

## Kültür Levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* Enfeksiyonu

Fikri BALTA<sup>1\*</sup> Hasret YILMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Rize, Türkiye. [ID: https://orcid.org/0000-0002-1823-5823](https://orcid.org/0000-0002-1823-5823)

<sup>2</sup> Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Rize, Türkiye. [ID: https://orcid.org/0000-0002-8954-6258](https://orcid.org/0000-0002-8954-6258)

Received date: 25.04.2019

Accepted date: 25.04.2019

Atf yapmak için: Balta, F. & Yılmaz, H. (2019). Kültür levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) *Vibrio parahaemolyticus* enfeksiyonu. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 4(2), 104-110.

How to cite: Balta, F. & Yılmaz, H. (2019). Infection of *Vibrio parahaemolyticus* in culture sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 4(2), 104-110.

**Öz:** Bu çalışma, Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki yüzen ağ kafeslerde kültürü yapılan levrekler (*Dicentrarchus labrax* L., 1758)'deki hastalık salgınlarından izole edilen bakterilerin tanımlanması ve antibakteriyel direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Tipik hastalık semptomları gösteren levrek balıkların böbrek ve dalaklarından %1,5 tuz içeren triptik soy ağara (TSA) ekimleri yapılmış ve 20±1°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hastalıklı balıklardan izole edilen bakteriler klasik mikrobiyolojik testler, API 20E hızlı test kitleri ve PZR metodu kullanılarak tanımlanmıştır. Bakteri izolatları steril %1,5 tuzlu suda McFarland 0,5 standart bulanıklığında API 20E test kitlerine inokulasyonu yapılmıştır. PZR testi *V. parahaemolyticus* tespit etmek için 16S rRNA gen primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların hepsinin kanlı agarda homoliz oluşturduğu ve %7 NaCl içeren peptonlu suda iyi ürediği tespit edilmiştir. İzolatların hepsi mikrobiyolojik testler ve API 20E test kiti sonuçlarına göre *V. parahaemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Universal 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PZR test sonucuna göre suşların %98 *V. parahaemolyticus* olduğu doğrulanmıştır. Antibiyogramı yapılan izolatlar sulphamethoxazole %100, ampicilline %84,4, eritromisine %71,9, oksitetrasiklin %62,5, trimetoprim-sulfametoksazol %56,3 ve streptomisin %46,9 dirençli, fakat izolatların hepsi oksolinik asit, enrofloksasine ve florfenikol'e duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Levrek, *V. parahaemolyticus*, API 20E, PZR, antimikrobiyal hassasiyet.

## Infection of *Vibrio parahaemolyticus* in Culture Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)

**Abstract:** This study was aimed to determination the antibacterial resistance profiles, and to identification of bacteria isolated from disease outbreaks of the cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) in floating net cages in the Eastern Black Sea Region of Turkey. The kidney and spleen of diseased sea bass that showed typical disease symptoms was streaked on the surface of tryptic soy agar (TSA) added with 1.5 % sodium chloride, and was incubated in the cooled incubator at 20±1°C for 48 hours. Bacteria isolated from diseased fish were identified by using conventional biochemical tests, the API 20E rapid test kits and the PCR method. All isolates were inoculated in API 20E system test kits by adjusting to a turbidity matching a 0.5 McFarland standard in sterile 1.5% saline water. PCR assay was subjected to using a universal 16s rRNA gene primers to detect *V. parahaemolyticus*. All isolates showed hemolysis on blood agar, and good growth in peptone water containing 7% NaCl. According to the 20E system and conventional biochemical test results were determined that all isolates were *V. parahaemolyticus*. All strains were confirmed as 98% *V. parahaemolyticus* by using PCR assay with 16S rRNA. Results of the testing susceptibility to antibiotics showed that *V. parahaemolyticus* isolates were resistant to 100% sulphamethoxazole, 84.4% ampicillin, 71.9% erythromycin, 62.5% oxytetracycline 56.3% trimethoprim-sulfamethoxazole and 46.9% streptomycin, but all strains were found susceptible to oxolinic acid, enrofloxacin and florfenicol.

**Keywords:** Sea bass, *V. parahaemolyticus*, API 20E, PCR, antimicrobial sensitivity.

<sup>1\*</sup>Bu çalışma Yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

<sup>1\*</sup>This research was produced from Master's thesis study.

## GİRİŞ

Türkiye’de, kültür balıkçılığı son yıllarda balık üreticileri için önemli bir yatırım haline gelmiştir. Fakat kültür balıkçılığında karşılaşılan hastalık vakaları ve yem maliyetlerinin yüksek olması üretimin sürdürülebilirliğini ve karlılığını düşüren önemli engellerdir. Doğu Karadeniz Bölgesinde deniz suyunun sıcaklığının yükseldiği (18.5-28,7°C) yaz aylarında kültürü yapılan levrek balıklarında %20-30 oranında ölümlere neden olan vibriosis salgınlarının önemli ekonomik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Balta, 2016). Deniz balıklarında, kabuklularında ve çift kabuklularında hastalık oluşturan vibriosis kültür balıkçılığında toplu ölümlere neden olduğundan, dünya çapında önemli ekonomik kayıplara sebep olan bakteriyel hastalıklardan biri olduğu bildirilmiştir (Sarjito vd., 2009; Samuelsson vd., 2006). Ayrıca, insanlarda, deniz omurgalı ve omurgasız canlılarında hastalık oluşturan birçok vibrio türlerinin enterotoksin, hemolisin, sitotoksin, proteaz, lipaz, fosfolipaz, siderofor, hücrelere tutunma faktörü ve hemaglutininler gibi çeşitli virülens faktörleri ürettiği rapor edilmiştir (Austin & Austin, 1999; Zhang & Austin, 2005). Kültürü yapılan deniz balıkları, Doğal deniz balıkları, kabuklu deniz ürünleri ve çift kabuklu yumuşakçalarından farklı vibrio türleri (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. cholera*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticum* ve *V. vulnificus*) izole edildiği bildirilmiştir (Austin & Austin, 1987;1999; 2007; 2016; Zorrilla vd., 2003).

*Vibrio* cinsinin bakterileri, Gram-negatif, düz veya kavisli çubuklar şeklinde, bir veya daha fazla kutupsal flagella sahip ve hareketli olan, oksidaz ve katalaz testi pozitif, tiosulfate citrate bile salt sucrose agarda üreyen ve fakültatif anaerobik bakteriler olduğu bildirilmiştir. Türlerin çoğu vibriostatik ajan olan O/129’a duyarlı olduğu, sodyum tuzları içeren besi yerlerinin tüm türlerin üremesini teşvik ettiği ve çoğu tür için tuzun mutlak bir gereklilik olduğu rapor edilmiştir (Zhang & Austin, 2005). Yüksek tuzluluk (30-35 ppt), yüksek sıcaklık, parazit istilası ve mekanik yaralanmalar balıklarda bağışıklık sistemini baskıladığı ve vibriosis duyarlılığını arttırdığı rapor edilmiştir (Abdelaziz vd., 2017).

Ülkemizde çeşitli balık türlerinde; levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarından (Çağırğan, 1993; 2004; Tanrikul vd., 2004; Savaş vd., 2006; Balta, 2016), çipura (*Sparus aurata*) balıklarından (Candan, 1991; Korun, 2006; Canak, 2011), mercan (*Pagrus pagrus*) balıklarından (Korun & Gokoglu, 2007) ve gökkuşağı (*Oncorhynchus mykiss*) alabalıklarından (Aksit & Kum, 2008; Balta & Dengiz Balta, 2016; 2017) *V. anguillarum*’un izole edildiği bildirilmiştir. Levrek ve çipura balıklarından (Çağırğan, 1993), gökkuşağı ve levrek balıklarından (Savaş vd., 2006), *Vibrio alginolyticus* istavrit (*Trachurus mediterraneus*) balıklarından hastalık etkeni olarak izole edilmiştir (Boran vd., 2013). Ayrıca, *V. ordalii* çipura balıklarından (Akaylı,

2001) ve levrek balıklarından (Turk, 2002; Tarikulu vd., 2004), levrek ve çipura balıklarından (Turk, 2002; Uzun & Ogut, 2015), istavrit balıklarından (Boran vd., 2014) *V. vulnificus*, levrek balıklarından *V. harveyi* izole edilmiştir (Uzun & Ogut, 2015). Bu güne kadar *V. parahaemolyticus*’un deniz suyu örnekleri, midyelerde ve tezgâhtan satın alınan deniz balık örneklerinde izole edilmesi dışında (Terzi Gulel & Martinez-Urtaza, 2016) kültürü yapılan balıklardan hastalık yaptığına dair ülkemizde bir kayıta rastlanılmamıştır.

Bu çalışma, Türkiye’nin Doğu Karadeniz Bölgesi’nde yüzer ağ kafeslerde yetiştirilen levrek (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) balıklarında görülen hastalık salgınlarından izole edilen bakterilerin tanımlanması ve bu izolatlara antibiyotiklere karşı direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

**Balık örnekleri:** Güney Doğu Karadeniz’de 2010-2015 yılları arasında 5 farklı balık çiftliğinde ağ kafeslerde yetiştiriciliği yapılan farklı boylardaki levrekler (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758)’de ortaya çıkan hastalık vakalarından örneklenen hasta balıklar Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Hastalıklar Anabilim Dalı laboratuvarına gönderilmiştir. Hastalıklar esnasında su kalite parametrelerine (su sıcaklığı, tuzluluğu, pH’sı ve oksijen) ait değerler Hach lange multimeter (Cat. No: 58258-00) cihazı ile ölçülmüştür. Tipik hastalık semptomları gösteren levrek balıklarından her defasında en az 10’ar adet balık örneği gönderilmiştir. Laboratuvara gönderilen canlı kalan hasta balıklardan parazit muayenesi yapmak için bir lamel yardımı ile deriden ve solungaç lamelerinden kazıntı örnekleri alınarak üzerine bir damla deniz suyu ilave edilen lam üzerine kapatılmıştır. Ayrıca balıkların bağırsak içeriğinden alına gaita örnekleri bir damla deniz suyu damlatılmış lam ve lamel yardımı ile iyice ezilerek kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopu altında sırasıyla 4x, 10x ve 40x büyütme objektifler kullanılarak parazit muayenesi yapılmıştır. Bu işlemin ardından balıkların kendiliğinden ölmeleri beklendikten sonra % 70’lik alkolle batırılmış pamukla balıkların dış yüzeyleri silinerek küt uçlu makas yardımıyla nekropsi yapılmıştır. Hastalıklı levreklerin iç organların görünümü ve anatomik yapısı makroskopik olarak incelenmiştir. Makroskopik ve mikroskopik olarak tespit edilen iç ve dış semptomlara ait veriler kayıt edilmiştir. Vücut yüzeyindeki yaygın hemorajiler, pul dökülmesi ve ülseratif yaraların varlığı hastalığın vibriosis olabileceğinden şüphe edilmiştir.

### **Bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu:**

Hastalıklı levrek balıkların dalak ve böbreklerinden bir öze yardımı ile alınan örnekler %1,5 NaCl ilave edilmiş triptik

soy agar (T-TSA, Merck) ve triptik soy broth (T-TSB, Merck)'a ekimler yapılmıştır. Ayrıca, vibriolar için selektif bir besi yeri olan thiosulphate citrate bile salts sucrose agara (TCBS, Merck) da ekimler yapılmış ve 20±1°C de 48 saat soğutmalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Austin & Austin, 1987; 2012; Demircan & Candan, 2006; Tanrikul, 2007;). Ekimler sonucunda T-TSA'da ve TCBS agarda üreyen 52 adet saf bakterinin biyokimyasal testleri ve antibiyotik testleri yapıldı kadar T-TSB'de üretilip %20 gliserol içeren ependorf tüplerde -80°C'de derin dondurucuda stoklanmıştır (Demircan & Candan, 2006).

Derin dondurucudan (-80°C) biyokimyasal testleri yapmak için çıkarılan suşların her biri steril T-TSB'lere ekilmiştir. Bu besi yerleri 20±1°C'de 48 saat sonunda üreyen bakteriler T-TSA'a üretilmiştir. TSA'da üreyen bakteri kolonileri TCBS agara ekilerek saflık kontrolü yapılmıştır (Tanrikul vd., 2004; Tanrikul, 2007). Biyokimyasal testlerin yapılması için TCBS agarda üreyen saf kolonilerden T-TSA'ya tekrar ekilip ekim hattı üzerine O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate salt, Sigma) vibriostatik ajan diski (10µg ve 150µg) yerleştirilmiştir. Vibrio izolatların identifikasyonu için sırasıyla, hareket muaynesi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri, OF testi, % 5 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agarda hemoliz testi yapılmıştır. İzole edilen vibrio suşlarına tuza tolerans testleri %0 ve %7 NaCl içeren peptonlu sıvı besi yerinde belirlenmiştir. Vibrio suşlarının her biri önceden hazırlanarak steril edilen 5 ml tuzlu suda (%1,5 NaCl) McFarland 4'e (bioMerieux) bulanıklığına ayarlanarak steril 1 ml otomatik pipet yardımıyla API 20E test kuyucuklarına prosedüre uygun olarak ilave edilmiş ve 25±1°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır (MacDonell vd., 1982; Grisez vd., 1991; Austin & Austin, 1999; Tanrikul vd., 2004; Popovic vd., 2007).

**Total DNA İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):** PZR testinde kullanılmak üzere Genomik DNA izolasyonu için vibrio suşlarından içeren pH 7,3'e ayarlanmış 2 ml T-TSB'e inoküle edilmiş ve 25±1°C 18 saat çalkalamalı inkübatörde (Shel Lab) üretilmiştir. Kültürün 1 ml'si ependorf tüpüne aktarıldıktan sonra santrifüjde 10000 rpm'de 5 dakika (dk)'da çöktürülmüştür. Üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra çöktürülmüş bakteri üzerine 500 µl steril deiyonize su ilave edilerek vortex yardımıyla çözündürülmüş ve thermo shaker (Hangzhou Allsheng Instruments CO, LTD)'da 100°C de 12 dk ısıtılarak parçalanmış ve 5 dk soğutulması için bekletildikten sonra 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Üst kalan sıvı kısmın 1-3µl'si PZR'de kalıp DNA olarak kullanılmıştır (Weisburg vd., 1991; Urakawa vd., 1997; Drancourt vd., 2000; Balta vd., 2010). Standart PZR karışımları için, 1,5 ünite Taq DNA polimeraz (GoTaq, Promega), 5 µl DNA, 10 µl 5X reaksiyon tamponu (Promega), 3 µl 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl 2 mM her bir dNTP ve 2 µl her bir primerden (25 pmol/µl) ve son hacim'e steril deiyonize su ile 50µl'ye tamamlanmıştır (Balta vd., 2010).

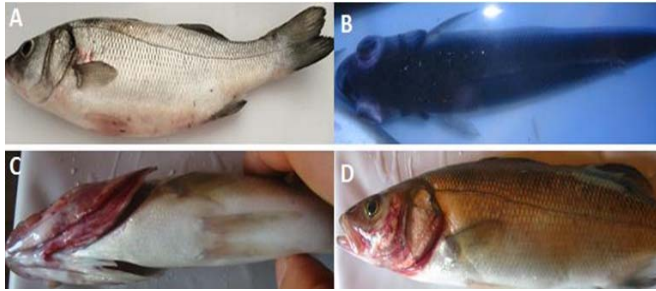
Amplifikasyon koşulları; 94°C'de 3 dk. ilk denatürasyondan sonra 34 döngü olarak ikinci denatürasyon 94°C'de 30 saniye (sn), primer bağlanması 47°C'de 30 sn, zincir uzaması 72°C'de 1 dk ve takiben son zincir uzaması 72°C'de 5 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her 8 µl'lik PCR ürünleri jel yükleme boyası ile karıştırılmış, 0,5 µg/ml ethidium bromid (Sigma, St. Louis, MO) içeren %1,5 agaroz jelde 90 V'da 30 dk yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. Levreklerin böbreklerinden izole edilen bakterileri tanımlamak için öbakterilerde 16s RNA için spesifik olan (27 F 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 1492 R 5' GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') üniversal primerler kullanılmıştır (Weisburg et al 1991, Drancourt vd. 2000). PZR ürünleri MacroGen Inc. (Amsterdam, Hollanda)'e sekans için gönderilmiştir. Gelen PZR ürünlerine ait sonuçlar GenBank veri tabanındaki BLAST opsiyonu kullanılarak sistemdeki benzerlik oranlarına (%) göre tür tayini yapılmıştır.

**Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri:** Antibiyogram duyarlılık testi Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)'nün önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır (CLSI, 2014). *V. parahaemolyticus* suşlarının 25°C'de TSA'da üretilen 24 saatlik kültürleri steril izotonik tuzlu suda (%0,9 NaCl) McFarland No: 0,5 bulanıklığına vorteks yardımı ile homojenize edilmiştir. Bu süspansiyon 37°C'deki etüvde 20 dakika nemi alınmış tuzlu (%1,5 NaCl) Mueller Hinton Agar (T-MHA) üzerine dökülmüştür. Antibiyogram testi için Bioanalyse (Türkiye) firmasından satın alınan antibiyotik diskleri sırasıyla; oksitetrasiklin (30 µg), oksalınik asit (2 µg), trimetoprim+sulfametoksazol (25 µg), sulfametoksazol (100 µg), ampisilin (10 µg), florfenikol (30 µg), streptomisin (10 µg), enrofloksasin (5 µg) ve eritromisin (15 µg) kullanılmıştır. Antibiyotik diskleri dispenser (Bioanalyse) yardımı ile T-MHA üzerine yerleştirildikten sonra 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suş ile yapılan antibiyogram testinde oluşan antibiyotik disklerin meydana getirdiği zon çapları dijital kumpasla ölçülerek antimikrobiyel hassasiyet testi için oluşturulan antibiyotik zon zapı standartları oluşturulmuştur. Bu çalışmada, *V. parahaemolyticus* suşlarının antibiyogram test sonuçları oluşturulan antibiyotik zon zapı standartlarına göre kıyaslanarak değerlendirilmiştir (Balta vd., 2010; Balta, 2016, Balta & Dengiz Balta, 2016; 2017).

## BULGULAR

Bu çalışmada, Karadeniz'de ağ kafeslerde yetiştirilen 5 gr ile 350 gr canlı ağırlığındaki levreklerde 8-27°C arasındaki farklı su sıcaklıklarında vibriozis vakasına rastlanılmıştır. Farklı su sıcaklıklarında tespit edilen su parametreleri tuzluluk 15-18 ppt, pH 7,18-7,96 ve oksijen değerleri 7,35-10,50 mg/l arasında ölçülmüştür. Hastalıklı levrek balıklarında tipik hastalık semptomları olarak renkte

kararma, gözlerde ekzoftalmus, deri üzerindeki pulların dökülmesi, dejenerasyon ve ülser, solungaçların solgun olduğu, boğaz altında, operkulum üzerinde, pektoral ve pelvik yüzgeç kaidesindeki kanamaların varlığı tespit edilmiş ve bu semptomlara ait resimler Şekil 1’de gösterilmiştir.



**Şekil 1.** Deri üzerinde kanamalar ve karında asitese bağlı şişkinlik (A), Renkte kararma ve gözlerde exophthalmos (B), Operkulum altında (C) ve üzerinde yaygın kanamaların varlığı (D) (Orijinal).

Bu çalışmada, 52 adet vibriosis vakasında toplam 520 hastalıklı levrek muayene edilmiştir. Muayene edilen levrek balıkların böbrek dokularından 52 adet vibrio suşu izole edilmiştir. Bu izolatlar TCBS agara ekildiğinde 52 vibrio suşundan 34 suşu sarı koloni verirken 18 vibrio suşu ise yeşil koloni vermesi etkenin *V. parahaemolyticus* olacağından düşündürmüştür. Levrek balıklarından izole edilen TCBS agarda yeşil koloni oluşturan izolatların suş no, izolasyon kaynağı, coğrafik bölge ve izolasyon tarihleri Tablo 1’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Hastalıklı levrek balıklarından izole edilen *V. parahaemolyticus* izolatlarına ait bilgiler.

| Suş No | İzolasyon kaynağı       | Coğrafik Bölge | Tarih      |
|--------|-------------------------|----------------|------------|
| LV05   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 31.05.2012 |
| LV10   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 05.09.2012 |
| LV11   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 05.09.2012 |
| LV14   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV15   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV16   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV17   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV18   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV19   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV20   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV21   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV22   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Yomra  | 10.11.2012 |
| LV23   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Arsin  | 25.09.2012 |
| LV24   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Arsin  | 25.09.2012 |
| LV25   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Darıca | 25.09.2012 |
| LV34   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Darıca | 07.06.2014 |
| LV35   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Arsin  | 10.08.2014 |
| LV36   | Levrek alabalığı/Böbrek | Trabzon/Darıca | 10.08.2014 |

Hastalıklı levrek balıkların böbrek dokusundan T-TSA’da izole edilen bakteri suşlarının hareketli, Gr (-), kıvrık, pleomorfik, katalaz ve oksidaz testlerinin pozitif olması, OF test sonuçlarına göre fermantatif, TCBS’de yeşil koloni oluşturması, O/129 (10 µg ve 150 µg) vibriostatik ajana duyarlılık testinin pozitif olması, %0 ve %7 NaCl tolerans test sonuçları, %5 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agarda β-hemoliz oluşturması gibi geleneksel morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları göre 18 izolatın *V. parahaemolyticus* olduğu belirlenmiştir. API 20E test kiti ile 18 izolatın test sonuçlarına göre; ONPG, H<sub>2</sub>S, URE ve TDA

testleri 1 suşun pozitif, ADH, VP ve SOR testlerinden 2 suşun pozitif, SAC ve CIT testlerinde 3 suşun pozitif olmasına karşın diğer 17 suşun negatif olduğu, MAN ve AYM testlerinde 1 suş negatif iken diğer 17 suşun pozitif olduğu belirlenmiştir. Morfolojik, biyokimyasal ve API 20E test sonuçlarına ait veriler Tablo 2’de sunulmuştur.

**Tablo 2.** *V. parahaemolyticus* izolatlarına ait morfolojik, biyokimyasal ve API 20E test sonuçları.

| Morfolojik<br>Biyokimyasal<br>Testler | Levrek balıklarından izole edilen suşlara ait stok numaraları |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | Referans |
|---------------------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
|                                       | LV05  | LV10 | LV11 | LV14 | LV15 | LV16 | LV17 | LV18 | LV19 | LV20 | LV21 | LV22 | LV23 | LV24 | LV25 | LV34 | LV35 | LV36 |          |
| Hareket                               | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| Gram                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| Şekil                                 | B   | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | B    | ?        |
| TCBS                                  | Y   | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y    | Y        |
| oksidaz                               | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| Katalaz                               | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| OF                                    | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | ?        |
| O/129                                 | H   | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | H    | R        |
| %40 Tuz                               | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| %7 Tuz                                | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| HEM                                   | β   | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | β    | ?        |
| ONPG                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| ADH                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| LDC                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| ODC                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| CIT                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| H <sub>2</sub> S                      | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | ?        |
| URE                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| TDA                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| IND                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| VP                                    | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| GEL                                   | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| GLU*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| MAN*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| INO*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| SOR*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| RHA*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| SAC*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| MEL*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| AYM*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |
| ARA*                                  | +   | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +        |

B: basil, Y: yeşil koloni, H: hassas, HEM: hemoliz (β:Beta), +: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, Tuz: NaCl, \*: karbonhidratlardan asit oluşumu, ?: test yapılmamış, Referans (Kent, 1982).

Hastalıklı levreklerden izole edilen izolatlara ait API 20E test sonuçları apıweb™ veri tabanında kontrol edildiğinde; LV05 nolu suşun *Vibrio fluvialis* (apı kod-3047524) olabileceği, LV10 nolu suşun (6577625) tanımlanamadığı, LV11 nolu suşun (4146125) %92,4 *V. alginolyticus*’a ve %6,5 ise *V. parahaemolyticus*’a benzer olabileceği, LV14-16, LV18-22 ve LV34-34 nolu izolatların (4146105) %83,8 oranında *V. parahaemolyticus*’a benzerlik gösterirken %15,3 *V. vulnificus*’a ve %0,7 *V. alginolyticus* benzerlik gösterdiği, LV17 ve LV23-25 nolu suşlar (4346105) %92,9 oranında *V. parahaemolyticus*’a ve %5,7 *V. vulnificus*’a benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Levreklerden izole edilen 18 vibrio izolatının universal 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PZR test sonuçlarından elde edilen verilerin sekans sonuçları GenBank veri tabanında değerlendirilmiş ve analiz sonuçlarına göre *Vibrio* suşlarının %99 oranında *V. parahaemolyticus* benzer olduğu teyit edilmiştir. GenBank Giriş No ve % benzerlik oranlarına ait veriler Tablo 3’de verilmiştir.

Bu çalışmada, 9 farklı antibiyotik diskleri sırasıyla, oksitetrasiklin (T, 30µg), oksalinik asit (OA, 2µg), sulfametoksazol (SMZ, 100µg), ampisilin (AM, 10µg), florfenikol (FFC, 30µg), streptomisin (S, 10µg), enrofloxasin (ENR, 5µg), eritromisin (E, 15µg) ve trimetoprim+sulfametoksazol (STX, 25µg) kullanılmıştır. İzolatların hepsinden hazırlanan antibiyogram testi



sonuçunda T-MHA üzerine yerleştirilen antibiyotik disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları dijital kompas yardımıyla ölçülmüştür. Antimikrobiyal hassasiyet test sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute tarafından tarif edilen Gram negatif ve *Enterobacteriaceae* familyası için akuakültürde kullanılan veteriner ilaç rehberindeki antibiyotik standart inhibisyon zon çaplarına göre Tablo 4’de verilen hassasiyete göre yorumlanmıştır (CLSI, 2014). Antibiyogram test sonuçlarına göre test edilen 18 adet *V. parahaemolyticus* izolatlarına ait antimikrobiyel hassasiyet profilleri Tablo 4’de verilmiştir.

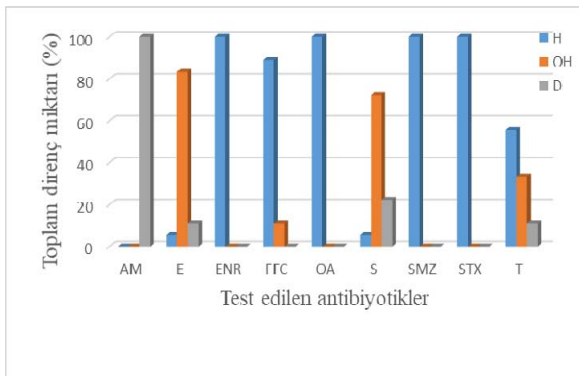
**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan *V. parahaemolyticus* izolatları ve PZR sonuçlarına göre benzerlik oranları.

| Suş No | Vibrio etkeni              | GenBank Giriş No   | Benzerlik (%) |
|--------|----------------------------|--------------------|---------------|
| LV05   | <i>V. parahaemolyticus</i> | KM406325           | % 99          |
| LV10   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972           | % 99          |
| LV11   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972           | % 99          |
| LV14   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972           | % 99          |
| LV15   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972           | % 99          |
| LV16   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, KR347266 | % 99          |
| LV17   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, KM406325 | % 99          |
| LV18   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP0099765          | % 99          |
| LV19   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP009983 | % 99          |
| LV20   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006008 | % 99          |
| LV21   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006007 | % 99          |
| LV22   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP007004 | % 99          |
| LV23   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006004 | % 99          |
| LV24   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006004 | % 99          |
| LV25   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP007004 | % 99          |
| LV34   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006004 | % 99          |
| LV35   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006004 | % 99          |
| LV36   | <i>V. parahaemolyticus</i> | CP003972, CP006004 | % 99          |

**Tablo 4.** Antibiyotik disklerine ait inhibisyon zon çapları ve *V. parahaemolyticus* izolatların hassasiyet profili.

| Antibiyotikler ve Disk Konsantrasyonları | İnhibisyon zon çapı (mm) |       |      | Antimikrobiyal hassasiyet oranı (%) |             |            |
|--|--------------------------|-------|------|-------------------------------------|-------------|------------|
|  | D                        | O     | E    | H                                   | O           | D          |
| T (30 µg)                                | ≤ 14                     | 15-18 | ≥ 19 | 10 (% 55,6)                         | 6 (% 33,3)  | 2 (% 11,1) |
| OA (2 µg)                                | ≤ 10                     | 11-12 | ≥ 13 | 18 (% 100)                          | 0           | 0          |
| SMZ (100 µg)                             | ≤ 12                     | 13-16 | ≥ 17 | 18 (% 100)                          | 0           | 0          |
| AM (10 µg)                               | ≤ 13                     | 14-16 | ≥ 17 | 0                                   | 0           | 18 (% 100) |
| FFC (30 µg)                              | ≤ 14                     | 15-18 | ≥ 19 | 16 (% 88,9)                         | 2 (% 11,1)  | 0          |
| S (10 µg)                                | ≤ 11                     | 12-14 | ≥ 15 | 1 (% 5,6)                           | 13 (% 72,2) | 4 (% 22,2) |
| ENR (5 µg)                               | ≤ 16                     | 17-20 | ≥ 21 | 18 (% 100)                          | 0           | 0          |
| E (15 µg)                                | ≤ 11                     | 14-22 | ≥ 23 | 1 (% 5,6)                           | 15 (% 83,3) | 2 (% 11,1) |
| SXT (25 µg)                              | ≤ 10                     | 11-15 | ≥ 16 | 18 (% 100)                          | 0           | 0          |

AM: Ampisilin, E: Eritromisin, ENR: Enrofloksasin, FFC: Florfenkol, OA: Oksalilik asit, S: Streptomisin, SMZ: Sulfametoksazol, SXT: Trimetoprim+ Sulfametoksazol, T: Oksitetrasiklin, H: Hassas, OH: Orta hassas, D: Dirençli.



**Şekil 2.** Levreklerden izole edilen *V. parahaemolyticus* suşları için antibiyotik direnç profili.

AM: Ampisilin, E: Eritromisin, ENR: Enrofloksasin, FFC: Florfenkol, OA: Oksalilik asit, S: Streptomisin, SMZ: Sulfametoksazol, SXT: Trimetoprim+ Sulfametoksazol, T: Oksitetrasiklin, H: Hassas, OH: Orta hassas, D: Dirençli.

Yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre *Vibrio parahaemolyticus* suşlarının hepsi ampicilline %100, streptomisine %22,2, eritromisin ve oksitetrasiklin'e %11,1

dirençli olduğu bulunmuştur. Ancak, test edilen suşların hepsi sulfametoksazol, oksolinik asit, enrofloksasine ve Trimetoprim+Sulfametoksazol duyarlı olduğu belirlenmiştir. Florfenkol'e 2 suş orta hassasiyet gösterirken %88,9 oranında hassas olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada *V. parahaemolyticus* izolatları için tespit edilen antibiyogram test sonuçlarına ait hassasiyet, orta hassasiyet ve direnç profilleri Şekil 2’de grafik olarak gösterilmiştir.

## SONUÇ ve TARTIŞMA

*Vibrio parahaemolyticus*, kabuklu deniz ürünleri, istiridye, karides, yengeç, çığ balık, mavi midye, tuzlu ringa balığı, deniz balıklarında doğal olarak bulunan bir deniz bakterisi olduğu bildirilmiştir (Pal & Das, 2010). Doğu Karadeniz Bölgesindeki offshore kafes sistemli farklı balık çiftliklerinde 2010-2015 yılları arasında aynı semptomları gösteren ve önemli ekonomik kayıplara neden olan ölüm vakalarına rastlanılmıştır. Levrekler görülen vibriosis'e ait klinik belirtiler; vücut renginde kararma, vücut yüzeyinde pulların dökülmesi ile oluşan nodüler beyaz lezyonlar ve iskelet kaslarında kanamalı olan bölgeler ve hızlı ölümlerin oluşması diğer araştırmacıların bildirdiği semptomlara benzerlik göstermiştir (Khouadja vd., 2013; Abdelaziz vd., 2017). Bu çalışmada, Karadeniz’de yüzer offshore kafeslerde yetiştiriciliği yapılan levreklerde ölümlere neden olan hastalık vakasından izole edilen 18 adet bakteri izolatının tanımlanmasında klasik biyokimyasal testler ve APİ 20E hızlı identifikasyon sistemi kullanılmıştır. Deniz bakterilerinde APİ 20E hızlı identifikasyon sistemi kullanılırken %2-3 tuz içeren steril su ve inkübasyon sıcaklığının 25°C ayarlanması gibi modifikasyonların yapılması gerektiği bildirilmiştir (Austin ve Austin, 1999). Bu çalışmada, önerilen modifikasyonların yapılmasına karşın vibrio suşların biyokimyasal test sonuçları hatalı sonuçlar vermesi nedeni ile bazı izolatların doğru tanımlanması yapılamamıştır. Bu çalışmada, APİ 20E test kitleri ile yapılan hızlı tanımlamada 15 suşun *V. parahaemolyticus*'a %83,8 - 92,9 aralığında benzer olduğu tespit edilmiştir. Kent, (1982)’de APİ 20E test kitleri kullanarak *V. parahaemolyticus*'a ait yaptığı test sonuçları ile bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında (Tablo 2) ONPG, LDC, ODC, URE, TDA, MAN ve İNO testlerine göre 17 suşun, ADH, VP ve SOR testlerine göre 16 suşun benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Aynı araştırmanın sonuçlarına göre 18 suştan 14 suşun CİT testine, 17 suşun AYM testine ve 18 suştan hiç biri ARA testine benzerlik göstermediği tespit edilmiştir. Hâlbuki, bu çalışmanın sonuçlarına göre hastalıklı levreklerden izole edilen ve TCBS agarda yeşil koloni oluşturan 18 adet vibrio izolatlarının sekansa gönderilen PZR ürünleri GenBank veri tabanındaki BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) opsiyonu kullanılarak yapılan benzerlik oranları karşılaştırıldığında farklı GenBank Giriş koduna sahip *V. parahaemolyticus* izolatlarla %99 oranında

(Tablo 3) benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Başka bir araştırmada ise bazı izolatların biyokimyasal testlerinde farklı reaksiyonlar vermesi nedeniyle türlerin hatalı tanımlandığı rapor edilmiştir (Khouadja vd., 2013). Balıklardan izole edilen vibrio izolatının APİ 20NE hızlı identifikasyon testi kullanılarak yapılmış olan ve APİ kodu 7067744 olarak verilen izolatın bu çalışmanın sonuçları ile kıyaslanamamıştır (Abdelaziz vd., 2017). Bu çalışmadaki vibrio izolatlarının hepsi TCBS agarda yeşil koloni oluşturduğu tespit edilmiş, başka bir araştırmada *V. parahaemolyticus* ve *V. Vulnificus*'un yeşil koloni oluşturdukları bildirilmiştir (Abdelaziz vd., 2017). Başka bir çalışmada, *V. parahaemolyticus* suşunun, 72 suştan 17'sinin, karideslerin yanı sıra insanlar için de yüksek derecede patojenik suşlar olduğu bildirilmiştir. *V. parahaemolyticus*, insanlara pişirilmemiş deniz balıkları, deniz ürünleri, özellikle kabuklu deniz hayvanları ve çift kabuklu yumuşakçalardan bulaşarak şiddetli ishallerle birlikte gıda zehirlenmelerine neden olduğu rapor edilmiştir (Chakraborty & Surendran, 2008).

Vibriozisin tedavisi için flumequin (6mg/kg) 6 gün, furanace (2-4 mg/kg) 3-5 gün, furazolidon (25-75 mg/kg) 20 gün, kanamisin (50 mg/kg) 7 gün, nifurprazin hidroklorid (10 mg/kg) 3-6 gün, nitrofuran (50 mg/l) 1 saat banyo, oksolinik asit (10 mg/kg) 10 gün, oksitetrasikline (50-75/kg) 10 gün, güçlendirilmiş sülfanamidler (30 mg/kg) 10 gün, sulfanamidler (sülfisoksazol, sülfamerazin, sülfametazin; 100-200 mg/kg) 10-20 gün dozunda kullanılması önerilmektedir (Austin & Austin, 1987; 1993; 1999; 2007; Frans vd., 2011), florfenikol (10 mg/kg) 10 gün (Austin & Austin, 2007) canlı ağırlık dozunda kullanılması önerilmiştir. Bu araştırmada, ampicilline %100 direç tespit edilirken, oksolinik asit, enrofloksasine, sülfametoksazole ve trimetoprim+sülfametoksazole %100 hassasiyet gösterirken florfenikole ise %89 oranında hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatlar streptomisine %22, eritromisine ve oksitetrasikline %11 oranında direnç göstermesine karşın aynı antibiyotiklere sırasıyla %72, %83 ve %33 oranında orta hassasiyet gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre hastalığın tedavisinde oksitetrasiklin, tribressen (trimetoprim+sülfametoksazole) sülfametoksazol, enrofloksasin, oksolinik asit ve florfenikol birinin kullanılması önerilmiştir.

Bu çalışma, Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yüzer ağ kafeslerde kültürü yapılan levrek balıklarında hastalık etkeni olarak *V. parahaemolyticus*'un varlığı tespit edilmiş ve antibiyogram test sonuçlarına göre hastalığın tedavisinin yapılması ekonomik kayıpları asgari düzeye indireceği belirlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından 2015.53002.103.02.1 nolu projesiyle desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abdelaziz, M., Ibrahem, M.D., Ibrahim M.A., Abu-Elala N.M. & Abdel-moneam, D.A. (2017).** Monitoring of different *vibrio* species affecting marine fishes in Lake Qarun and Gulf of Suez: Phenotypic and molecular characterization. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **43**, 141-146.
- Austin, B. & Austin, D.A. (1987).** *Vibriosis*. 263-296. In: Austin B, Austin DA (Ed), *Bacterial Fish Pathogens*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK, 364p.
- Austin, B. & Austin, D.A. (1999).** *Characteristics of the disease: gram-negative bacteria, Vibrionaceae representatives*. 29-30, 108-115, 313-332. In: Austin B, Austin DA (Ed), *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. Springer-Praxis Publishing, Chichester, UK, 457p.
- Austin, B. & Austin, D.A. (2007).** *Antimicrobial compounds*. 379-385. In: Austin B, Austin DA (Ed), *Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish*. Praxis Publishing Chichester, UK, 594p.
- Austin, B. & Austin, D.A. (2016).** *Vibrionaceae representatives*. 357-411. In: Austin B, Austin DA (Ed), *Bacterial Fish Pathogens: Disease of farmed and wild fish*. Springer, New York, 732p.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2016).** Deniz Suyuna Nakledilen Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularında Görülen Vibrio Enfeksiyonu ve Tedavisi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, **1**(1), 14-20.
- Balta, F. & Dengiz Balta, Z. (2017).** Doğu Karadeniz'de yetiştiriciliği yapılan gökkuşluğu 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. (2016).** Phenotypic, serotypic and genetic characterization and antimicrobial susceptibility determination of *Vibrio 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., 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 European Association Fish Pathologists*, **30**(6), 211-219.
- Çağırğan, H. (1993).** *Kültürü yapılan çipura ve levrek balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavileri*. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova/İzmir, 117s.
- Çağırğan, H. (2004).** Vaccine development in sea bass fry (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) against vibriosis. *EU Su Ürünleri Dergisi*, **21**(3-4), 271-274.

- Chakraborty, R.D. & Surendran, P.K. (2008).** Occurrence and distribution of virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods marketed from Cochin (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24**, 1929-1935.
- CLSI. (2014).** *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Fourth Informational Supplement.* Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, M100-S24, 230s.
- Demircan, D. & Candan, A. (2006).** Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (rpoN gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **30**, 305-310.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.P. & Raoult, D. (2000).** 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 362-3630.
- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B. & Rediers, H. (2011).** *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Disease*, **34**, 643-661.
- Grisez, L., Ceusters, R. & Oliever, F. (1991).** The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *Journal of Fish Disease*, **14**, 359-365.
- Kent, M.L. (1982).** Characteristics and identification of Pasteurella and Vibrio species pathogenic to fish using API 20 E (Analytab products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **39**(12), 1725-1729.
- Korun, J. (2006).** Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. *EU Su Ürünleri Dergisi*, **23**, 259-263.
- Korun, J. & Gokoglu, M. (2007).** *Listonella anguillarum* isolated from hatchery cultured red porgy *Pagrus pagrus* in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **6**, 823-827.
- MacDonell, M.T., Singleton, F.L. & Hood, M.A. (1982).** Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**, 423-427.
- Pal, D. & Das, N. (2010).** Isolation, identification and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fish samples in Kolkata. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **14**, 545-549.
- Popovic, N.T., Coz-Rakovac, R. & Strunjak-Petrovic, I. (2007).** Commercial phenotypic tests (api 20E) in diagnosis of fish bacteria: A review. *Veterinarni Medicina*, **52**, 49-53.
- Samuelsson, O.B., Nerland, A.H., Jorgensen, T., Schroder, M.B., Svasand, I.T. & Bergh, Q. (2006).** Viral and bacterial diseases of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*, **71**, 239-254.
- Sarjito, R., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Prayitno, S.B. & Hutabarat, S. (2009).** Phylogenetic diversity of the causative agents of vibriosis associated with groupers fish from Karimunjawa Islands, Indonesia. *Current Research in Bacteriology*, **2**(1), 14-21.
- Tanrikul, T.T., Çağrgan, H. & Toksen, E. (2004).** Levreklerden (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) izole edilen vibrio türlerinin API 20E yöntemiyle identifikasyonu. *EÜ Su Ürünleri Dergisi*, **21**, 243-247.
- Tanrikul, T.T. (2007).** Vibriosis as an epizootic disease of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **10**, 1733-1737.
- Terzi Gulel, G. & Martinez-Urtaza, J. (2016).** Molecular characterizations of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from the Black Sea, Turkey. *Letters in Applied Microbiology*, **62**(6), 494-500.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K. & Ohwada, K. (1997).** 16S rDNA genotyping PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae*. *FEMS Microbiology Letters*, **152**, 125-132.
- Uzun, E. & Ogut, H. (2015).** The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the Southeastern Black Sea. *Aquaculture*, **437**, 30-37.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, **173**, 697-703.
- Zhang, X.H. & Austin, B. (2005).** Haemolysins in vibrio species. *Journal of Applied Microbiology*, **98**(5), 1011-1019.
- Zorrilla, I., Arijo, S., Chabrilion, M., Diaz, P., Martinez-Manzanares, E., Balebona, M.C. & Morinigo, M.A. (2003).** Vibrio species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Disease*, **26**(2), 103-108.

## \*Corresponding author's:

Prof. Dr. Fikri BALTA

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı. Fener Mah., Zihni Derin Yerleşkesi, F53100/Rize, Türkiye.

✉E-mail: fikri.balta@erdogan.edu.tr

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