

Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin inaktive *Flavobacterium psychrophilum* içeren aljinat mikropartikülleri ile immunizasyonu

Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with alginate microparticles containing inactivated *Flavobacterium psychrophilum*

Ünal İspir¹ • Cebrahil Türk² • Muammer Kırıcı^{3*} • M.Reşit Taysı³ • Mikail Özcan⁴

¹ İnönü Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Malatya, Türkiye

² Bingöl Üniversitesi, Genç Meslek Yüksek Okulu, Su Ürünleri Programı, Bingöl, Türkiye

³ Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Bingöl, Türkiye

⁴ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

* Corresponding author: muammerkirci@hotmail.com

Received date: 11.10.2015

Accepted date: 23.05.2016

How to cite this paper:

İspir, Ü., Türk, C., Kırıcı, M., Taysı, M.R. & Özcan, M. (2016). Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with alginate microparticles containing inactivated *Flavobacterium psychrophilum* (in Turkish with English abstract). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(3): 233-240. doi: 10.12714/egejfas.2016.33.3.07

Öz: Bu çalışmada, formalin ile inaktive edilmiş *Flavobacterium psychrophilum*'un sodyum aljinat ile kaplanmış mikropartiküller ile 28 gün için beslenen gökkuşaağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'lerinin hastalığa karşı koruma oranları tespit edildi. Balıklar kontrol, sodyum aljinatlı grup, 2.5 ve 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem, 2.5 ve 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem ile beslenen olmak üzere altı gruba ayrıldı. Oral immunizasyonu takiben 53 ve 87. gün 3.2×10^7 CFU/ml *F. psychrophilum* ile 1 saat banyo yaptırılarak deneysel enfeksiyon oluşturuldu ve nispi hayatta kalma (Relative percent survival, RPS) oranları belirlendi. İmmunizasyonun 53. gününde kontrol grubu balıklarında %79.2 oranında mortalite gözlenirken en yüksek RPS değeri 62.1 ile 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile beslenen grupta tespit edildi. *F. psychrophilum* ile 87. günde yapılan enfeksiyonda kontrol grubunda 74.8 mortalite oranı bulunmuşken diğer gruplardaki RPS oranı sırasıyla 30.48, 35.30, 40.10, 50.25 ve 56.68 olarak belirlendi. Bu bulgulara göre inaktive bakteri hücreleri kullanılarak sodyum aljinat mikropartikülleri ile kapsüllenen yem ile beslenen balıklarda koruyuculuğun yeterli düzeyde oluşmadığı ileri sürülebilir.

Anahtar kelimeler: Gökkuşaağı alabalığı, *Flavobacterium psychrophilum*, sodyum aljinat mikropartikülleri, nispi hayatta kalma oranları

Abstract: In this study, survival rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), fed for 28 days with sodium alginate microparticles containing *Flavobacterium psychrophilum* inactivated with formalin, against diseases is determined. The fishes are divided into six groups in terms of feeding method; control group, sodium alginate group, fishmeals including 2.5 and 10 mg/g *F. psychrophilum*, fishmeals of 2.5 and 10 mg/g *F. psychrophilum* encapsulated with alginate microparticles. Following by oral immunization, experimental infection is created by bathing them in 3.2×10^7 CFU/ml *F. psychrophilum* for 1 hour at 53. and 87. days and relative percent survival (RPS) rates are determined. At fifth third day of immunization, while mortality rate of 79.2% is observed for control group, the highest RPS value of 62.1 is found for the group fed with 10 mg/g *F. psychrophilum* alginate microparticles. At eighty seventh day in infectious *F. psychrophilum*, while control group's mortality rate is found 74.8, the rest of groups RPS rates are determined 30.48, 35.30, 40.10, 50.25 and 56.68 respectively. Based on these findings, it can be asserted that protectiveness of fishes, fed with fishmeal encapsulated with sodium alginate microparticles by using inactivated bacterial cells, is not achieved at a sufficient level.

Keywords: Rainbow trout, *Flavobacterium psychrophilum*, sodium alginate microparticles, relative percent survival rates

GİRİŞ

Günümüzde yetiştiricilik sektörü tür ve miktar bakımından sürekli gelişirken kültüre alınan balıkların çok çeşitli bakteriyel hastalıklar ile karşı karşıya kalması yetiştiriciliğin önünde çok büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu hastalıklara bağlı kayıplar da çok büyük olmaktadır. Bu nedenle balık yetiştiriciliğinin ekonomik olması için balık hastalıklarının kontrolünün başarılı biçimde yapılması gereklidir.

Flavobacterium psychrophilum'un neden olduğu

Gökkuşaağı Alabalığı Yavru sendromu günümüzde birçok ülkede yaygın olarak görülen enzootik bir hastalık olup, 0.2-5 g ağırlığındaki gökkuşaağı alabalığı yavruları hastalığa duyarlılık göstermektedir. Dünyanın birçok ülkesinde 1985 yılından beri gökkuşaağı alabalık yavrualarında %90'lara varan mortaliteyle kendini göstermektedir. Ülkemizde de Ege, Marmara, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki gökkuşaağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan işletmelerden bu bakteri izole edilmiştir

(Çağırğan vd., 1997; Korun ve Timur, 2001; İspir vd., 2004; Özer vd., 2008; Yıldırım ve Özer, 2010).

Aşılama, balıkları enfeksiyonlardan korumak için önemli bir işlemdir. Bakteriyel balık hastalıklarına karşı aşı olarak inaktive bakteri uygulamaları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat bakterinin inaktivasyonu sırasında antijenlerin etkisi azalmaktadır (Somerset vd., 2005). *F. psychrophilum*'a karşı inaktive canlı ya da ölü aşılar geliştirilmiş olmasına rağmen koruma süresinin yetersiz olduğu tespit edilmiştir (LaFrentz vd., 2002; Dumetz vd., 2007; Högfors vd., 2008; Plant vd., 2009; Gliniewicz vd., 2012). Balık üretiminde yaygın olarak görülmesine rağmen bu bakteri için günümüzde ticari bir aşı bulunmamaktadır (Schubiger vd., 2015).

Oral yolla aşılama, enjeksiyon ve banyo yoluyla yapılan aşılamadan uygulama bakımından daha fazla avantaja sahiptir. Fakat, aşılama oral olarak verildiği denemelerde korumanın yetersiz olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni immunojenik materyalin, vücutta immün direnç aktivasyonunun gerçekleştirileceği son bağırsaklara ulaşmadan bağırsak boyunca yıkımlanmasıdır (Vandenberg, 2004). Mikropartiküller yem kullanılarak balıkların immunizasyonunu sağlamak, ilgi çeken bir konu olmakla birlikte yapılan çalışma sayısı oldukça azdır (Piganelli vd., 1994; Polk vd., 1994; Dalmo vd., 1995; Lavelle vd., 1997; Joosten vd., 1997; Romalde vd., 2004; Tian vd., 2008; Altun vd., 2010; Behera vd., 2010; León-Rodríguez vd., 2012).

Bu araştırma ile gökkuşağı alabalığı yavru sendromuna karşı, inaktive *F. psychrophilum*'un sodyum aljinat ile kaplanmış mikropartikül bakterinler ile gökkuşağı alabalıklarında enfeksiyona karşı korunmada kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE METOT

Balık

Çalışmanın materyalini oluşturan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Devlet Su İşleri 9. Bölge Müdürlüğü, Keban Su Ürünleri Şube Müdürlüğü'nden gözlenmiş yumurta halinde alındı ve yumurtaların inkübasyonu ile elde edildi. Yumurtadan çıkan ve besin keselerini tüketen balıklar günlük olarak ticari bir alabalık yavru yemi ile beslendi. Tüm balıkların yem almaya tam olarak alışmasıyla beraber çalışma başlatıldı.

Bakteri

Çalışmada; bölgemizde bulunan gökkuşağı alabalığı işletmelerindeki balıklardan daha önceki bir çalışmamızda (İspir vd., 2004) izole edilen ve izolatanın *F. psychrophilum* olduğu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile ortaya konulan bir suş kullanıldı. *F. psychrophilum* bakterini elde edilmeden önce suşun herhangi bir kontaminasyona maruz kalıp kalmadığını tespit etmek amacıyla, etkenin bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikleri yeniden tespit edildi. Tryptone yeast extract salts agar (TYES-A) ekilerek 18°C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. Stok kültürler %15 gliserin içeren TYES-A'da -80°C'deki bir derin dondurucuda saklandı.

Bakterinin Hazırlanışı

Bakteri, TYES-A'ya ekilerek 18°C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. Tryptone yeast extract salts broth (TYES-B)'a geçilen bakterinin sıvı ortamda üremesi sağlandı. Buradan 2.5 ml alınarak içinde 250 ml TYES-B bulunan 1000 ml'lik balona aktarılıp 18°C'de 5 gün için inkübe edildi. Kültürün son hacmine %0.3 formalin ilave edildi ve bir gece için 18°C'de inkübe edilerek inaktif edildi. Formalin ile inaktif hale getirilen hücreler (FKC) 8000 x g'de 40 dakika için santrifüj edilerek toplandı.

Elde edilen FKC, +4°C'de buzdolabında bir gece bekletildikten sonra buradan alındı ve sterilite kontrolü için TYES-A'ya geçildi. Kültürler bir etüve konarak 18°C'de 5 gün için gözlemlendi. Süre sonunda hiç bir üremenin olmadığı örnekler, kullanılabildiği kadar +4°C'deki bir buzdolabında saklandı.

Sodyum Aljinat Mikropartiküllerinin Hazırlanışı

Partiküller, Mofidi vd. (2000)'in bildirdiği teknikte elde edildi. Buna göre; steril aljinat solüsyonu (%2-4) hazırlanarak %0.2-2 span 80 ve bitkisel yağ ilave edilerek hazırlanan solüsyon 500–2000 rpm'de 10 dakika karıştırıldı. *F. psychrophilum* bakterini bu solüsyona ilave edildi ve karıştırıldı. Daha sonra 75 ml jel solüsyonu (5g CaCl₂.2H₂O + 37.5 ml distile su + 37.5 ml etanol) ve 2.5 ml asetik asitin ilavesiyle hazırlanan solüsyon 500–2000 rpm'de 10 dakika karıştırıldı. Emülsiyona, son olarak 150 ml 0.05 M CaCl₂ eklendi. Mikropartiküller filtrasyon ile toplandı. Aseton ile yıkanıp kullanılabildiği kadar buzdolabında saklandı.

Oral İmmünizasyon için Yemin Hazırlanması

Gökkuşağı alabalığı beslenmesinde kullanılan ticari bir yem, distile su ile hamur kıvamına getirilerek *F. psychrophilum* ve/veya aljinat mikropartikülleri ile karıştırıldı. Homojen haline getirilmiş yem, 50 ml şırınga içerisinden geçirilerek, 48 saat oda sıcaklığında kurutuldu. Denemede pozitif ve negatif kontrol grupları yanında 4 farklı deneysel yem oluşturuldu. Bunlar;

I: kontrol (ticari bir alabalık yemi)

II. sodyum aljinat ilaveli yem (1g/kg)

III. 2.5 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem

IV. 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem

V. 2.5 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem

VI. 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem

Lethal Doz (LD) Tespiti

F. psychrophilum suşunun letal dozunun belirlenmesi Reed ve Muench (1938) metodundan yararlanılarak yapıldı. Bunun için, PBS ile sulandırılmış 10⁴–10¹⁰ hücre/ml canlı bakteri her gruptaki 20 balığa 1 saat banyo şeklinde uygulandı. Kontrol grubu balıkların sularına ise steril Fosfat Buffer Salin (PBS) ilave edildi. On dört gün boyunca mortalite oranı kaydedilerek SPSS istatistik programı ile Probit analizi yapılarak hesaplandı.

Balıkların İmmünizasyonu

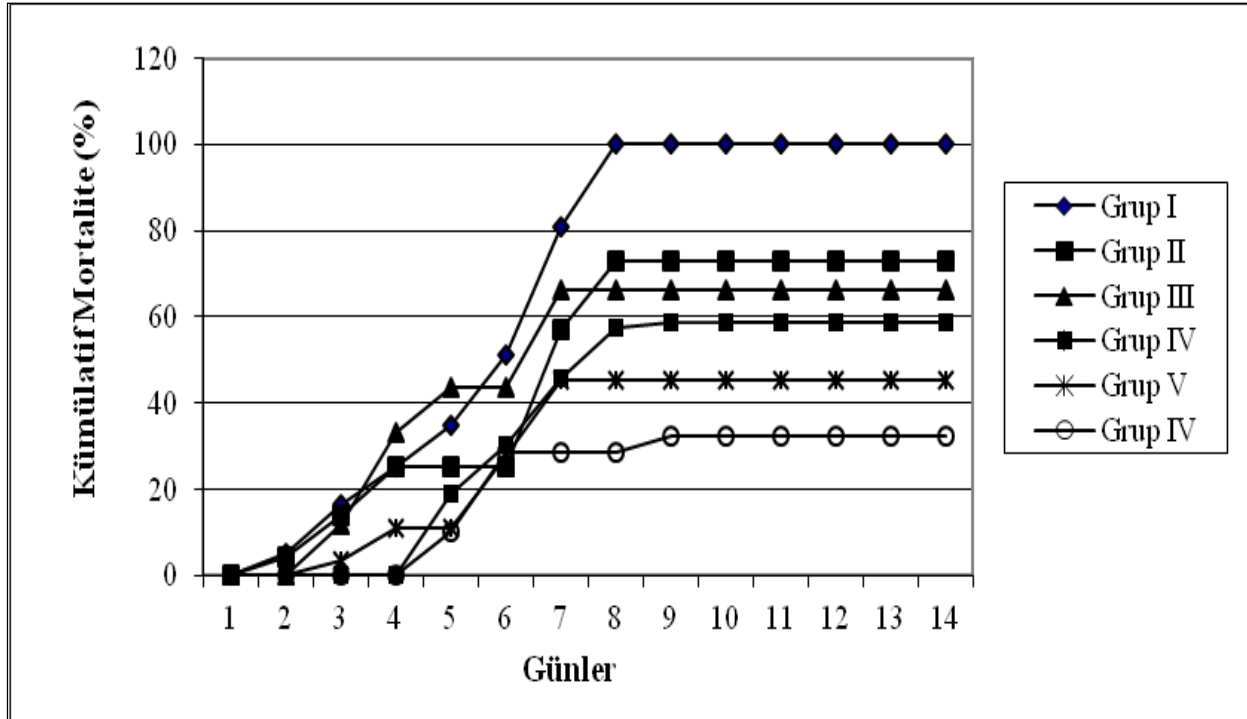
DSİ 9. Bölge Müdürlüğü, Keban Su Ürünleri Şube Müdürlüğünden temin edilen gözlenmiş yumurtalar laboratuvarlarımızda kurulan düzeneklere yerleştirilerek açılmaları sağlandı. Açılan ve besin keselerini tüketen yavrular her grupta 250 adet olacak şekilde 2'si kontrol (ticari bir alabalık yemi, sodyum aljinat ilaveli yem) 4'ü deneysel grup (2.5 ve 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; 2.5 ve 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleriyle kapsüllenen yem) olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Ağırlıkları 0.5–1 g olan balıklar kontrol ve deneme yemleri ile 28 gün beslendi. Daha sonra balıklar, [Kondo vd. \(2003\)](#)'nın bildirdiği şekilde *F. psychrophilum*'un belirlenen LD70 dozu ile 1 saat banyo yaptırılarak enfekte edildi. Kontrol grubu balıkların sularına ise steril fosfat buffer salin (PBS) ilave edildi. On dört gün boyunca mortalite oranı kaydedildi. Yeni ölmüş veya ölmek üzere olan balıkların iç organlarından TYES-A'ya ekimler yapıp 18°C'de 5 gün inkübe edildi. İç organlardan *F. psychrophilum* izole edilen balıklar bu bakteriden kaynaklanan ölüm olarak kaydedildi. Nispi hayatta kalma oranı aşağıdaki formüle göre tespit edildi ([Amend, 1981](#)), Nispi Hayatta Kalma Yüzdesi (RPS): [1- (Aşılılardaki Ölüm Oranı / Aşısızlardaki Ölüm Oranı)] x 100

İstatistiksel Analizler

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri Minitab Software istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Oral immunizasyonun zamana bağlı olarak balıkların hayatta kalma etkisi varyans analizi (ONEWAY – ANOVA) ile test edildi.

BULGULAR

F. psychrophilum suşunun LD70 dozu, yapılan probit analizi sonucu 3.2×10^7 hücre/ml olarak tespit edildi. Balıkların sodyum aljinat ve *F. psychrophilum* içeren sodyum aljinat mikropartikülleri ile oral immunizasyonu sonucu 53. günlerde *F. psychrophilum*'un LD70 dozu ile yapılan eprüvasyon sonuçları [Tablo 1-2](#) ve [Şekil 1-2](#)'de verilmiştir. Buna göre 53. günde yapılan eprüvasyon sonucunda kontrol grubu balıklarda mortalite %79.2 oranında görüldüğü halde sodyum aljinat içeren kontrol grubunda da %56 oranında mortalite saptanmıştır. Buna karşın hem inaktive *F. psychrophilum* hem de *F. psychrophilum* ve aljinat mikropartikülleri içeren yemlerle beslenen balıklarda (Grup III-VI) mortalite oranı kontrol grubu balıklarına göre azaldığı ($p < 0.05$) tespit edildi.



I. kontrol (ticari bir alabalık yemi); II. sodyum aljinat ilaveli yem (1 g/kg); III. 2.5 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; IV. 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; V. 2.5 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem; VI. 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem

Şekil 1. Gökkuşluğu alabalığı yavrularında *F. psychrophilum*'a karşı oral yolla uygulanan aşı formülasyonlarının 53. günde kümülatif mortaliteye etkisi

Figure 1. The effect of orally administered vaccine formulations against *F. psychrophilum* to cumulative mortality at 53th day in rainbow trout fry

Grup III, IV, V ve VI'daki mortalite oranları sırasıyla 5.0, 47.2, 38.8 ve 30.0 olarak bulundu. 53. günde yapılan epruvasyon sonucunda ise en yüksek korumayı 62.1 RPS ile grup VI olduğu tespit edildi. Diğer gruplardaki RPS oranı ise sırasıyla 29.3, 33.4, 40.4 ve 51.0 olarak hesaplandı. Deneysel gruplarda ölümler 2. günden itibaren başladı ve 8. güne kadar devam etti.

İmmünizasyonu yapılan balıklara 87. günde yapılan 2. epruvasyon sonucunda ise; kontrol grubu balıklarda mortalite %81 oranında görüldüğü halde sodyum aljinat içeren kontrol grubunda da %52 oranında mortalite saptanmıştır. Buna karşın

53. günde olduğu gibi hem inaktive *F. psychrophilum* hem de *F. psychrophilum* ve aljinat mikropartikülleri içeren yemlerle beslenen balıklarda (Grup III-VI) mortalite oranının kontrol grubu balıklarına göre istatistiki olarak azaldığı ($p < 0.05$) tespit edildi. Grup III, IV, V ve VI'daki mortalite oranları sırasıyla 48.4, 44.0, 37.2 ve 32.4 olarak bulundu. 87. günde yapılan epruvasyon sonucunda en yüksek korumayı 56.68 RPS ile yine grup VI'de olduğu tespit edildi.

Diğer gruplardaki RPS oranı ise sırasıyla 30.48, 35.3, 40.10 ve 50.25 olarak hesaplandı. Deneysel gruplarda ölümler 4. günden itibaren başladı ve 13. güne kadar devam etti.

Tablo 1. Gökkuşluğu alabalığı yavrularında *F. psychrophilum*'a karşı hazırlanan aşılardan etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan deneme grupları

Table 1. Treatment groups used in evaluation of vaccine efficacies prepared against *F. psychrophilum* in rainbow trout fry

Gruplar	Balık sayısı I.Epruvasyon (53. gün)	Epruvasyon Oranı (hücre/ml)
Grup I	250	3.2x10 ⁷
Grup II	250	3.2x10 ⁷
Grup II	250	3.2x10 ⁷
Grup IV	250	3.2x10 ⁷
Grup V	250	3.2x10 ⁷
Grup VI	250	3.2x10 ⁷
II. Epruvasyon (87. gün)		
Grup I	250	3.2x10 ⁷
Grup II	250	3.2x10 ⁷
Grup II	250	3.2x10 ⁷
Grup IV	250	3.2x10 ⁷
Grup V	250	3.2x10 ⁷
Grup VI	250	3.2x10 ⁷

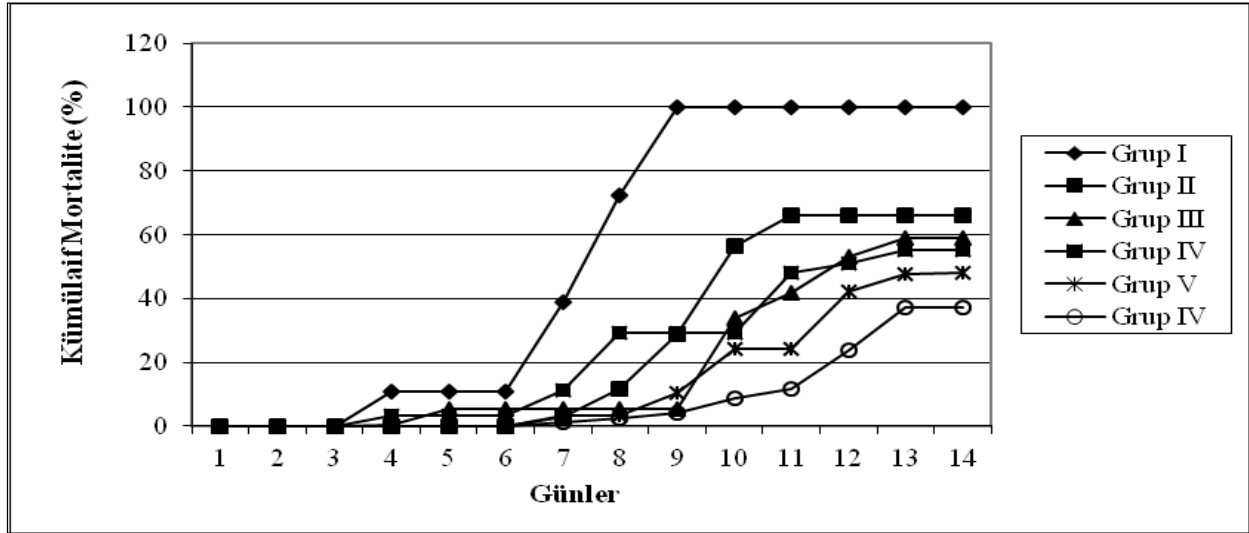
I. kontrol (ticari bir alabalık yemi); II. sodyum aljinat ilaveli yem (1 g/kg); III. 2.5 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; IV. 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; V. 2.5 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem; VI. 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem

Tablo 2. Gökkuşluğu alabalığı yavrularında *F. psychrophilum*'a karşı oral yolla uygulanan farklı aşı formülasyonlarının koruma etkinliği

Table 2. Protective efficacy of orally administered different vaccine formulations against *F. psychrophilum* in rainbow trout fry

Gruplar	Mortalite I.Epruvasyon (53. gün)	RPS
Grup I	79.2	-
Grup II	56.0	29.3
Grup II	52.0	33.4
Grup IV	47.2	40.4
Grup V	38.8	51.0
Grup VI	30.0	62.1
II. Epruvasyon (87. gün)		
Grup I	74.8	-
Grup II	52.0	30.48
Grup II	48.4	35.30
Grup IV	44.8	40.10
Grup V	37.2	50.25
Grup VI	32.4	56.68

I. kontrol (ticari bir alabalık yemi); II. sodyum aljinat ilaveli yem (1 g/kg); III. 2.5 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; IV. 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; V. 2.5 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem; VI. 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem



I. kontrol (ticari bir alabalık yemi); II. sodyum aljinat ilaveli yem (1 g/kg); III. 2.5 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; IV. 10 mg/g *F. psychrophilum* içeren yem; V. 2.5 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem; VI. 10 mg/g *F. psychrophilum*'un aljinat mikropartikülleri ile kapsüllendiği yem

Şekil 2: Gökkuşluğu alabalığı yavrularında *F. psychrophilum*'a karşı oral yolla uygulanan aşı formülasyonlarının 87. günde kümülatif mortaliteye etkisi

Figure 2. The effect of orally administered vaccine formulations against *F. psychrophilum* to cumulative mortality at 87th day in rainbow trout fry

TARTIŞMA

F. psychrophilum'a karşı intraperitoneal (i.p) olarak immunizasyon denemeleri (Holt, 1987; Obach ve Baudin Laurencin, 1991; LaFrentz vd., 2002; 2004; Rahman vd., 2002; 2003) yapılmıştır. Coho salmon, gökkuşluğu alabalığı ve *Plecoglossus altivelis*'da adjuvantsız ve adjuvantlı aşı preparasyonları kullanılmıştır (Holt, 1987; Obach ve Baudin Laurencin, 1991; Rahman vd., 2000; 2002; 2003; LaFrentz vd., 2002; 2004). Holt (1987) ve LaFrentz vd. (2002), Coho salmon ve gökkuşluğu alabalığında formalin ile inaktive edilmiş *F. psychrophilum* hücreleri ve Freund's complete adjuvant (FCA)'ın i.p enjeksiyon ile iyi bir korunmanın oluştuğunu bildirmiştir. Aynı şekilde *Plecoglossus altivelis*'da da *F. psychrophilum*'un lipopolisakarit ve dış membrane proteinleri (OMP) içeren deneysel bir aşının etkili olduğu tespit edilmiştir (Rahman vd., 2002). LaFrentz vd. (2002), *F. psychrophilum*'un 41-49 ve 70-110 kDa ağırlığındaki immunojenik bölgelerinin FCA ile emülsifiyesi ile hazırlanan aşının bakteriye karşı korunmada etkili olduğunu bildirmişlerdir. Obach ve Baudin Laurencin (1991), gökkuşluğu alabalıklarında ısı ile inaktive edilmiş *F. psychrophilum* hücrelerini adjuvant kullanmadan i.p olarak enjekte etmiş ve iyi bir korunmanın sağlandığını rapor etmişlerdir. Rahman vd. (2002) ise, adjuvant ilave edilmemiş formalin ile inaktive hücrelerin intra peritoneal (i.p) olarak uygulamasının *F. psychrophilum* enfeksiyonuna karşı etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Diğer bakteriyel balık patojenleri ile kıyaslandığında, *F. psychrophilum* ile ilgili olarak spesifik antijen immunitesi ve deneysel aşı geliştirme bilgilerinin yetersiz kaldığı bildirilmiştir. Balık serumundaki komplement sistem humoral savunmada rol

oynamasına rağmen, *F. psychrophilum* ile doğal enfekte olmuş gökkuşluğu alabalığı yavrularında etkene yanıtın yetersiz kaldığı ifade edilmiştir (Ekman, 2003; Nematollahi vd., 2003; Cipriano ve Holt, 2005). Dalsgaard (2000), biri i.p. ve diğeri de banyo tarzında olmak üzere aşılama çalışması gerçekleştirmiştir. Periton içi aşılama ile alınan immün yanıtın banyo tarzında yapılan aşılama göre daha zayıf olduğu saptanmış fakat kesin sonuçlar elde edilememiştir. İmmunstimulan yemlemenin de non-spesifik immün sisteme etki etmediği belirtilmiştir. Etkenin özellikle gökkuşluğu alabalığı yavrularında bağışıklık sistemini baskı altına alarak enfeksiyona yol açtığı bilinmektedir. Deneysel olarak i.p. uygulanan bakterin aşılarının, yavrularda bağışıklık sağlamadığı tespit edilmiştir (Ekman, 2003; Nematollahi vd., 2003; Cipriano ve Holt, 2005). Bu nedenlerden dolayı bu bakteriye karşı pratik olarak kullanılabilecek yeni aşı stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada *F. psychrophilum*'a karşı koruyuculuğu arttıran hem de kolay uygulanması nedeniyle işletmelerde pratik olarak uygulanabilecek oral bir aşılamanın uygulaması gerçekleştirildi ve aljinat mikropartikülleri ile kapsüllenen *F. psychrophilum* antijeninin balıklarda koruyucu etki sağladığı fakat bu etkenin yeterli düzeyde olmadığı tespit edildi.

İmmunostimulantların, akuatik hayvanların bağışıklık sistemini artırdığı ve patojenlere karşı direnci tetiklediği önceki çalışmalarda gözlenmiştir (Sakai, 1999; Ringo vd., 2012). Sodyum aljinat gibi polisakaritlerin balık patojenlerine karşı balıkta ve karideslerde koruyuculuğu arttırdığı tespit edilmiştir (Fujiki vd., 1994; Fujiki ve Yano, 1997; Liu vd., 2006; Yeh vd., 2008). Kahverengi alglerden elde edilen sodyum aljinat türevlerinin sazanlarda Edwardsiella tarda enfeksiyonuna karşı

korunmayı ve non-spesifik bağışıklık sistemini olumlu olarak arttırdığı rapor edilmiştir (Fujiki vd., 1994; Fujiki ve Yano, 1997). Yemlere sodyum aljinat ilavesinin karideslerde Streptococcus sp. ve iridovirüs enfeksiyonlarına karşı koruyuculuk sağladığı da bildirilmiştir (Liu vd., 2000; Chiu vd., 2008; Yeh vd., 2008).

Bu çalışmada diyetlere sodyum aljinat (1.0 g/kg) uygulanan gökkuşuğu alabalıklarında (Grup II) *F. psychrophilum*'a karşı hayatta kalma oranını artırdığı tespit edilmiştir. Sodyum aljinatın patojenlere karşı direnci artırması türe, beslenme sıklığına ve doza bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Cheng vd., 2005).

Diğer bakteriyel balık enfeksiyonlarında olduğu gibi *F. psychrophilum*'dan kaynaklanan sorunlarda da oral immunoprofilaksinin oluşturulması hem işgücü rahatlığı sağlaması ve hem de balık büyüklüğünde sınırlandırmanın daha az olmaması nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak oral immunizasyon ile korunmanın sınırlı olduğu da bildirilmiştir (Dumetz vd., 2007; Högfors vd., 2008; LaFrentz vd., 2008; Plant vd., 2009; Gliniewicz vd., 2012). Formalin ile inaktive *F. psychrophilum* ile 0.5 g ağırlığındaki juvenil *Plecoglossus altivelis* oral yolla aşılanmıştır (Kondo vd., 2003). Formalin ile inaktive *F. psychrophilum* karıştırılmış yemler ile 2 hafta boyunca beslenen balıklar 3 ve 7. haftalarda deneysel olarak canlı bakteriye maruz bırakılarak aşının etkinliği test edilmiştir. Ancak enfeksiyona karşı korunmanın yeterli olmadığı tespit edilmiştir (Kondo vd., 2003). Aoki vd., (2007) inaktive *F. psychrophilum*'u 1.6 g ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıklarına oral yola vermiş ve immunizasyonun düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Sudheesh vd., (2016), sınırlı miktarda demir ilave edilmiş besi yerlerinde üretilen *F. psychrophilum* ile beslenen gökkuşuğu alabalıklarında, denemenin 2. ve 7. haftasında

antikor düzeyinin kontrol grubu balıklarına oranla önemli derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Üretilen aşının RPS değerinin %69 olduğunu tespit etmişlerdir. Romalde vd. (2004), lactococcus enfeksiyonuna karşı kapsüllenmiş ve kapsüllenmemiş yem ile beslenen alabalıklarda immunizasyon sağlandığını ve RPS değerini oldukça yükselttiğini bildirmiştir. Uygulamanın 30. gününde korumanın %87 arttığını tespit etmişlerdir. Benzer sonuçlar *Vibrio anguillarum*'a karşı oral aşılama yapılan balıklarda da gözlenmiştir (Joonsten vd., 1997).

Kontrol grubu balıklarda 53. günde mortalite oranı %79.2 ve 87. günde %74.8 olarak bulunmuştur. Aynı şekilde sodyum aljinat, *F. psychrophilum* ve *F. psychrophilum* ile sodyum aljinat karışımının uygulandığı gruplarda da 87. günde RPS değerinde de bir azalmanın olduğu görülmektedir. Kontrol grubundaki mortalite düşüklüğünü balıkların ağırlığı değiştiğinden dolayı direnç artışına, deneme gruplarındaki azalmayı ise aşı etkinliğinin azalmasından kaynaklanabileceğine bağlayabiliriz.

Bu çalışmada bakterinin oral uygulanmasından 52 ve 87. gün sonunda RPS değeri en yüksek VI. grupta 62.1 ve 56.68 olarak tespit edildi. Mikropartiküler yemlerle gökkuşuğu alabalığında *F. psychrophilum*'a karşı yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bulgulara göre inaktive bakteri hücreleri kullanılarak sodyum aljinat mikropartikülleri ile kapsüllenen yemlerle beslenen balıklarda koruyuculuğun yeterli düzeyde oluşmadığı ileri sürülebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2010-09).

KAYNAKÇA

- Altun, S., Kubilay, A., Ekici, S., Didinen, B.I., & Diler, O. (2010). Oral vaccination against lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using sodium alginate and poly (lactide-co-glycolide) carrier. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas*, 16(Suppl-B): 211-217. doi:10.9775/kvfd.2009.1327
- Amend, D.F. (1981). Potency testing of fish vaccines. In D.P. Anderson, H. Hennessen, (Ed.), *Fish Biologies: Serodiagnostics and Vaccines, Development in Biological Standardization* (pp 447-454). Karger: Basel.
- Aoki, M., Kondo, M., Nakatsuka, Y., Kawai, K., & Oshima, S. (2007). Stationary phase culture supernatant containing membrane vesicles induced immunity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry syndrome. *Vaccine*, 25(3): 561-569. doi:10.1016/j.vaccine.2006.07.047
- Behera, T., Nanda, P.K., Mohanty, C., Mohapatra, D., Swain, P., Das, B.K., Routray, P., Mishra, B.K., & Sahoo, S.K. (2010). Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with poly d, L lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(2): 320-325. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.009
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., & Chen, J.C. (2005). Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 18(1): 1-12. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.002
- Chiu, S.T., Tsai, R.T., Hsu, J.P., Liu, C.H., & Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. *Aquaculture*, 277(1-2): 66-72. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.01.032
- Cipriano, R.C., & Holt, R.A. (2005). *Flavobacterium psychrophilum*, cause of bacterial cold-water disease and rainbow trout fry syndrome, Fish Disease Leaflet No. 86 United States Department of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, USA.
- Çağırğan, H., Tanrikul, 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 (pp. 73-81). Edinburgh, Scotland.
- Dalmo, R.A., Leifson, R.M., & Bogwald, J. (1995). Microspheres as antigen carriers: studies on intestinal absorption and tissue localization of polystyrene microspheres in Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Diseases*, 18(1): 87-91. doi:10.1111/j.1365-2761.1995.tb01270.x
- Dalsgaard, I. (2000). Prevention of trout diseases caused by *Flavobacterium psychrophilum* and *Ichthyophthirius multifiliis*. AquaFlow News, Retrieved from http://www.aquainnovation.net/aquainnovation/knowledgebase/afshowarticle_en.asp?aid=292&AFI=en (01.10.2015).
- Dumetz, F., LaPatra, S.E., Duchaud, E., Claverol, S., & Le Hénaff, M. (2007). The *Flavobacterium psychrophilum* OmpA, an outer membrane glycoprotein, induces a humoral response in rainbow trout. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1461-1470. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03359.x
- Ekman, E. (2003). Natural and experimental infections with *Flavobacterium psychrophilum* in salmonid fish. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Pathology, Uppsala, Sweden.

- Fujiki, K., Matsuyama, H., & Yano, T. (1994). Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, 17(4): 349-355. doi:10.1111/j.1365-2761.1994.tb00230.x
- Fujiki, K., & Yano, T. (1997). Effects of sodium alginate on the non-specific defence system of the common carp, (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 7(6): 417-427. doi:10.1006/fsim.1997.0095
- Gliniewicz, K., Plant, K.P., Lapatra, S.E., Lafrentz, B.R., Cain, K., Snekvik, K.R., & Call, D. R. (2012). Comparative proteomic analysis of virulent and rifampicin-attenuated *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 35(7): 529–539. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01378.x
- Holt, R.A. (1987). *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold-water disease in salmonid fish. PhD thesis, Oregon State University, Department of Microbiology, Corvallis, USA.
- Högfors, E., Pullinen, K.R., Madetoja, J., & Wiklund, T. (2008). Immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with a low molecular mass fraction isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 31(12): 899–911. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00956.x
- İspir, Ü., Şeker, E., Sağlam, N., & Dörücü, M. (2004). A study of *Flavobacterium psychrophilum* infection in some cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Eastern Anatolia (in Turkish with English Abstract). *Science and Engineering Journal of Firat University*, 16(4): 718-724.
- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C., & Rombout, J.H.W.M. (1997). Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish and Shellfish Immunology*, 7(7): 471-485. doi:10.1006/fsim.1997.0100
- Kondo, M., Kawai, K., Okabe, M., Nakano, N., & Oshima, S.I. (2003). Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55(3): 261–264. doi:10.3354/dao055261
- Korun, J., & Timur, G. (2001). A study on the fry mortality syndrome (FMS) of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (in Turkish with English Abstract). *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 12: 15-30.
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., & Cain, K.D. (2004). Protective immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* following immunization with distinct molecular mass fractions isolated from *Flavobacterium psychrophilum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59(1): 17-26. doi:10.3354/dao059017
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Jones, G.R., Congleton, J.L., Sun, B., & Cain, K.D. (2002). Characterization of serum and mucosal antibody responses and relative percent survival in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following immunization and challenge with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 25(12): 703–713. doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00424.x
- LaFrentz, B.R., LaPatra, S.E., Call, D.R., & Cain, K.D. (2008). Isolation of rifampicin resistant *Flavobacterium psychrophilum* strains and their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*, 26(44): 5582-5589. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.083
- Lavelle, E.C., Jenkins, P.G., & Harris, J.E. (1997). Oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *Vaccine*, 15(10): 1070–1078. doi:10.1016/S0264-410X(97)00013-3
- León-Rodríguez, L., Luzardo-Álvarez, A., Blanco-Méndez, J., Lamas, J., & Leiro, J. (2012). A vaccine based on biodegradable microspheres induces protective immunity against scuticociliatosis without producing side effects in turbot. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(1): 21–27. doi:10.1016/j.fsi.2012.03.028
- Liu, C.H., Yeh, S.P., Kuo, C.M., Cheng, W., & Chou, C.H. (2006). The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: activity and gene transcription. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(4): 442-452. doi:10.1016/j.fsi.2006.02.003
- Liu, P.C., Chen, Y.C., Huang, C.Y., & Lee, K.K. (2000). Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6): 433-437. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00843.x
- Mofidi, N., Aghai-Moghadam, M., & Sarbolouki, M.N. (2000). Mass preparation and characterization of alginate microspheres. *Process Biochemistry*, 35(9): 885-888. doi:10.1016/S0032-9592(99)00149-1
- Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F., & Haesebrouck, F. (2003). *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish, *Journal of Fish Diseases*, 26(10): 563-574. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00488.x
- Obach, K., & Laurencin, F.B. (1991). Vaccination of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* against the visceral form of coldwater disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12(1): 13-15. doi:10.3354/dao012013
- Özer, S., Demirel, M., Us, M., & Yıldırım, S., (2008). Microbial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) hatcheries in Çağlarca, province Mersin-Turkey (in Turkish with English Abstract). *Journal of Fisheries Sciences.com*, 2(3): 261-271. doi:10.3153/jfscom.mug.200713
- Piganelli, J.D., Zhang, J.A., Christensen, J.M., & Kaattari, S.L. (1994). Enteric coated microspheres as an oral method for antigen delivery to salmonids. *Fish and Shellfish Immunology*, 4(3): 179–188. doi:10.1006/fsim.
- Plant, K.P., Lapatra, S.E., & Cain, K.D. (2009). Vaccination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with recombinant and DNA vaccines produced to *Flavobacterium psychrophilum* heat shock proteins 60 and 70. *Journal of Fish Diseases*, 32(6): 521–534. doi:10.1111/j.1365-2761.2009.01008.x
- Polk, A.E., Amsden, B., Scarrat, D.J., Gonzal, A., Okhamafe, A.O., & Goosen, M.F.A. (1994). Oral delivery in aquaculture-controlled-release of proteins from chitosan alginate microcapsules. *Aquacultural Engineering*, 13(4): 311–323. doi:10.1016/0144-8609(94)90018-3
- Rahman, M.H., Kuroda, A., Dijkstra, J.M., Kiryu, I., Nakanishi, T., & Ototake, M. (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish and Shellfish Immunology*, 12(2): 169-179. doi:10.1006/fsim.2001.0362
- Rahman, M.H., Ototake, M., Iida, Y., Yokomizo, Y., & Nakanishi, T. (2000). Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 35(4): 199–203. doi:10.3147/jfsfp.35.199
- Rahman, M.H., Ototake, M., & Nakanishi, T. (2003). Water-soluble adjuvants enhance the protective effect of *Flavobacterium psychrophilum* vaccines in Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 38(4): 171-176. doi:10.3147/jfsfp.38.171
- Reed, L.J., & Muench, H. (1938). A simple methods of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27(3): 493–497.
- Ringo, E., Olsen, R.E., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S., & Song, S.K. (2012). Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 2(1): 1-22. doi:10.4172/2155-9910.1000104
- Romalde, J.L., Luzardo-Álvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E., & Blanco-Mendez, J. (2004). Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, 236(1-4): 119–129. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.02.028
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2): 63-92. doi:10.1016/S0044-8486(98)00436-0
- Schubiger, C.B., Orfe, L.H., Sudheesh, P.S., Cain, K.D., Shah, D.H., & Call, D.R. (2015). Entericidin is required for a probiotic treatment (*Enterobacter* sp. strain C6-6) to protect trout from cold-water disease challenge. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 658-665. doi:10.1128/AEM.02965-14
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., & Frost, P. (2005). Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1): 89-101. doi:10.1586/14760584.4.1.89
- Sudheesh, P.S., Zimmerman, J.K., & Cain, K.D. (2016). Dietary effects on immunity, stress, and efficacy of two live attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine formulations. *Aquaculture*, 454: 35-43. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.12.004
- Tian, J.Y., Sun, X.Q., & Chen, X.G. (2008). Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(5): 592-599. doi:10.1016/j.fsi.2008.01.009

- Vandenberg, G.W. (2004). Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Animal Health Research Reviews*, 5(2): 301–304. doi: [10.1079/AHR200488](https://doi.org/10.1079/AHR200488)
- Yeh, S.P., Chang, C.A., Chang, C.Y., Liu, C.H., & Cheng, W. (2008). Dietary sodium alginate administration affects fingerling growth and resistance to *Streptococcus* sp. and iridovirus, and juvenile non-specific immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1-2): 19-27. doi: [10.1016/j.fsi.2007.11.011](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.11.011)
- Yıldırım, S., & Özer, S. (2010). The existence of *Flavobacterium* spp. at rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) hatcheries in Caglarca village, Mersin-Turkey (in Turkish with English Abstract). *Journal of Fisheries Sciences.com*, 4(1): 112-122. doi: [10.3153/jfscm.201001](https://doi.org/10.3153/jfscm.201001)