* izolatlarından LPS numuneleri elde edilmiştir. LPS profilleri, Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ve gümüş-nitrat boyama metodu ile belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, LPS analizi çalışmalarının bu bakterilerin karakterizasyonunda ve değişik coğrafik bölgelerden izole edilen suşlar arasındaki farklılıkların tespit edilmesinde kullanılabilecek faydalı araçlar olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler:

Gökkuşağı alabalığı, *O. mykiss*, SDS-PAGE, LPS

Abstract:

Lipopolysaccharide Profiles of Gram-Negative Pathogens Recovered from Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

The aim of this study was to determine the lipopolysaccharide (LPS) profiles of pathogenic Gram-negative bacteria recovered from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in different regions of Turkey. For this purpose, LPS samples were obtained from 10 bacterial isolates of *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *A. schubertii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Yersinia ruckeri* recovered from diseased fish. LPS profiles were determined by using Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and silver-nitrate staining method. Results of the study demonstrated that LPS profiling is a useful tool for characterization of these bacteria and geographic discrimination of their isolates.

Keywords:

Rainbow trout, *O. mykiss*, SDS-PAGE, LPS

Giriş

Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), ülkemizde 1970'li yıllardan beri başarıyla kültürü yapılan bir balık türüdür (Çelikkale vd., 1999). TÜİK (2013) verilerine göre ülkemizde 2012 yılında iç sularda ve denizlerde toplam 114.569 ton/yıl gökkuşluğu alabalığı üretilmiştir. Bu balığın kültüründe görülen en önemli problemlerden birisi kirlilik ve uygun olmayan yetiştiricilik koşullarına bağlı olarak gelişen bakteriyel hastalıklardır (Timur ve Timur, 2003; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Ülkemizin tümüne yayılan ve üretim miktarı her yıl artan gökkuşluğu alabalığı kültüründe de üretim miktarını kısıtlayan bir faktör olarak Gram-negatif karakterdeki bakterilerden kaynaklanan hastalıklara sıklıkla rastlanmaktadır. Günümüze kadar gerçekleştirilen pek çok çalışmada, ülkemizde kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıklarında *Aeromonas hydrophila* (Baran vd., 1981; Diler ve Altun, 1994; Köprücü ve Sarıyüpoğlu, 2010), *A. schubertii* (Akaylı vd., 2011a), *A. salmonicida* (Kırkan vd., 2003), *Vibrio (Listonella) anguillarum* (Timur ve Korun, 2004; Tanrıkul, 2007; Tanrıkul ve Gültepe, 2011), *Flavobacterium columnare* (Kubilay vd., 2008), *F. psychrophylum* (Kayış vd., 2009), *Pseudomonas fluorescens* (Akaylı ve Timur, 2004), *P. putida* (Altınok vd., 2006), *P. luteola* (Altınok vd., 2007), *P. plecoglossicida* (Akaylı vd., 2011b) ve *Yersinia ruckeri* (Çağırğan ve Yüreklitürk, 1991; Timur ve Timur, 1991, Altun vd., 2010) gibi Gram-negatif karakterdeki patojen bakterilerin hastalıklara neden olduğu rapor edilmiştir.

Gram-negatif bakterilerdeki hücre çeperi, zorlu çevre şartlarına karşı hücreyi koruma, hücreye şeklini verme ve seçici geçirgen bir bariyer olarak görev yapmanın yanı sıra bazı enzimatik sistemleri de bünyesinde bulundurur (Lima de Faria, 1969; Koebnik vd., 2000). Gram-negatif bakterilerde hücre çift katlı bir membran ile çevrilidir ve dış membran; tamamı sitoplazmada sentezlenen fosfolipidler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve integral dış membran proteinlerinden (OMP) oluşmaktadır (Bos ve Tomassen, 2004). Bakterilerin antijenik yapılarını oluşturan lipopolisakkaritlerin balıkların spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sisteminin gelişmesi üzerinde önemli etkileri olup bu yapıların belirlenmesi aşı geliştirme çalışmalarına temel teşkil eder (Fulop vd., 1995, Sakai, 1999). Solem vd. (1995) *A. salmo-*

nicida'ya ait LPS'lerin Atlantik salmonu (*Salmo salar*)'nda immunostimulant olarak kullanılabileceğini belirtirken, Acosta vd. (2004) *V. anguillarum*'a ait bu antijenlerin aynı balık türünde antikor seviyesini arttırdığını ve aşı çalışmalarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

Bakteriyel balık patojenlerinin teşhisinde, antijenik yapılarının belirlenmesinde ve serotiplendirme çalışmalarında aglütinasyon (Sorensen ve Larsen, 1986), ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) (Knappskog vd., 1993; Akaylı, 2001, Kubilay ve Timur, 2001), IFAT (Immune Fluorescent Antibody Technique) (Kubilay ve Timur, 2001), SDS-PAGE (Sodyum-Dodesil-Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) (Dooley vd., 1985; Knappskog vd., 1993) ve Western-blot (Pazos vd. 1993) gibi immunokimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. SDS-PAGE tekniği bakteri hücrelerinin, lipopolisakkarit yapılarının tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan elektroforetik yöntemlerden biridir (Laemmli, 1970; Ingram, 1993). Farklı araştırmacılar bu tekniği kullanarak *V. anguillarum* (Chart ve Trust, 1984; Knappskog vd., 1993; Boesen vd., 1999), *A. hydrophila* (Dooley vd., 1985), *P. fluorescens* (Swain vd., 2003) ve *Y. ruckeri* (Sousa vd., 2001) gibi çeşitli Gram-negatif balık patojenlerinin LPS profillerini incelemiştir.

Bu çalışmada da yurdumuzdaki kültür gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen Gram-negatif karakterdeki bakterilerin identifikasyonu ve bu izolatların Lipopolisakkarit (LPS) profillerinin SDS-PAGE metodu kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışma kapsamında Ege bölgesinde bulunan 3 adet ve Marmara bölgesinde bulunan 2 adet kültür gökkuşluğu alabalığı işletmesinden örneklem yapılmıştır. Ağırlıkları 5-130 g arasında değişen ve çeşitli hastalık belirtilerini gösteren toplam 40 adet balık örneğinden bakteriyolojik ekimler yapılmıştır. İşletmelerdeki balıkların bulunduğu havuzların su sıcaklığının Ege bölgesindeki işletmelerde ortalama 18-20 °C olduğu gözlenirken, Marmara bölgesindeki işletmelerde ise 16-18 °C arasında olduğu dikkati çekmiştir.

Bakteriyolojik inceleme

Havuzlardan canlı olarak temin edilen hasta balık örnekleri öncelikle 2-phenoxyethanol (0,1 mL/L) ile anesteziye tabi tutulduktan sonra dış ve iç klinik bulguların tespiti için otopsi işlemleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen balık örneklerinin karaciğer, böbrek ve dalak gibi iç organlarından TSA (Triptik Soy Agar) ve BHIA (Brain Heart Infusion Agar), *Pseudomonas* agar ve TCBS agar (Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose) gibi besiyerlerine bakteriyolojik ekimler yapılmıştır (Buller, 2004; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). Petri kutuları 18°C'de 4 günlük inkübasyon sonrasında primer izolasyon ile elde edilen bakteri kolonileri saflaştırılarak rutin bakteriyolojik metotlar ve API 20E hızlı teşhis kiti kullanılarak identifiye edilmiştir (Alsina vd., 1994; Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). İzole edilen bakterilerin Gram boyanma özelliği, hareket testi, Oksidasyon/Fermentasyon testi, sitokrom oksidaz ve katalaz aktiviteleri ile O/129'a duyarlılık testleri ile genus bazında identifikasyon gerçekleştirildikten sonra tür düzeyinde identifikasyon için indol, MR, VP, üre, sitrat, ONPG, nitratları indirgeme, şekerlerden asit üretimi gibi testler yanı sıra *Vibrio anguillarum* Medium besiyeri, TCBS, Waltman-Shotts agar ve *Pseudomonas* agar besiyerlerinde üreme gibi ayırt edici biyokimyasal özellikleri incelenmiştir (Alsina vd., 1994; Buller, 2004; Kimberley ve MacNair, 2004; Altun vd., 2010; Austin ve Austin, 2012).

LPS örneklerinin hazırlanması ve SDS-PAGE analizi

Bu çalışmada incelenen bakteri izolatlarının identifikasyonundan sonra aynı bakterilerin hücre zarında bulunan LPS örnekleri elde edilmiştir (Hitchcock ve Brown, 1984; Santos vd. 1995). Bu amaçla, katı besiyerinde üretilen taze bakteri kültüründen elde edilen koloniler steril bir e-küvyon çubuğu yardımı ile mikrosantrifüj tüpü içerisine toplanarak fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu ile yıkanmış ve 1.5 ml PBS içerisinde yoğunluğu OD₆₅₀'de 0.8 olacak şekilde sulandırılmıştır. 10.000 g'de 5 dakika süre ile santirifüj edilen süspansiyonun üstte kalan sıvı kısmı uzaklaştırılmış ve pelet kısmı 50 µL'lik örnek tampon (12.5 mM Tris-HCl [pH 6,8], %2 SDS, %10 [vol/vol] gliserol, %0,002 bromfenol mavisi, %5 2-merkaptto ethanol) solüsyonu ile sulandırılmıştır. Bu süspansiyona 100°C'lik sıcak su banyosunda 10 dakikalık kaynatma işleminden sonra, ortamdaki protein moleküllerinin elimine

edilmesi amacıyla üzerine 10 µL proteinaz-K (2,5 mg/mL) eklenmiş ve 60°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Elde edilen LPS örnekleri kullanılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır. SDS-PAGE analizi ise Laemmli (1970)'in metoduna göre %3'lük yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak ThermoScientific marka dikey elektroforez cihazında gerçekleştirilmiştir. Yükleme jelinde oluşturulan kuyucuklara 10 µL LPS örneği yüklenmiştir. Her bir jelde, kuyucuklardan bir tanesine de LPS örneklerinin moleküler ağırlıklarının belirlenebilmesi için protein belirteci (Fermentas PageRuler unstained protein ladder) yüklenmiştir. 80V elektrik akımında 2 saatlik elektroforetik ayırıştırmanın sonrasında LPS profillerinin görülebilir hale gelebilmesi amacıyla gümüş-nitrat boyama yöntemiyle boyanmış (Tsai ve Frasch, 1982) ve fotoğraflanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Klinik bulgular

Çalışmada materyal olarak kullanılan hasta balık örneklerinin dış bakı muayenesinde genel olarak deride pul kaybı, yüzgeçlerde erime, vücut yüzeyinde hemoraji ve ülserlerle seyreden bakteriyel hemorajik septisemi tablosu (Şekil 1) gözlenirken bazı balık örneklerinde ise bu gibi bulgulara ek olarak ağız bölgesinde hemorajiler ile özellikle sırt yüzgecinde erime tespit edilmiştir. Hasta balık örneklerinin iç bakı muayenesinde ise böbrekte erime, dalakta büyüme ve karaciğerde hemorajiler gibi çeşitli klinik bulgular tespit edilmiştir (Şekil 2).

Bakteriyolojik bulgular

Hasta balık örneklerinin iç organlarından yapılan bakteriyolojik ekimler sonucu elde edilen izolatlardan farklı biyokimyasal özelliklere sahip Gram-negatif karakterdeki 10 adet bakteri izolatu seçilerek çalışmaya dahil edilmiştir. Fenotipik ve biyokimyasal özellikleri Tablo 1'de gösterilen bu izolatlar *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas schubertii*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Yersinia ruckeri* olarak identifiye edilmiştir.

Tablo 1. Hasta kültür gökkuşuğu balığı örneklerinden izole edilen bakterilerin (1-10) fenotipik ve biyokimyasal özellikleri**Table 1.** Phenotypic and biochemical properties of bacterial isolates (1-10) recovered from diseased cultured rainbow trout samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	O	F	F	F	F
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/129 (150 µg)	H	H	D	D	D	D	D	D	D	D
İndol	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	Z
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Maltoz	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Arabinoz	+	+	-	+	-	-	Z	-	-	-
Nitrat	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Üreaz	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amilaz	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Jelatinaz	+	+	+	+	+	+	Z	+	Z	Z
ONPG	+	+	Z	Z	-	-	Z	+	+	Z
Sitrat kullanımı	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Floresan pigment	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Farklı besiyerlerinde üreme										
VAM	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
WS	-	-	-	-	-	-	Y	Y	Y	Y

İdentifikasyon	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	<i>Aeromonas schubertii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas schubertii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i>

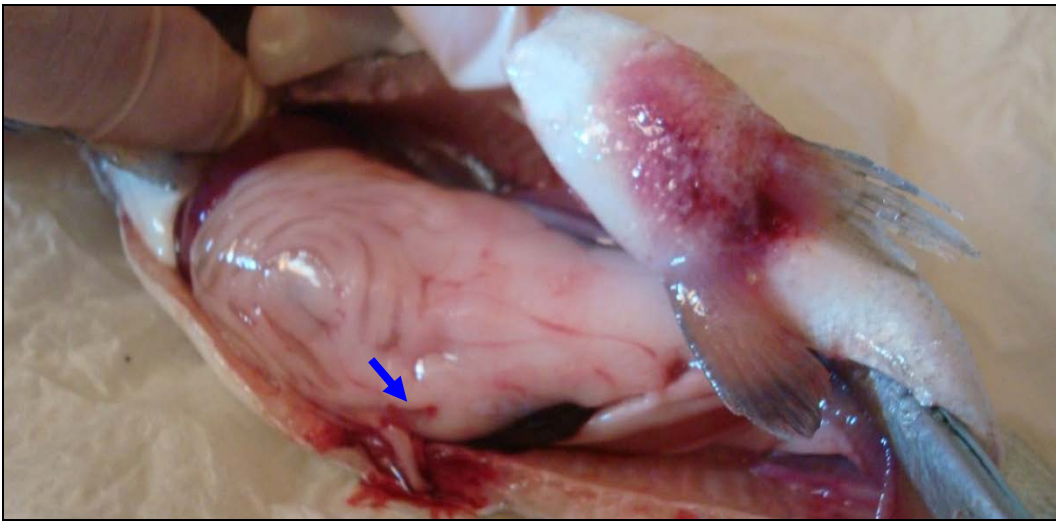
+: pozitif reaksiyon; -: negatif reaksiyon; K: krem; F: fermentatif; O: oksidatif;
H: hassas; D: dirençli; S: sarı; Y: yeşil; Z: zayıf reaksiyon

+: positive reaction; -: negative reaction; K: creamy coloured; F: fermentative;
O: oxidative; H: sensitive; D: resistant; S: yellow; Y: green; Z: weak reaction



Şekil 1. 130 g ağırlığındaki hasta balık örneğinde deride pul kaybı, yüzgeçlerde erime ve deride ülserler (okla gösterilmiştir)

Figure 1. Loss of scales, swelling of the fins and ulcers (arrowed) on the body of a 130 g diseased fish sample.



Şekil 2. 110 g ağırlığındaki hasta balık örneğinde deride kasa kadar inen ülser, hemorajik karaciğer ve dalakta büyüme (okla gösterilmiştir)

Figure 2. Ulcers expanding through the muscles on the skin, haemorrhagic liver and splenomegaly (arrowed) in a 110 g diseased fish sample.

Türe özgü seçici bir besiyerlerinden VAM besiyeri, *V. anguillarum* izolatlarının; Pseudomonas agar besiyeri ise *P. fluorescens* izolatlarının identifikasyonunun doğrulanmasında kullanılmıştır. *V. anguillarum* izolatları VAM besiyeri üzerinde 24 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında sarı renkli koloniler oluştururken (Şekil 3a), *P. fluorescens* izolatları Pseudomonas agar besiyerinde inkübe edilip UV ışığı altında incelendiğinde floresan pigment içeren koloniler oluşturmuştur (Şekil 3b). Waltman-Shotts besiyerinde ise *Y. ruckeri* olarak identifiye edilen 4 adet izolatın yeşil renkli, etrafında sarı renkli hidroliz zonu bulunan koloniler oluşturduğu görülmüştür.

LPS analizi bulguları

Bu çalışmadaki hasta balık örneklerinden izole edilen bakterilerin LPS profilleri incelendiğinde farklı coğrafi bölgelerden izole edilen aynı türe

ait bakteri izolatları arasında homojenite veya heterojenite olabileceği görülmüştür. İki farklı örnekleme bölgesinden izole edilen *V. anguillarum* izolatlarının birbirinden tamamen farklı iki LPS profili oluşturduğu ve izolatlar arasında LPS profilleri bakımından heterojenite olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4a). Bununla beraber aynı bölgeden izole edilen iki adet *A. schubertii* izolatı ve hareketli *Aeromonas* türü olan bir adet *A. hydrophila* izolatı ise birbirlerine benzer LPS profilleri oluşturmuşlardır. Benzer şekilde *Y. ruckeri* izolatlarının LPS profilleri incelendiğinde bu izolatların sık ve çok sayıda bant oluşturduğu ve farklı bölgelerden izole edilen bu izolatlar arasında da LPS profili bakımından homojenite bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4b).

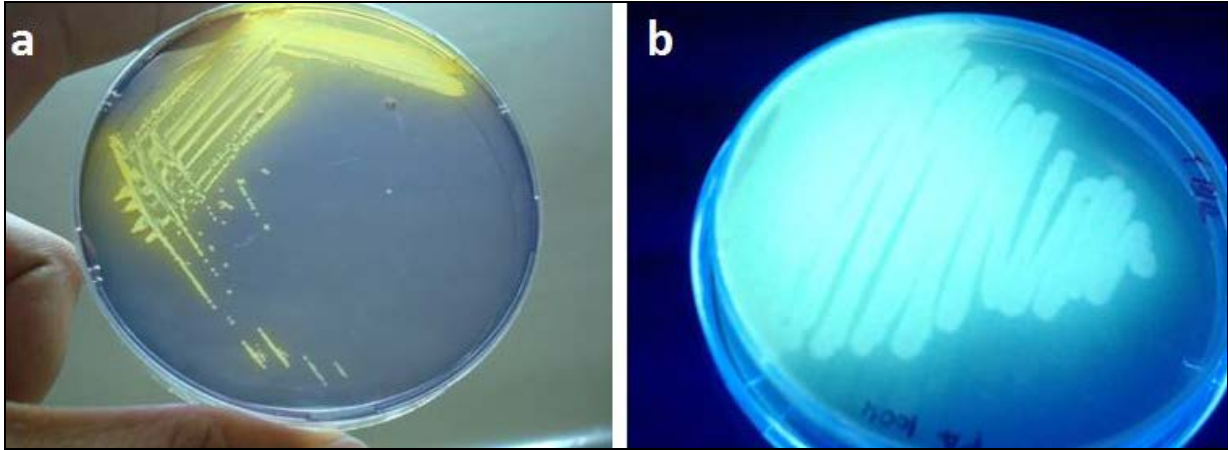
Balık hastalıklarının tedavisi amacıyla antibiyotik kullanımı konusunda gerçekleştirilen yanlış uygulamalar nedeniyle bakterilerde antibiyotik

duyarlılığı gelişmiştir ve bu da balık hastalıklarının tedavisini güçleştirmektedir (Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). Bu nedenle hastalıklara karşı önleyici önlem olarak aşı geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır. Aşı üretiminde kullanılacak suş seçimi sırasında bakterilerin identifikasyonu ve serotiplendirilmesi için genel olarak kullanılan biyokimyasal metotlar bakterilerin tür içi ayrımında yetersiz kalabilmektedir. Halbuki farklı coğrafi bölgelerden izole edilen ve aynı türe ait bakterilerin ve LPS profillerinin belirlenmesiyle daha detaylı ve güvenilir tür içi karakterizasyonları yapılmaktadır (Knappskog vd. 1993; Pazos vd., 1993; Boesen vd., 1999)

Bu çalışmada ülkemizin iki farklı coğrafik bölgeden temin edilen ve çeşitli hastalık bulguları gösteren gökkuşağı alabalık örnekleri incelenmiş ve çeşitli bakteriler izole ve identifiye edilmiştir. Ege Bölgesi'nden temin edilen kültür gökkuşağı alabalığı örneklerinden *V. anguillarum*, *A. schubertii* ve *Y. ruckeri* izole ve identifiye edilirken, Marmara Bölgesi'ndeki işletmelerden temin edilen kültür gökkuşağı alabalığı örneklerinden ise *V. anguillarum*, *P. fluorescens* ve *A. schubertii* izole ve identifiye edilmiştir.

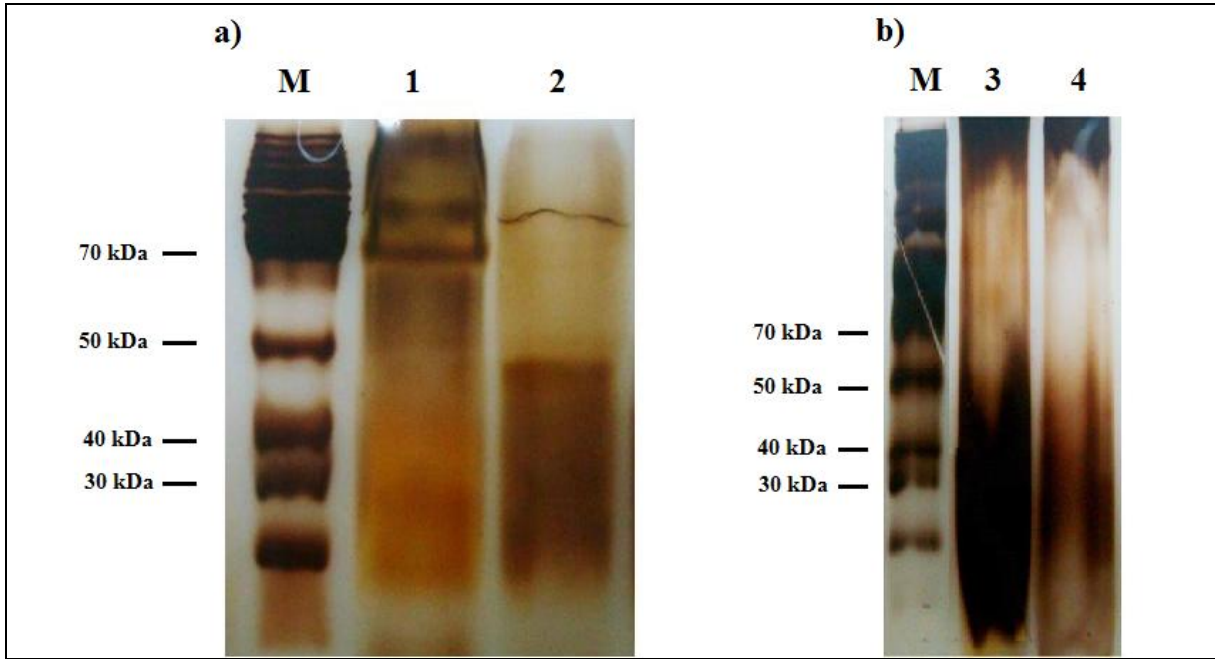
Hasta balıklarda gözlemediğimiz ve *Vibrio*, *Aeromonas* ve *Pseudomonas* türü bakterilerin neden olduğu bakteriyel hemorajik septisemi vakalarında gözlenen deride pul kaybı, yüzgeçlerde erime, vücut yüzeyinde hemoraji ve ülserler gibi klinik bulgular, diğer araştırmacıların raporlarında belirtilen klinik bulgularla benzerlik göstermiştir (Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012). Ülkemizde balık hastalıkları konusunda çalışan diğer araştırmacıların da belirttiği gibi (Çağırğan ve Yürekli, 1991; Timur ve Timur, 1991) *Y. ruckeri* ile enfekte balıklarda ise bu gibi bulgulara ek olarak ağız bölgesinde hemorajiler ile özellikle sırt yüzgecinde erime tespit edilmiştir.

Bakterilerin tür içi karakterizasyonunda ve serotiplendirilmesinde biyokimyasal testler yetersiz kalabilirken, hücre membranında bulunan protein ve lipopolisakkarit gibi yapıların SDS-PAGE analizi ile belirlenmesi sonucu daha kesin sonuçlar elde edilebilmektedir (Knappskog, 1993; Pazos vd., 1993; Pedersen vd., 1999; Boesen vd., 1999).



Şekil 3. a) VAM besiyeri üzerinde 24 saatte gelişen sarı renkli *V. anguillarum* kolonileri
b) *Pseudomonas* agar besiyeri üzerinde 24 saatte gelişen ve UV ışığı altında incelendiğinde floresan pigment üreten *P. fluorescens* kolonileri

Figure 3. a) Yellow coloured *V. anguillarum* colonies on VAM medium after 24 h incubation.
b) Fluorescent pigment producing *P. fluorescens* colonies under UV light on *Pseudomonas* Agar medium after 24 h incubation



Şekil 4. a) Farklı coğrafi bölgelerden izole edilen *V. anguillarum* suşlarının LPS profilleri (Sütun 1-2), b) Farklı coğrafi bölgelerden izole edilen *Y. ruckeri* izolatlarının LPS profilleri (3-4). M: belirteç

Figure 4. a) LPS profiles of *V. anguillarum* isolates recovered from different geographical regions (Lane 1-2), b) LPS profiles of *Y. ruckeri* isolates recovered from different geographical regions. (Lane 3-4) M: Marker

Çalışmada incelenen bakterilerden olan *V. anguillarum* izolatlarının LPS profillerinde gözlenen heterojenite durumu, daha önce salmonid balıklardan izole edilen ve aynı türe ait izolatlar arasında da tespit edilmiştir (Pazos vd., 1993; Pedersen vd., 1999; Boesen vd., 1999). Bunun yanı sıra *V. anguillarum*'un aynı serotipe ait izolatları arasında da LPS profili bakımından birtakım farklılıklar bulunduğunu bildirilmiştir (Pazos vd., 1993; Boesen vd., 199). Boesen vd. (1999) ise serotip içerisinde farklı LPS profiline sahip olan *V. anguillarum* izolatlarını, LPS profillerine göre sınıflandırmış ve bazı izolatların hem yüksek hem de düşük ağırlıklı LPS moleküllerine sahip olduğunu, bazılarının ise yalnızca düşük ağırlıklı LPS moleküllerine sahip olduğunu tespit etmiştir.

Yürütmüş olduğumuz bu çalışmadaki *Yersinia ruckeri* izolatlarının LPS profili ise Davies (1989) ve Bastardo vd. (2011) tarafından bildirildiği gibi tür içinde homojenite göstermiştir. Ancak farklı araştırmacılar *Y. ruckeri* izolatlarının LPS profilleri arasında biyotip (Tinsley vd., 2011) ve serotipe (Sousa vd., 2001) bağlı olarak ufak farklılıklar görülebileceğini bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında hasta gökkuşağı alabalıklarından izole edilen *A. hydrophila* izolatının

Dooley ve Trust (1988) tarafından; *A. schubertii* izolatlarının Kokka vd. (1992) tarafından; *P. fluorescens* izolatının ise Swain vd. (2003) tarafından bildirilen LPS profili ile benzer profiller oluşturdukları tespit edilmiştir.

Sonuç

Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda yurdumuzun değişik bölgelerindeki kültür gökkuşağı alabalıklarından farklı patojen bakteriler izole ve tanımlanmıştır. Farklı coğrafi bölgelerden izole edilen bakterilerin SDS-PAGE tekniği ile yapılan LPS profili analizleri incelendiğinde tür içinde heterojenite gösterdiği tespit edilmiştir. Lipopolisakkaritler, bakterilerin antijenik profillerini oluşturduklarından aşı geliştirme çalışmalarına da temel teşkil eder. Bu nedenle, kültür balıkçılığında bakteriyel hastalıkların önlenmesinde öncelikle yerel bakteriyel izolatların antijenik karakterizasyonunun yapılması ve sonrasında bu bakteriyel izolatlar kullanılarak bölgelere özgü balık aşularının geliştirilmesi ile hastalıklara karşı daha etkin koruma sağlanabilir.

Literatür

- Acosta, F., Lockhart, K., Gahlawat, S.K., Real, F., Ellis, A.E. (2004): Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish & Shellfish Immunology*, 17: 255-263.
- Akaylı, T. (2001). Kültür Çipura Balıklarında (*Sparus auratus*, L 1758) Vibriosis'in ELISA ve Bakteriyolojik Yöntemlerle Teşhisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Akaylı, T., Çanak, Ö., Başaran, B. (2011a): Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) görülen *Aeromonas schubertii* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4(1): 99-106.
- Akaylı, T., Çanak, Ö., Başaran, B. (2011b): Yavru kültür gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) görülen yeni bir *Pseudomonas* türü: *Pseudomonas plecoglossicida*. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4(1): 107-111.
- Alsina, M., Martinez-Picado, J., Jofre, J., Blanch, A.R. (1994): A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5): 1681-1683.
- Altınok, İ., Balta, F., Çapkın, E., Kayış, Ş. (2007): Diseases of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*. *Aquaculture*, 273(4): 393-397.
- Altınok, İ., Kayış, Ş., Çapkın, E. (2006): *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 261(3): 850-855.
- Altun, S., Kubilay, A., Diler, Ö. (2010): *Yersinia ruckeri* suşlarının fenotipik ve serolojik özelliklerinin incelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16(Suppl-B): 223-229.
- Austin, B., Austin, D.A. (2012). Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 5th edition. Springer, New York. 978-94-007-4884-2.
- Baran, İ., Timur, M., Aydın, N., İstanbulluoğlu, E., Aydın, M.K. (1981): Çifteler-Sakaryabaşı balık üretim ve araştırma istasyonunda alabalıklarda (*Salmo gairdneri irideus*) görülen bakteriyel hemorajik septisemi hastalığı üzerine incelemeler. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27: 467-473.
- Bastardo, A., Sierralta, V., Leon, J., Ravelo, C., Romalde, J.L. (2011): Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture*, 317: 229-232.
- Boesen, H.T., Pedersen, K., Larsen, J.L., Koch, C., Ellis, A.E. (1999): *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 67(1): 294-301.
- Bos, M.P., Tomassen, J. (2004): Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Current opinion in Microbiology*, 7: 610-616.
- Buller, N. (2004). Bacteria from Fish and other Aquatic Animals: a practical identification manual. CABI Publishing, Oxford, U.K., 0-85199-738-4.
- Chart, H., Trust, T. J. (1984): Characterization of the surface antigens of the marine fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(5): 703-710.
- Çağırğan, H., Yürekli Türk, O. (1991): First isolation of *Yersinia ruckeri* from a rainbow trout farm in Turkey. In: *EAFP 5th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish 1991, Budapest, Book of Abstracts*, pp.131.
- Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E., Okumus, İ. (1999). Türkiye Su Ürünleri Sektörü Potansiyeli, Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. İstanbul Ticaret Odası, Yay. No. 1999-2. İstanbul. 975-512-321-0.
- Davies, R.L. (1989). Biochemical and Cell-Surface Characteristics of *Yersinia ruckeri* in Relation to the Epizootiology and Pathogenesis of Infections in Fish. Doktora tezi, Institute of Aquaculture, University of Stirling.
- Diler, O., Altun, S. (1994): Gökkuşığı alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) hemorajik septisemi etkeni olarak izole

- edilen bazı *Aeromonas hydrophila* suşlarının biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 4: 169-178.
- Dooley, J.S., Trust, T.J. (1988): Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *Journal of Bacteriology*, 170(2): 499-506.
- Dooley, J.S.G., Lallier, R., Shaw, D. H., Trust, T.J. (1985): Electrophoretic and immunochemical analyses of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 164(1): 263-269.
- Fulop, M., Manchee, R., Titball, R. (1995): Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, 13(13): 1220-1225.
- Hitchcock, P.J., Brown, T.M. (1984): Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology*, 154: 269-277.
- Ingram, G.A. (1993). Diffusion in Gel Techniques. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., van Muiswinkel, W. B., (Eds.), Techniques in Fish Immunology: FITC1, 2nd edition. SOS Publications, New Jersey. 0-9625505-0-7.
- Kayış, Ş., Çapkın, E., Balta, F., Altınok, İ. (2009): Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern Black Sea region of Turkey. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 61(4): 339-344.
- Kırkan, S., Göksoy, E.O., Kaya, O.(2003): Isolation and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey hatchery farms. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(7): 339-342.
- Kimberley, A. W., Macnair, N.G. (2004). *Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures*. Iowa State Press, Iowa, USA. 0-8183-1952-0.
- Knappskog, D.H., Rodseth, O.M., Slinde, E., Endersen, C. (1993): Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from Vibriosis. *Journal of Fish Diseases*, 16: 327-338.
- Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P. (2000): Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37(2): 239-253.
- Kokka, R.P., Lindquist, D., Abbott, S.L., Janda, J.M. (1992): Structural and pathogenic properties of *Aeromonas schubertii*. *Infection and Immunity*, 60(5): 2075-2082.
- Köprücü, S., Sarıyyüpoğlu, M. (2010): *Aeromonas hydrophila* ile enfekte edilen gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) histopatolojik bir araştırma. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 22(1): 11-17.
- Kubilay, A., Timur, G. (2001): *Yersinia ruckeri* bakterini ile immunize edilen gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) antikor üretiminin IFAT ve ELISA teknikleri ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25: 437-445.
- Kubilay, A., Altun, S., Diler, O., Ekici, S. (2008): Isolation of *Flavobacterium columnare* from cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8: 165-169.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lima De Faria, A. (1969). *Handbook of Molecular Cytology*. North-Holland Publications, Londra.
- Pazos, F., Santos, Y., Magarinos, B., Bandin, I., Nunez, S., Toranzo, A.E. (1993): Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum* related organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9): 2969-2976.
- Pedersen, K., Grisez, L., Houdt, R.V., Tiainen, T., Ollevier, F., Larsen, J.L. (1999): Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology*, 38: 183-189.

- Roberts, R.J. (2012). Fish Pathology 4th edition. Wiley-Blackwell. 978-1444332827.
- Sakai, M. (1999): Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandin, I., Toranzo, A.E. (1995): Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2 and O3. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): 2493-2498.
- Sousa, J.A., Magarinos, B., Eiras, J.C., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. (2001): Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *Journal of Fish Diseases*, 24: 151-159.
- Solem, S.T., Jorgensen, J.B., Robertsen, B. (1995): Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 5: 475-491.
- Sorensen, U.B.S., Larsen, J.L. (1986): Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(3): 593-597.
- Swain, P., Nayak, S.K., Sahu, A., Meher, P.K., Mishra, B.K. (2003): High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis. *Comperative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 26: 199-211.
- Tanrikul, T.T. (2007): Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(10): 1733-1737.
- Tinsley, J.W., Lyndon, A. R., Austin, B. (2011): Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 111:8-16.
- Timur, G., Korun, J. (2004): First outbreak of vibriosis in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *İ. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 18(18): 1-9.
- Timur, G., Timur, M. (1991): An outbreak of enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*O. mykiss*) in Turkey. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 11(5): 182-183.
- Timur, G., Timur, M. (2003). Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No. 5, İstanbul. 975-404-699-9.
- Tsai, C.M., Frasch, C.E. (1982): A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 119(1): 115-119.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) [Online]: İstatistiksel Tablolar ve Dinamik Sorgulama - Kültür Balıkları Üretim Miktarı tablosu, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005 [Ziyaret Tarihi: 6 Kasım 2013]