

Bingöl'de Ticari Bir Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Çiftliğinde *Flavobacterium psychrophilum* Salgını

Ünal İSPİR¹, Cebrahil TÜRK², Muammer KIRICI^{3*}

¹İnönü Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Battalgazi, Malatya

²Bingöl Üniversitesi, Genç MYO Su Ürünleri Programı, Bingöl

³Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü, Bingöl

*e-posta: mkirici@bingol.edu.tr

Geliş Tarihi:05/06/2013 Kabul Tarihi:26/12/2013

Özet: Bu araştırmada, Bingöl ili Karlıova ilçesinde bulunan bir gökkuşluğu alabalığı üretimhanesinde ki yavru balıklarda görülen ölümlerin nedeni araştırıldı. Hastalıklı balıkların durgun, iştahsız ve yem almadıkları görüldü. Örneklerden bakteri izolasyonu ve identifikasyonu klasik mikrobiyolojik metotlar kullanılarak yapıldı. Bu inceleme sonunda ölümlerin *Flavobacterium psychrophilum*'dan kaynaklandığı belirlendi. İşletmede toplam mortalite oranının yaklaşık olarak %80 olduğu tespit edildi. Kirby Bauer agar disk diffüzyon yöntemi kullanılarak antibiyogram testi yapıldı. Test sonrası bakterinin amoksisilin/klavulonik asit, doksisisiklin, enrofloksasin, oksitetrasiklin, siprofloksasin ve streptomisin'e karşı duyarlı; kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, gentamisin, linkomisin, ofloksasin, penisilin ve vankomisin'e ise dirençli olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşluğu alabalığı yavru sendromu, Antibiyotik duyarlılığı, *Flavobacterium psychrophilum*, identifikasyon

Flavobacterium psychrophilum Outbreaks in Commercial Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Farms in Bingöl

Abstract: In this research, it is searched for the reason of rainbow trout fry deaths in a fish farm in Karlıova, Bingöl. It was seen that the ill fish stayed still, didn't take feed and were inappetent. Bacteria isolation and identification from the samples were made by using classic microbiologic methods. From this investigation it was determined that the reason for the deaths was resulting from *Flavobacterium psychrophilum*. It was identified that the total mortality rate was 80% in the farm. Antibigram test was made by using the Kirby Bauer agar disc defusion method. By the test results it was seen that the bacteria was sensitive to amoxicillin/clavulanic acid, doxycycline, enrofloxacin, oxytetracycline, ciprofloxacin and streptomycin; resistant to chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, lincomycin, trimethoprim, ofloxacin, penicilin and vancomycin.

Keywords: Rainbow trout Fry Sendrom, Antibiotic Susceptibility, *Flavobacterium psychrophilum*, identification.

Giriş

Bakteriyel soğuksu hastalığı (Bacterial Cold Water Disease, CWD) ve/veya Gökkuşluğu alabalığı yavru sendromu (rainbow trout fry syndrome, RTFS)'na neden olan *Flavobacterium psychrophilum* gram-negatif bir bakteri olup Salmonidlerde akut septisemiye neden olmaktadır. Hastalığın ilerlemiş durumlarında kalp, dalak ile periton içinde (Wood ve Yasutake, 1956) ve infekte balıkların mukusunda (Cipriano ve ark., 1996) çok miktarda bakteri izole etmek mümkündür. Eksternal olarak kaudal pedinkülde nekrotik lezyonlar (Wood ve Yasutake, 1956; Holt, 1987; Lumsden ve ark., 1996); deride renk kararması (Borg, 1948; Evenson ve Lorenzen, 1996); spinal deformasyonlar ve spiral yüzme davranışı (Kent ve ark., 1989) gözlemlenir. BCWD ve RTFS tüm dünyada özellikle tatlısu Salmonid yetiştiriciliğinde giderek daha fazla görülmeye başlanmıştır. Fransa (Bernardet ve Kerouault, 1989); Danimarka

(Dalsgaard ve Madsen, 2000); Avustralya (Schmidtke ve Carson, 1995); Şili (Bustos ve ark., 1995); Finlandiya (Wiklund ve ark., 1994); Japonya (Wakayabashi ve ark., 1991; Wakayabashi ve ark., 1994); İngiltere (Austin ve Stobie, 1991; Santos ve ark., 1992) ve USA'da (Pacha, 1968; Kent ve ark., 1989) bu etken tespit edilmiştir.

Ülkemizin birçok bölgesinde alabalık üretim ve yetiştiriciliği yapılan tesislerde de bu patojenin izolasyonu ve identifikasyonu yapılmıştır (Balta, 1997; Çağırman ve ark., 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler ve ark., 2003; İspir ve ark., 2004; Didinen ve ark., 2007; Özer ve ark., 2008; Yıldırım ve Özer, 2010; Özcan, 2011).

Bu çalışmada, Bingöl ili Karlıova ilçesinde bir gökkuşluğu alabalığı (*O. mykiss*) işletmesinde görülen ve ölümlere sebep olan *Flavobacterium psychrophilum*'un neden olduğu enfeksiyonunun bakteriyolojik inceleme ile teşhisi yapılarak etkene

karşı pratik olarak uygulanabilir bir kemoterapi tespit edilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Bingöl ili Karlıova ilçesinde faaliyet gösteren bir gökkuşağı alabalığı işletmesinde Nisan 2012'de yavru balıklarda toplu ölümlerin görülmesi üzerine, işletmeye gidilerek yerinde incelemelerde bulunuldu. İşletmeden hijyen kurallarına ve soğuk zincire uygun olarak alınan su ve balık örnekleri (0.1–0.7 g) fakültemiz laboratuvarına getirilerek aynı gün içinde incelemeye alındı. İç organların bakışı stereo mikroskop altında gerçekleştirildi.

Enfeksiyondan şüphelenilen balıklardan; Tryptone yeast extract salts agara (TYES-A) ekimler yapılarak 15°C'de 5–10 gün inkübasyona bırakıldı. Sarı renkli koloniler seçilerek TYES-A'ya subkültürleri yapıldı ve 15°C'de 5–10 gün inkübe edildi. Ayrıca su örneklerinden de 0,5 ml alınarak TYES-A'ya ekimler yapıldı.

İzolatların identifikasyonlarında gram boyama, katalaz, oksidaz, hareket, fleksirubin, 30°C'de üreme, % 2 tuzlulukta üreme, nişasta hidrolizi, indol, jelatin hidrolizasyonu, hidrojen sülfür oluşumu, glukoz parçalanması, laktöz parçalanması, glikozun oksidasyon-fermentasyon metabolizması (O/F) testleri uygulandı. İnkübasyon 15°C'de 5-7 gün olarak gerçekleştirildi (Austin ve Austin, 1993; Brown ve ark., 1997; Dalsgaard ve Madsen, 2000; Madsen ve ark., 2005; Wiklund ve ark., 1994). Referans suş olarak *Flavobacterium*

psychrophilum (Gökkuşağı alabalığı izolatu, Kotterba, G., 2006) kullanıldı.

Antibakteriyel duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemine göre Müller-Hinton agarda yapıldı (Woodland, 2004). Gentamisin (GM, 10µg), streptomisin (S, 10µg), neomisin (N, 30µg), sulfametoksazol-trimetoprim (SXT, 1.25–23.75µg), eritromisin (E, 15µg), amoksisilin/klavulünik asit (AmC, 30µg), klindamisin (CC, 2µg), ofloksasin (OFX, 5µg), oksitetrasiklin (T, 30µg), penisilin (P, 10µg) ve vankomisin (Va, 30µg) (OXOID) diskleri kullanılarak 15°C'de 5–10 gün inkübe edildi.

Sonuçlar

İşletmeden alınan anamnazda; özellikle ortalama ağırlığı 0,5 g olan yavrularda %80 oranında ölümlerin olduğu, balıkların durgun, iştahsız veya yem almadığı belirlendi. Balıkların bulunduğu suyun 11°C düzeyinde olduğu tespit edildi. Yavru balıkların dış bakışında, renklerde kararlar gözlemlendi. Otopside ise iç organlarda ascites belirlendi.

Native olarak yapılan bakteriyolojik incelemede, iç organlarda herhangi bir bakteriye rastlanmazken, deride bakteriler tespit edildi. TYES-A'da 3–6 gün inkübasyondan sonra açık sarı pigmentli koloniler izole edildi. Besiyerinde ki kolonilerin kenarları düz, yuvarlak, sarı pigmentli ve agara yapışmadığı gözlemlendi. İzolatlara uygulanan Biyokimyasal testler sonucunda (Tablo 1) yavru balıklardan izole edilen suşun *Flavobacterium psychrophilum* olduğu belirlendi.

Tablo 1. Doğal olarak infekte gökkuşağı alabalığı yavrularından izole edilen bakterinin (*Flavobacterium psychrophilum*) biyokimyasal karakterleri

Biyokimyasal testler	İzolat
Gram boyama	-
Katalaz	+
Oksidaz	+
Hareket (oda sıcaklığında)	+*
Fleksirubin tipi pigment	+
30°C'de üreme	-
%2 tuzlulukta üreme	+/-
Nişasta hidrolizi	-
İndol üretimi	-
Jelatin hidrolizasyonu	+
Hidrojen sülfür oluşumu	-
Glukoz parçalanması	-
Glikozun oksidasyon fermentasyon metabolizması (O/F)	F
Laktöz parçalanması	-

*Kayma hareketi

Yapılan antibiyogram testi sonucunda izole bakterilerin; amoksisilin/klavulonik asit, doksisisiklin, enrofloksasin, oksitetrasiklin, siprofloksasin ve streptomisin'e karşı duyarlı;

kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, gentamisin, linkomisin, ofloksasin, penisilin ve vankomisin'e ise dirençli olduğu belirlendi (Tablo 2).

Tablo 2. İzole bakterinin (*Flavobacterium psychrophilum*) bazı kemoterapötik maddelere karşı duyarlılığı

Kemoterapötik madde	Duyarlılık
Doksisisiklin	S
Enrofloksasin	S
Siprofloksasin	S
Streptomisin	S
Oksitetrasiklin	S
Amoksisilin + klavulonik asit	S
Eritromisin	R
Trimetoprim	R
Kloramfenikol	R
Linkomisin	R
Ofloksasin	R
Gentamisin	R
Vankomisin	R
Penisilin	R

S: Sensitive (Duyarlı), R: Resistant (Dirençli)

Balıkların dış muayenesinde; bir araya toplanma eğilimi, denge bozuklukları ve deri renginde koyulaşma belirlendi. Üretim tesisinde kullanılan yavru yemlerinin ve balıkların bulunduğu havuzlardan alınan su örneklerinin kimyasal, fiziksel ve bakteriyolojik olarak yapılan analizlerinde herhangi bir olumsuz etkene rastlanmadı.

Tartışma

Bu çalışmadaki; bakteriyel izolatların identifikasyon test sonuçları, *F. psychrophilum*'un önceki bilgileriyle uyum sağlamıştır (Balta, 1997; Korun ve Timur, 2001; İspir ve ark., 2004). Bu bakteri suyun normal mikrobiyal florasında bulunmakta olup balıklar için potansiyel bir hastalık etkenidir (Arda ve ark., 2002). Bu vaka sırasında, bakterinin epizootik olarak yavru gökkuşağı alabalıklarında seyrettiği gözlenmiştir. Cytophage/Flexibakter benzeri bakterilerin tatlısu ve deniz balıkları yetiştiriciliğinin her ikisinde de kayıplara neden olduğu önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (Kent ve ark., 1988; Bernardet ve Kerouault, 1989; Dalsgaard ve Madsen, 2000; Wiklund ve ark., 1994; Austin ve Stobie, 1991; Santos ve ark., 1992). Ülkemizde de alabalık kuluçkahanelerinde izole edilmiş olup önemli

ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Balta, 1997; Çağırğan ve ark 1997; Korun ve Timur, 2001; Diler ve ark., 2003; İspir ve ark., 2004; Didinen ve ark., 2007; Özer ve ark., 2008; Yıldırım ve Özer, 2010; Özcan, 2011).

F. psychrophilum'un neden olduğu enfeksiyondan özellikle genç balıklar etkilenmektedir. *Oncorhynchus kisuch*'un genç bireylerinde bu etkenden dolayı %50 oranında mortalite görülmüştür (Holt, 1987). Gökkuşağı alabalıklarında fry sendromunun genellikle beslemenin ilk iki ayında meydana geldiği (Lorenzen ve ark., 1991) ve mortalitenin %75 civarında olduğu bildirilmiştir (Lorenzen ve ark., 1991; Bruno, 1992). Bu çalışmada da *F. psychrophilum* özellikle beslemenin ilk aylarında 0,1–0,7g ağırlığındaki fry'lerde görülmesi ve işletmelerdeki mortalite oranlarının %80'lerde olması önceki bilgileri doğrulamaktadır.

Enfekte juvenil balıklarda renklerde karar, kısmen ekzoftalmus, durgunluk ve iştahsızlık görüldüğü halde etkenin oluşturduğu lezyon ve yüzgeç dejenerasyonu gibi klinik semptomlara rastlanılamadı. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlarda lezyonların genellikle büyük balıklarda olduğu görülmüştür (Holt, 1987). Enfekte balıkların vücut boşluğunda az da olsa

sarımtırak bir sıvının olması önceki araştırmalardaki (Bruno, 1992) sonuçları desteklemektedir.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda, izole edilen suşların amoksisilin/klavulonik asit, doksisisiklin, enrofloksasin, oksitetrasiklin, siprofloksasin ve streptomisin'e karşı duyarlı; kloramfenikol linkomisin, ofloksasin, penisilin ve vankomisin'e ise dirençli olduğu belirlendi. İzole edilen suşların penisilin ve trimetoprime direnç göstermesi, oksitetrasiklin ve siprofloksasine duyarlılık göstermesi ülkemizdeki balık üretim ve yetiştiricilik tesislerinden izole edilen *F. psychrophilum* suşlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir (Korun ve Timur, 2001; Diler ve ark., 2003; İspir ve ark., 2004; Timur ve ark., 2004; Didinen ve ark., 2006). *F. psychrophilum*, eritromisin, trimetoprim, gentamisin, suşlarının antibiyotiklere karşı direnç kazanma özelliğinin olması farklı coğrafyadan izole edilen bu etkene karşı antibiyotik duyarlılıklarının da farklı olabileceğini göstermektedir.

Araştırma sonucu olarak elde edilen bulgulara göre *F. psychrophilum*, işletmelerden kolayca uzaklaştırılmayan ve önemli mortalitelere neden olan bir hastalık olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle; hastalığa karşı çözüm olarak, su sıcaklığının düştüğü aylarda işletmelerin genel hijyen durumuna dikkat edilmesi, aşırı stoklamadan kaçınılması su kalitesinin optimum değerlerde olması ve hastalık ile ilgili mücadele çalışmalarının yıl boyu sürdürülmesi önerilebilir.

Kaynaklar

- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyüpoğlu, M., 2002. Balık Hastalıkları. Medisan, Ankara, Türkiye. 51-57 pp.
- Austin B., Stobie, M., 1991. Recovery of yellow-pigmented bacteria from dead and moribund fish during outbreaks of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fry syndrome in England. *Journal of Fish Diseases*, 14: 677-682.
- Austin, B., Austin, D.A., 1993. *Bacterial Fish Pathogens*. Ellis, Horwood Limited, London, England. 384 pp.
- Balta, F., 1997. Kültürü yapılan alabalıklarda (*Oncorhynchus Mykiss*) görülen *Flexibacter psychrophila* enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Isparta, 621-648 pp.
- Bernardet J.P., Kerouault, B., 1989. Phenotypic and genomic studies of '*Cytophaga psychrophila*' isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1796-1800.
- Borg, A.F., 1948. *Studies on Myxobacteria Associated with Diseases in Salmonid Fishes*. PhD dissertation, University of Washington, Seattle.

- Brown, L.L., Cox, W.T., Levine, R.P., 1997. Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted with in salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.*, 29: 213-218.
- Bruno, D.W., 1992. *Cytophaga psychrophila*, (*Flexibacter psychrophilus*) (Borg), histopathology associated with mortalities among farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Walbaum) in the UK. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12(6): 215-216.
- Bustos, P., Calbuyahue, A., Maontaña, J., Opazo, B., Entrala, P., Solervicens, R., 1995. First isolation of *Flavobacterium psychrophilum* as causative agent of rainbow trout fry syndrome (RTFS) in Chile. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 15: 162-164.
- Cipriano R.C., Schill, W.B., Teska, J.D., Ford, L.A., 1996. Epizootiological study of bacterial cold-water disease in pasific salmon and further characterization of the etiologic agent, *Flexibacter psychrophila*. *J. Aquat. Anim. Health*, 8: 28-36.
- Çağırğan, H., Tanrıku, T.T., Balta, F., 1997. Characteristics of yellow pigmented bacteria isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Eighth International Conference, Diseases of Fish and Shell Fish, Edinburg.
- Dalsgaard, I., Madsen, L., 2000. Bacterial pathogens in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *J. Fish Dis.*, 23: 199-209.
- Didinen, B.I., Diler, B.I., Ekici, S., Altun, S., 2007. *Flavobacterium psychrophilum* izolatlarının teşhisinde API ZYM kullanımı ve ATB VET ile antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1(2): 62-68.
- Diler, Ö., Altun, S., Işıklı, B.I., 2003. Kültürü yapılan gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen *Flavobacterium psychrophilum*'un fenotipik karakterleri. Süleyman Demirel Üniv. Fen Bil. Enst. Derg., 7(1): 1-8.
- Evenson, O., Lorenzen, E., 1996. An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Dis. Aquat. Org.*, 25: 53-61.
- Holt, R.A., 1987. *Cytophaga psychrophila*, the Causative Agent of Bacterial Cold-Water Disease in Salmonid Fish. PhD thesis, Oregon State University, Corvallis.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., Dörücü, M., 2004. Doğu Anadolu Bölgesinde bazı gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinde *Flavobacterium psychrophilum* enfeksiyonunun araştırılması. Fırat Üniversitesi Fen Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(4): 718-724.
- Kent, M.L., Groff, J.M., Morrison, J.K., Yasutake, W.T., Holt, R.A., 1989. Spiral swimming behavior due to cranial and vertebral lesions associated with



- Cytophaga psychrophila* infections in salmonid fishes. Diseases of Aquatic Organisms, 6: 11–16.
- Korun, J., Timur, G., 2001. Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) fry mortalite sendromu (FMS) üzerinde bir çalışma. İstanbul Üniv. Su Ürünleri Derg., 12:15-30.
- Lorenzen, E., Dalsgaard, I., From, J., Hansen, E.M., Horlyck, V., Korshom, H., Møllergaard, S., Olesen, N.J., 1991. Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol., 11: 77 – 79.
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., Ferguson, H.W., 1996. Necrotic myositis in cage cultured rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), caused by *Flexibacter psychrophilus*. J. Fish Dis., 19:113-119.
- Madsen, L., Møller, J.D., Dalsgaard, I., 2005. *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), hatcheries: studies on broodstock, eggs, fry and environment. J. of Fish Diseases, 28(1): 39–47.
- Özcan, M., 2011. Bazı alabalık işletmelerindeki yavru gökkuşluğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss* walbaum, 1792) *Flavobacterium psychrophilum* bakterisinin belirlenmesi, fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. Doktora tezi. Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Özer, S., Demirel, M., Us, M., Yıldırım, S., 2008. Mersin İli Çağlarca Köyü'ndeki gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) kuluçkahanelerinin mikrobiyal florası. Journal of Fisheries Sciences.com, 2: 261–271.
- Pacha, R.E., 1968. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water Disease. Appl. Microbiol., 16:97-101.
- Santos, Y., Huntly, P.J., Turnbull, A., Hastings, T.S., 1992. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophillus*) in association with rainbow trout mortality in the United Kingdom. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 12: 209–210.
- Schimidtke, L.M., Carson, J., 1995. Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from atlantic salmon in Australia. Dis. Aquat. Org., 21: 157-161.
- Wakabayashi, H., Horiuchi, M., Bunya, T., Hoshiai, G., 1991. Outbreaks of cold-water disease in coho salmon in Japan. Fish Pathol., 26: 211–212.
- Wakabayashi, H., Toyama, T., Lida, T., 1994. A Study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. Fish Pathol., 29: 101–104.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönnström, L., Dalsgaard, I., 1994. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 14: 44-56.
- Wood, E.M., Yasutake, T.W., 1956. Histopathology of fish, III. Peduncle (cold-water) Disease. Prog Fish-Cult., 18: 58-61.
- Woodland, J., 2004. Bacteriology, NWFHS laboratory procedures manual, 2nd edn. Chapter 5, pp. 44.
- Pinetop Fish Health Center, Arizona, available at: http://www.fws.gov/wildfishsurvey/manual/NWFMS_Lab_Manual7.20_4.0_Edition.pdf
- Yıldırım, S., Özer, S., 2010. Mersin İli Çağlarca Köyündeki Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) kuluçkahanelerinde *Flavobacterium* spp. varlığı. J FisheriesSciences.com, 4: 112–122.



Menba Su Ürünleri Fakültesi Dergisi
Menba Journal of Fisheries Faculty
ISSN: 2147-2254

Sayı-Yıl/Vol.-Year: 1-2013
Sayfa/Page: 1-5

Pınar Çelik, Soner Bilen, İhsan Çelik

