

MERSİN İLİ ÇAĞLARCA KÖYÜNDEKİ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) KULUÇKAHANELERİNİN MİKROBİYAL FLORASI

Selmin Özer*, Meltem Demirel, Murat Us, Sevgi Yıldırım

Mersin Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Mersin

Özet:

15.12.2006 ve 25.04.2007 tarihleri arasında Mersin İli Çağlarca köyünde bulunan iki Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) işletmesinden su örnekleri, sperma, ovaryum sıvısı, yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru ve yemlenen yavruardan örnekler alındı. Örnekler toplam aerobik bakteri sayısı, Gram negatif bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu yönünden klasik yöntemlerle incelendi. Gram negatif bakterilerin identifikasyonu ID32GN kiti (BioMerieux) ile yapıldı. Su kaynaklarının sıcaklık, çözülmüş oksijen, oksijen doygunluğu ve pH değerleri ölçüldü. I. İşletmeden 36 su örneği ve 124 balık örneği, II. işletmeden 41 su örneği ve 146 adet balık örneği laboratuvara getirildi. İşletmelerde kullanılan suyun fizikokimyasal kriterler ve toplam aerobik bakteri sayısı yönünden Gökkuşığı alabalığı yetiştiriciliği için optimum değerler taşıdığı görüldü. I. İşletme örneklerinin ortalama toplam aerobik bakteri sayısı spermada 5.5×10^2 KOB ml⁻¹ ovaryum sıvısında 1.6×10^3 KOB ml⁻¹, yumurtada 7.0×10 KOB g⁻¹, dezenfekte edilmiş yumurtada 2.5, döllenmiş yumurtada 8.5×10 , dezenfekte edilmiş döllenmiş yumurtada 0, gözlenmiş yumurtada 4.3×10 , dezenfekte edilmiş gözlenmiş yumurtada 5.0, keseli yavruada 3.8×10^2 , dezenfekte edilmiş keseli yavruada 2.5×10 ve yemlenen yavruada 2.7×10^5 KOB g⁻¹; II. işletmede ise yumurtalarda ve dezenfekte edilmiş yumurtalarda sıfırken, diğerlerinde sırasıyla 2.4×10 , 1.3, 2.8×10 , 1.1×10^2 , 1.2×10^2 , 6.7×10 , 3.7×10^2 , 1.6×10 ve 4.2×10^5 KOB g⁻¹ olarak saptandı. İşletmelerde izole edilen Gram negatif bakteriler *Aeromonas hydrophila / caviae*, *Enterobacter amnigenus*, *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens* 1 ve 2, *P. aeruginosa*, *P. oruzihabitans*, *P. putida*, *Proteus penneri*, *Proteus spp.*, *Rahnella aquatilis*, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Yersinia ruckeri*, *Achromobacter denitrificans*, *Brevundimonas diminuta*, *Comamonas testosteroni*, *Kluvyera cryocrescens*, *Moraxella lacunata*, *Oligella spp.*, *Pantoea spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Sphingomonas paucimobilis* olarak identifiye edildi.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), Kuluçkahane, Toplam aerobik bakteri sayısı, Gram negatif bakteri

* Correspondence to:

Dr. Selmin ÖZER, Mersin Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü, Yenişehir Kampüsü, 33169 Mersin-TÜRKİYE

Tel: (+90 324) 341 28 17/2107 Fax: (+90 324) 341 30 25

E-mail: selmin.oezer@gmail.com

Abstract: Microbial flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) hatcheries in Çağlarca, province Mersin-Turkey

Samples were taken from water, sperma, ovarium fluid, eggs, fertilized eggs, eyed eggs, sac fries and fed fries from two rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farms in Çağlarca, Mersin between 15.12.2006 and 25.04.2007. They were examined for total aerobic bacteria count, isolation and identification of Gram negative bacteria with classical methods. Identification of Gram negative bacteria were made with ID32GN kit (BioMerieux). Water quality parameters such as temperature, dissolved oxygen, oxygen saturation and pH were measured. 36 water samples and 124 fish samples from the first farm and 41 water samples and 146 fish samples from the second farm were analysed. It was found that, water used in farms possess optimum levels of physicochemical criteria and total aerobic bacteria count for rainbow trout breeding. The average total aerobic bacteria count of first farm's samples was found as 5.5×10^2 cfu ml⁻¹ at sperma, 1.6×10^3 cfu mL⁻¹ at ovarium fluid, 7.0×10 cfu g⁻¹ at eggs, 2.5 at disinfected eggs, 8.5×10 at fertilized eggs, 0 at disinfected fertilized eggs, 4.3×10 at eyed eggs, 5.0 at disinfected eyed eggs, 3.8×10^2 at sac fries, 2.5×10 at disinfected sac fries and 2.7×10^5 cfu g⁻¹ at fed fries; whereas at the second farm the average was 0 at eggs and disinfected eggs, and at others 2.4×10 , 1.3, 2.8×10 , 1.1×10^2 , 1.2×10^2 , 6.7×10 , 3.7×10^2 , 1.6×10 ve 4.2×10^5 cfu g⁻¹, respectively. The Gram negatif bacteria isolated at farms were identified as *Aeromonas hydrophila / caviae*, *Enterobacter amnigenus*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens* 1 and 2, *P. aeruginosa*, *P. oruzihabitans*, *P. putida*, *Proteus penneri*, *Proteus spp.*, *Rahnella aquatilis*, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Yersinia ruckeri*, *Achromobacter denitrificans*, *Brevundimonas diminuta*, *Comamonas testosteroni*, *Kluyvera cryocrescens*, *Moraxella lacunata*, *Oligella spp.*, *Pantoea spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Sphingomonas paucimobilis*.

Keywords: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), hatchery, total aerobic bacteria count, Gram negative bacteria

Giriş

Balık yetiştiriciliğinde kayıplar en çok yumurta ve yavru aşamalarında, özellikle de bağışıklık sistemleri henüz gelişmemiş olan yavruların yem almaya başladığı dönemde görülmektedir. Suda bulunan mikroorganizmalar balık yumurta, larva ve yavrularının ilk mikroflorasını oluşturmaktadır. Birçok bakteriyel, mantar, viral ve paraziter etkenin balıklarda enfeksiyonlara yol açtığı bilinmektedir.

Bazı araştırmalarla farklı su kaynaklarının toplam bakteri sayısı ve Gram negatif bakteri içerikleri ortaya konulmuştur (Derlet ve Carlson, 2004, Düzel, 1999, Schmidt ve ark., 2000, Tekinşen, 1976). Balıkların dış yüzeyinde 10^2 - 10^7 /cm², solungaç dokusunda 10^3 - 10^6 g⁻¹ ve bağırsaklarında 10^3 - 10^8 g⁻¹ canlı mikroorganizma saptandığı bildirilmiştir (Gökten, 1990, İnal, 1992). Fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik kriterler içermekte olan bazı standartlar (Anonim, 1998, Anonim, 2004) suyun insan ve hayvan sağlığı yönünden değerlendirmemize katkıda bulunmaktadır.

Yapılmış olan araştırmalar su ve balık mikroflorasının paralellik taşıdığını göstermekte-

dir (Allen ve ark., 1983, Gonzalez ve ark., 1999, Gonzalez ve ark., 2001, Hatha ve ark., 2005, Kim ve ark., 2006, Skrodenyte-Arbaciauskiene ve ark., 2006). Balıkların hastalanmalarında rol oynayan mikroorganizmaların içinde buldukları suyun mikroflorasında ve balıkların bağırsak mikroflorasında yer almaktadır. Neredeyse tamamının fırsatçı patojen özellik taşıdığı bilinen balık patojenleri kötü bakım ve çevre koşullarında balıkların hastalanmalarına yol açmaktadırlar (Austin ve Austin, 1993, Inglis ve ark., 1993). Bakteriyel balık patojenlerinin çoğunun Gram negatif özellikte olduğu bilinmektedir (Austin ve Austin, 1993). Gram negatif bazı bakterilerin balıklarda meydana getirdiği hastalıklar birçok araştırmaya konu teşkil etmiştir (Cipriano, 2001, Daskalov ve ark., 1998, Ogara ve ark., 1998, Padilla ve ark., 2005, Popovic ve ark., 2000, Sakai ve ark., 1989, Topic ve ark., 2000).

Gökkuşluğu alabalığı kuluçkahanelerinde yapılan bilimsel çalışmalarla bazı fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik veriler sunulmuştur (Barker ve

ark., 1989, Barnes ve ark., 2000, Kapetanović ve ark., 2005).

Ülkemizde Gökkuşuğu alabalığı kuluçkahanelerinde görülen yavru ölümlerinin nedeni olarak Sapanca'da *Pseudomonas fluorescens* (Akaylı ve Timur, 2004) ve Aydın yöresinde *Vibrio parahaemolyticus* (Aydın, 2000) bildirilmiştir.

Mersin ilinde 40'tan fazla irili ufaklı Gökkuşuğu alabalığı işletmesi bulunmaktadır (TKB Mersin Tarım İl Müdürlüğü). Bazı işletmelerden edinilen bilgiye göre, yavrularda özellikle yem almaya başladıktan sonra yoğun ölümler meydana gelmektedir. Bu araştırma, anaçlardan başlayarak yavrular 3 aylık oluncaya kadar geçen tüm aşamalarda ve su örneklerinde, toplam bakteri yoğunluğunu ve Gram negatif bakteri türlerini ortaya koyarak, bu süreçlerde meydana gelen yumurta ve yavru ölümlerinin nedenlerini saptamak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metod

Su, yumurta ve yavru örnekleri

15.12.2006-25.04.2007 arasında Mersin ili Çağlarca Köyü'nde faaliyet gösteren iki Gökkuşuğu alabalık işletmesine gidilerek I. işletmeden 12, II. işletmeden 11 kez balık ve su örnekleri alındı. Soğuk zincire uyularak fakültemiz laboratuvarına getirilen örnekler aynı gün incelemeye alındı. Kuluçkahanelere giren ve çıkan ve üretimde kullanılan suyun pH, sıcaklık ve çözünmüş oksijen miktarları ölçülerek kaydedildi. Bakteriyojik inceleme için işletmelere giren su, anaç havuzu suyu, kuluçka dolabına giren su, yavru havuzu suyu ve işletmeden çıkan sudan steril şişelere birer litre alındı. I. işletmeden 36 (Tablo 1), II. işletmeden 41 (Tablo 2) örnek olmak üzere toplam 77 adet su örneği incelendi.

Mikrobiyolojik yoklama için sperma, ovaryum sıvısı, yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru ve yem almaya başlayan yavrulardan örnekler (balık örnekleri) steril cam kaplara hijyenik kurallara uygun olarak alındı. Sperma, ovaryum sıvısı ve yumurtalar anaçların sağımı esnasında alındı. Yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta ve yavrulardan en az 20'şer adet alındı, laboratuvara canlı olarak getirildi. I. işletmeden 124 ve II. işletmeden 146 olmak üzere toplam 270 örneğin incelendi (Tablo 3).

Su örneklerinin sıcaklığı, çözünmüş oksijen ve pH ölçümleri

Su sıcaklığı ve çözünmüş oksijen Oxyguard Handy Gamma cihazı ile, pH pH- indikatör kağıdı (Merck) ile ölçüldü.

Yumurta ve keseli yavru örneklerinin dezenfeksiyonu

Yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta ve keseli yavru örneklerinin yarısı dezenfekte edilmeden işleme alınırken diğer yarısı (her birinden 10 adet) 400 ppm povidin/iodin (%10 Polivinilpirolidon içeren Batticon) solüsyonunun 15 dakika süreyle uygulanması ile dezenfekte edildi. Dezenfekte edilen örnekler en az 3 kez steril distile su ile yıkandı (Brown ve ark., 1997). Homojenatlar steril enjektör yardımıyla ya da havanda ezilerek hazırlandı.

Bakteriyolojik muayeneler

Tüm mikrobiyolojik çalışmalar hijyenik kurallara uyularak gerçekleştirildi. İzolasyon amacıyla ekim örnekleri 20°C'de 48 saat inkübe edildi (Austin ve Austin, 1993, Gürgün ve Halkman, 1990). Yumurta ve keseli yavru örneklerine kadarki aşamalarda 2 örnekten bir grup oluşturularak çalışıldı. Yemlenen yavru örnekleri iç organları ayırt edilecek büyüklüğe geldiğinde, en az 10 adet yavru balığın karaciğeri ayrılarak ve iç organları çıkarılarak karaciğer ve gövde olarak çalışıldı.

Toplam aerobik bakteri sayımı (Total Jerm)

Toplam aerobik bakteri sayımı amacıyla Plate Count Agar (Merck) kullanıldı ve ekimler iki paralelli ve 'çift kat dökme kültürel sayım yöntemine' göre uygulandı. Su örneklerinden direkt olarak 1'er ml alındı. Yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru örneklerinden 10'ar adet homojenize edilerek 0,3 ml'si ekimde kullanıldı. Aynı örneklerin 10'ar tanesine de dezenfeksiyon işlemi yapıldıktan sonra aynı işlemlere tabi tutuldu. Yem almaya başlayan yavrulardan 10'ar adedi bir havanda homojenize edilerek önceleri 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ ya da 10⁻⁵'lik dilüsyonlarından 1'er ml kullanıldı. İnkübasyonun ardından sonuçlar 'Koloni Oluşturan Birim (KOB) g⁻¹ ya da ml⁻¹ olarak belirtildi (Gürgün ve Halkman, 1990).

Gram negatif bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu

Dezenfekte edilmeyen ve dezenfekte edilen yumurta ve keseli yavru örneklerinden hazırlanan homojenatlardan 0,3 ml ve yem alan yavrulardan hazırlanan 10^{-1} 'luk dilüsyonlardan 0,5 ml McConkey Agar' a (MCA, Merck) steril öze ya da svap aracılığıyla yayıldı.

Gram negatif bakterilerin MCA üzerindeki üremeleri var-yok olarak değerlendirildi. Üremenin olduğu örnekler için farklı koloniler seçilerek MCA'ya subkültürleri yapıldı. Gram boyama, katalaz testi ve sitokrom oksidaz testlerinin ardından Gram negatif, katalaz pozitif kültürler oksidasyon-fermentasyon (O/F), hareket, metil kırmızısı, Voges Proskauer, indol, Simmon's citrat kullanımı, glikoz, laktoz, sakkaroz'dan asit oluşumu, glikozdan gaz oluşumu, hidrojen sülfür varlığı, lizin dekarboksilaz varlığı testleri uygun besiyerleri kullanılarak yapıldı (Austin ve Austin, 1993, Cowan, 1975, Frerichs, 1993, Plumb ve

Bowser, 1983). 20°C'de 1-10 günlük inkübasyon neticesinde elde edilen biyokimyasal test sonuçları "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (Holt ve ark., 2000) kitabına göre değerlendirildi. Bu izolatların identifikasyonları ID32GN ticari kitinin tarifine uygun olarak kullanılması ve sonuçlarının 'Mini-API otomatize bakteri tanımlama sisteminde' okutulması ile yapıldı.

Bulgular ve Tartışma

İşletmelerde kullanılan suyunun çözünmüş oksijen, su sıcaklığı, pH bulguları

Her iki işletme de aynı su kaynağından yararlanmakta, ancak birbirileriyle su bağlantısı bulunmamaktadır. İşletmelere giren su, anaç havuz suyu, kuluçka dolabına giren su, yavru havuzu suyu ve işletmelerden çıkan suyun sıcaklıkları, pH değerleri, çözünmüş oksijen miktarı, oksijen doygunluk oranları ve ortalama toplam aerobik bakteri sayısı I. işletme için Tablo 1 ve II. işletme için Tablo 2'te yer almaktadır.

Tablo 1. I. İşletme Su Örneklerinde Ortalama Çözünmüş Oksijen, Su Sıcaklığı, pH Bulguları ve total jerm sayısı

Table 1. Mean values of dissolved oxygen, water temperature, pH and total aerobic bacteria count of water samples of farm I

Su Örnekleri	n	Doygunluk (%)	Çözünmüş O ₂ (ppm)	Su sıcaklığı (°C)	pH	Ort. Total Jerm (KOB ml ⁻¹)
Giriş	11	98	10.5	10.7	6.7	8.1x10
Anaç havuzu	2	97	9.9	10.5	7.3	1.9x10 ²
Kuluçka Dolabı	6	96	10.5	10.2	7.0	3.4x10
Yavru havuzu	6	94	10.4	10.4	6.8	1.1 x10 ³
Çıkış	11	89	10.2	10.1	7.0	3.7 x10 ²

n: örnek sayısı

Tablo 2. II. İşletme Su Örneklerinde Ortalama Çözünmüş Oksijen, Su Sıcaklığı, pH Bulguları ve Total Jerm Sayımı

Table 2. Mean values of dissolved oxygen, water temperature, pH and total bacteria count of water samples of farm II

Su Örnekleri	n	Doygunluk (%)	Çözünmüş O ₂ (ppm)	Su sıcaklığı (°C)	pH	Ort. Total Jerm (KOB ml ⁻¹)
Giriş	13	94	10.2	10.4	6.7	2.7 x10 ²
Anaç havuzu	2	85.5	9.7	9.3	6.8	1.1x10 ³
Kuluçka Dolabı	7	100	11.4	10.0	6.6	4.3
Yavru havuzu	6	96	10.9	10.8	6.8	1.8 x10 ³
Çıkış	13	97	10.8	10.2	6.9	2.8 x10 ²

n: örnek sayısı

İşletmelerde kullanılan suyunun toplam bakteri sayıları

I. İşletmede su örneklerinde saptanan ortalama total jerm sayısı işletmeye giren suda 8.1×10^1 , anaç havuzundaki suda 1.9×10^2 , kuluçka dolabında 34, yavru havuzundaki suda 1.1×10^3 ve çıkış suyunda 3.7×10^2 KOB ml^{-1} olarak saptanmıştır (Tablo 1).

II. İşletmeye ait total jerm değerleri ise sırasıyla 2.7×10^2 , 1.1×10^3 , 4,3, 1.8×10^3 ve 2.8×10^2 KOB ml^{-1} olduğu görülmüştür (Tablo 2).

Yumurta ve yavrularda hastalık bulguları

I. İşletmede kuluçka dolabındaki gözlenmiş yumurtalarda mantar olgusuna rastlanmış, mantar nedeniyle yumurtaların %30'dan fazlası telef

olmuştur. II. işletmede yavrular yumurtadan çıkıncaya kadar malaşit yeşilinin düzenli olarak kullanıldığı, bir kez bir kuluçka makinesindeki bir tepside yumurtaların mantarlaştığı tespit edilmiş. II. İşletmede Nisan başında, 30-40 gündür yem alan yavrularda başlayan ölümler 2-3 haftada %50'den fazla kayba neden olmuştur. Hastalık belirtisi olarak renkte kararma (Şekil 1), sırt yüzgecinde erozyon (Şekil 1, 2), gözlerde tek ya da çift taraflı eksoftalmus (Şekil 3) görülen balıkların otopsi bulgularında solungaçta ve karaciğerde anemi, karaciğerde yer yer kanamalar ve dalakta büyüme saptanmıştır (Şekil 4). I. İşletmede yavrularda herhangi bir hastalık görülmemiş, ancak yemleme hatası nedeniyle yavru ölümleri meydana gelmiştir.



Şekil 1. Renkte kararma, sırt yüzgecinde erozyon
Figure 1. Darkening of the skin, erosion of dorsal fin



Şekil 2. Sırt yüzgecinde erozyon
Figure 2. Erosion of dorsal fin



Şekil 3. Çift taraflı eksoftalmus ve renkte kararma
Figure 3. Bilateral exophthalmia and darkening of the skin



Şekil 4. Dalakta büyüme, solungaç ve karaciğerde anemi
Figure 4. Swelling of the spleen, anemia on gill and liver

Yumurta, sperma, ovaryum sıvısı ve yavrularda toplam aerobik bakteri sayıları

I. İşletmede incelenen örneklerin ortalama total jerm sayıları yumurtalarda 7.0×10 KOB g^{-1} , dezenfekte edilmiş yumurtalarda 2.5 KOB g^{-1} , döllenmiş yumurtalarda 8.5×10 KOB g^{-1} , dezenfekte edilmiş döllenmiş yumurtalarda 0 KOB g^{-1} , ovaryum sıvısında 1.6×10^3 KOB ml^{-1} , spermalarda 5.5×10^2 KOB ml^{-1} , gözlenmiş yumurtada 4.3×10 KOB g^{-1} ve dezenfekte edilmiş gözlenmiş yumurtada 5.0 KOB g^{-1} olarak saptanmıştır. Keseli yavru, dezenfekte edilmiş keseli yavru ve yemlenen yavrularda ortalama total jerm sayıları sırasıyla 3.8×10^2 , 2.5×10 ve 2.7×10^5 KOB g^{-1} olarak tespit edilmiştir. II. işletmenin ortalama total jerm sayıları yumurtalarda ve dezenfekte edilmiş yumurtalarda sıfırken, ovaryum sıvısında 2.8×10 , spermalarda 1.1×10^2 KOB ml^{-1} , döllenmiş yumurtalarda 2.4×10 , dezenfekte edilmiş döllenmiş yumurtalarda 1.3 , gözlenmiş yumurtada 1.2×10^2 , dezenfekte edilmiş gözlenmiş yumurtada 6.7×10 , keseli yavru 3.7×10^2 , dezenfekte edilmiş keseli yavru 1.6×10 ve yemlenen yavrularda 4.2×10^5 KOB g^{-1} olarak bulunmuştur (Tablo 3).

Gram negatif bakteri bulguları

I. İşletmede kontrol edilmiş olan örneklerde izole edilmiş olan Gram negatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve fermentatif özellikteki bakteriler *Aeromonas hydrophila / caviae*, *Enterobacter amnigenus*, *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens-1*, *P. fluorescens-2*, *P. aeruginosa-1*, *P. oruzihabitans*, *Proteus penneri*, *Proteus spp.*, *Rahnella aquatilis*, *Brevundimonas diminuta*, *Moraxella lacunata*, *Oligella spp.*, *Achromobacter denitrificans*, *Pantoea spp.*, *Comamonas testosteroni* ve *Kluyvera cryocrescens* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4).

II. İşletmede ise *A. hydrophila/caviae*, *Brevundimonas vesicularis*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *P. fluorescens-1*, *P. fluorescens-2*, *P. aeruginosa-1*, *P. aeruginosa-2*, *P. putida*, *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Moraxella lacunata*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Yersinia ruckeri* (Tablo 5).

Tablo 3. Yumurta-Yavru Örneklerinin Ortalama Toplam Aerobik Bakteri Sayısı
Table 3. Mean total aerobic bacteria count of egg-fry samples

Örnek Adı	n	I. işletme		II. işletme	
		Ort. Total Jerm (KOB g^{-1})	n	Ort. Total Jerm (KOB g^{-1})	n
Yumurta	124	7.0×10	146	0	
Dezenfekte Edilmiş Yumurta	12	2.5	12	0	
Döllenmiş Yumurta	12	8.5×10	12	2.4×10	
Döllenmiş Dezenfekte Edilmiş Yumurta	12	0	12	1.3	
Ovaryum Sıvısı	12	1.6×10^3	12	2.8×10	
Sperma	12	5.5×10^2	12	1.1×10^2	
Gözlenmiş Yumurta	15 ^a	4.3×10	19 ^b	1.2×10^2	
Dezenfekte Edilmiş Gözlenmiş Yumurta	12	5.0	18	6.7×10	
Keseli Yavru	8	3.8×10^2	10	3.7×10^2	
Dezenfekte Edilmiş Keseli Yavru	8	2.5×10	10	1.6×10	
Yemlenen Yavru	9 ^c	2.7×10^5	17 ^d	4.2×10^5	
	6 ^k	6.1×10^3	9 ^k	2.0×10^4	

^a 3 örnek mantarlaşmış olup total jerm sayımı yapılmamıştır.

^b 1 örnek mantarlaşmış olup total jerm sayımı yapılmamıştır.

^c ilk 3 örnek tüm gövde, 6 örnek iç organları çıkarılarak işleme alınmıştır.

^d ilk 8 örnek tüm gövde, 9 örnek iç organları çıkarılarak işleme alınmıştır.

^k karaciğer n: örnek sayısı

Tablo 4. I. İşletmede Görülen Gram Negatif Bakteri Türleri

Table 4. Gram negative bacteria species observed on farm I

Örnek Adı	Bakteri Adı
Ovaryum Sıvısı	<i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Pseudomonas oruzihabitans</i> , <i>Moraxella lacunata</i>
Sperma	<i>P. putida</i> , <i>Oligella spp.</i> ,
Yumurta	Üreme görülmedi
Dezenfekte Edilmiş Yumurta	Üreme görülmedi
Döllenmiş Yumurta	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 1, <i>P. aeruginosa</i> 1
Döllenmiş Dezenfekte Edilmiş Yumurta	Üreme görülmedi
Gözlenmiş Yumurta	<i>Aeromonas hydrophila / caviae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>P. aeruginosa</i> 1, <i>P. oruzihabitans</i>
Dezenfekte Edilmiş Gözlenmiş Yumurta	<i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>P. oruzihabitans</i>
Keseli Yavru	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i> , <i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>P. aeruginosa</i> 2
Dezenfekte Edilmiş Keseli Yavru	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. fluorescens</i> 2, <i>Achromobacter denitrificans</i>
Yemlenen Yavru	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>P. aeruginosa</i> 1
Giriş Suyu	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Proteus penneri</i> , <i>P. fluorescens</i> 1, <i>P. aeruginosa</i> 1, <i>Pantoea spp.</i> , <i>Comamonas testosteroni</i>
Anaç Havuzu Suyu	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>Rahnella aquatilis</i>
Kuluçka Dolabı Suyu	Üreme görülmedi
Yavru Havuzu Suyu	<i>Kluyvera cryocrescens</i> , <i>Hafnia alvei</i>
Çıkış Suyu	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. oruzihabitans</i> , <i>P. fluorescens</i> 2, <i>Proteus penneri</i> , <i>Pantoea spp.</i> , <i>R. aquatilis</i> , <i>Moraxella lacunata</i>

Tablo 5. II. İşletmede Görülen Gram Negatif Bakteri Türleri

Table 5. Gram negative bacteria species observed on farm II

Örnek Adı	Bakteri Adı
Ovaryum Sıvısı	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> , <i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>E.coli</i>
Sperma	<i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>P. aeruginosa</i> 2
Yumurta	Üreme görülmedi
Dezenfekte Edilmiş Yumurta	<i>Moraxella lacunata</i>
Döllenmiş Yumurta	<i>K. pneumoniae pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> 2, <i>P. fluorescens</i> 2
Döllenmiş Dezenfekte Edilmiş Yumurta	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. fluorescens</i> 1
Gözlenmiş Yumurta	<i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>P. putida</i> <i>P. aeruginosa</i> 2, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Dezenfekte Edilmiş Gözlenmiş Yumurta	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. fluorescens</i> 1, <i>Hafnia alvei</i>
Keseli Yavru	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. aeruginosa</i> 1
Dezenfekte Edilmiş Keseli Yavru	<i>A. hydrophila / caviae</i>
Yemlenen Yavru	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. fluorescens</i> 2, <i>P. putida</i> , <i>Brevundimonas vesicularis</i>
Giriş Suyu	<i>P. fluorescens</i> 2, <i>P. aeruginosa</i> 2
Anaç Havuzu Suyu	<i>P. fluorescens</i> 2, <i>P. aeruginosa</i> 2
Kuluçka Dolabı Suyu	<i>P. fluorescens</i> 2
Yavru Havuzu Suyu	<i>P. fluorescens</i> 1
Çıkış Suyu	<i>A. hydrophila / caviae</i> , <i>P. fluorescens</i> 1 ve 2, <i>Yersinia ruckeri</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>P. putida</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Su kaynaklarının fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik kalitesi suyu kullanan canlılar için büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle gerek hayvan ve gerekse de insan sağlığına yönelik genelgelerle bazı kriterler geliştirilmiştir (Anonim, 1998, 2004). Avrupa Birliği İçme Suyu Yönergesi'ne göre çözünmüş oksijen miktarının en az 5 mg/l, pH 6.5-9.5 (Anonim, 1998) ve ülkemizde Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği'nde yer alan "kita içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterleri"ne göre I. Sınıf sular için su sıcaklığı 25°C, pH 6.5-8.5, çözünmüş oksijen miktarı 8 mg/l ve oksijen doygunluğu % 90 (Anonim, 2004) olması gerektiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada iki işletmenin su kaynaklarından elde edilen ortalama oksijen doygunluğu, çözünmüş oksijen, su sıcaklığı ve pH değerlerinin (Tablo 1, 2) bu iki standarda uygun olduğunu, aynı zamanda içme suyu olarak

kullanılan kuluçka dolabı suyunun her iki işletmede de 1. sınıf su kapsamına girdiğini ve Avrupa Birliği İçme Suyu Yönergesine göre içme suyu olarak kullanılabilirliği görülmektedir. I. işletmenin çıkış suyunda ve II. işletmenin anaç havuzu suyundaki oksijen doygunluğunun düşük olması ise normal karşılanabilmektedir. Kapetanović ve ark. (2005) inceledikleri Gökkuşuğu alabalığı kuluçkahanelerindeki fizikokimyasal su kalitesi parametrelerinin optimum değerlerde bulduklarını belirtmişlerdir.

Toplam aerobik bakteri sayımları o maddenin bakteri yükünü ortaya koyarak hijyenik yapıyla ilgili genel bir fikir edinmek amacıyla yapılmaktadır (Gökten, 1990, İnal, 1992). Avrupa Birliği İçme Suyu Yönergesi 22°C'de üreyen toplam bakteri yükünün en fazla 100/ml olabileceğini belirtmektedir (Anonim 1998). Tekinşen (1976) kontamine olmamış doğal suların 1 ml'sinde 100 kadar total jerm

bulunabilirken, kontamine olmuş sularda bu oranın 10^4 'leri aşabildiğini bildirmiştir.

Bulgularımız (Tablo 1, 2) sırasıyla I. işletmede 36 ve 34, II. işletmede 0.3 ve 4.3 KOB ml^{-1} olan giriş ve kuluçka dolabı suyundaki ortalama toplam aerobik bakteri sayılarına bakılarak bu suların Avrupa Birliği İçme Suyu Yönergesi'ne (Anonim 1998) ve Tekinşen (1976)'in bildirdiği kriterlere göre kontamine olmamış ve içilebilir olduğunu göstermektedir. Anaç havuzu, yavru havuzu ve çıkış suyunda görülen artışların yetiştiricilik koşullarında normal olduğu düşünülmektedir.

Gökkuşığı alabalığı yumurtalarının kuluçka dolabı içindeki gelişimleri süresince su örneklerinin bakteriyel populasyonlarını inceleyen Barnes ve ark. (2000), bakteri sayısındaki ilk belirgin artışın gözlenmiş yumurta evresinde, ikinci yükselmenin yumurtaların açılması ile başladığını ve 10g olana kadar sürdüğünü ve son yükselmenin yavruların inkübatörden çıkartılmadan önceki aşamasında görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu proje çerçevesinde elde edilen total jerm bulguları incelendiğinde (Tablo 1, 2), I. işletmede kuluçka dolabı suyunda ilk 2 hafta yağmur sebebiyle suda varolan bulanıklığın etkisi görülmekte, diğer haftalarda ise total jerm saptanamamış, ilk belirgin artış yem alan yavruların incelenmesi ile son 2 haftada ortaya çıkmış (Tablo 1), II. işletmede ise belirgin artış yine yavruların yem alması ile birlikte başladığı anlaşılmaktadır (Tablo 2).

Her iki işletmeden alınan ovaryum sıvısı, sperma, yumurta, döllenmiş yumurta, gözlenmiş yumurta, keseli yavru ve yem alan yavrulardan alınan örneklerin ve dezenfekte edilerek incelenen toplam bakteri yoğunluklarına bakıldığında (Tablo 3), dezenfekte edilen örneklerin bakteri miktarlarının düştüğü, ilk belirgin artışın keseli yavrularda meydana geldiği, en yüksek bakteri yoğunluğunun ise yem alan yavrularda olduğu görülmektedir. Sperma ve ovaryum sıvısı örneklerinin bakteri yoğunluklarının yumurta-keseli yavru dönemlerindeki örneklerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Yem alan yavrularda görülen artış, yavruların bağırsak florasının oluştuğunu göstermektedir. Sağım esnasında dışkı bulaşması bunun en büyük nedeni olarak düşünülmektedir. Barker ve ark. (1989) Gökkuşığı alabalığı ve dere alasının yumurtalarını inkübasyon süresince incelemişler, yumurta yüzeylerinde

yaklaşık 500 KOB/ mm^2 bakteri bulmuşlardır. Bu bulgu bizim yumurtalardaki bulgularımızla uyum göstermemektedir.

Su kaynaklarının bakteriyel florası üzerine yapılmış olan araştırmalar Gram negatif bakterilerden *Achromobacter* spp., motil Aeromonaslar, *Aeromonas hydrophila*, *Cedecea lapagei*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Flavobacterium* spp., *Flavobacterium psychrophilum*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp., *Rahnella aquatilis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Serratia plymuthica*, *S. odorifera*, *S. fonticola*, *Yersinia intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. ruckeri* ve *Yersinia ruckeri* izole edilmiş olduğunu göstermektedir (Allen ve ark., 1983, Derlet ve Carlson 2004, Düzel, 1999, Schmidt ve ark., 2000, Kapetanović ve ark., 2005).

Çalışmamız sonucunda su kaynaklarında I. işletmede *A. hydrophila / caviae*, *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *Hafnia alvei*, *Kluyvera cryocrescens*, *Proteus* spp., *Proteus penneri*, *Pseudomonas fluorescens* 1 ve 2, *P. aeruginosa* 1, *P. oruzihibitans*, *Pantoea* spp., *Comamonas testosteroni* ve *Moraxella lacunata* (Tablo 4), II. işletmede *A. hydrophila / caviae*, *P. fluorescens* 1 ve 2, *P. aeruginosa* 2, *P. putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingomonas paucimobilis* ve *Yersinia ruckeri* izole edilmiştir. Bulgularımız diğer araştırmacılarınki ile paralellik göstermektedir (Tablo 5).

Gökkuşığı alabalığı kuluçkahanelerinde yavruların bakteri florasına bakılmış, kuluçka dolabındaki yavrularda saptanan Gram negatif bakterilerin daha çok *Flavobacterium*, *Acinetobacter* ve *Yersinia* türlerini ihtiva ederken, havuzlarda *Aeromonas* ve *Pseudomonas* en çok rastlanan türler olmuştur (Kapetanović ve ark., 2005). Barker ve ark. (1989) de yumurtalarda en çok *Pseudomonas* spp. ve *Aeromonas hydrophila* izole etiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda I. işletmeden alınan yumurta örneklerinde *Aeromonas hydrophila / caviae*, *Enterobacter amnigenus*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas fluorescens* 1, *P. fluorescens* 2, *P. aeruginosa* 1, *P. oruzihibitans*, *P. putida*, *Moraxella lacunata*, *Oligella* spp., *Achromobacter denitrificans* ve *Brevundimonas diminuta* (Tablo 4), II. İşletmede *A. hydrophila / caviae*, *Escherichia coli*,

Hafnia alvei, *K. pneumoniae pneumoniae*, *P. fluorescens* 1 ve 2, *P. aeruginosa* 2, *P. putida*, *Brevundimonas vesicularis*, *Moraxella lacunata* ve *Stenotrophomonas maltophilia* (Tablo 5) saptanmıştır. Her iki işletmede de kuluçkahanlerdeki tüm aşamalarda en çok *Pseudomonas* ve *Aeromonas*lar izole edilmiştir. Elde edilen bu bulgular diğer araştırmacıların bildirdikleri ile uyum halindedir.

Bu araştırmanın Gram negatif bakteri bulgularına bakıldığında su kaynakları ve yumurta-yavru örneklerinin benzer mikroflorayı taşıdıkları görülmektedir. Araştırma bulgularımız bu konuda yapılmış olan araştırmalarla aynı sonucu göstermektedir (Allen ve ark., 1983, Garcia-Lopez ve ark., 1999, Gonzalez ve ark., 2001, Hatha ve ark., 2005, Kim ve ark., 2006, Skrodenyte-Arbaciauskiene ve ark., 2006). Su, yumurta ve yavrularda saptanan ve çoğu fırsatçı patojen olan bu bakterilerin, herhangi bir stres durumunda önemli kayıplara neden olabileceğini göstermektedir. Su kaynaklarında ve yumurta-yavru gökkuşağı alabalıklarında saptanan bu bakterilerin bazılarının meydana getirdiği enfeksiyonlar bildirilmiştir (Akaylı ve Timur, 2004, Austin ve Austin, 1993, Cipriano, 2001, Daskalov ve ark., 1998, Ogara ve ark., 1998, Padilla ve ark., 2005, Popovic ve ark., 2000, Sakai ve ark., 1989).

II. İşletmede yem alan yavrularda dış bakıda renkte kararma, sırt yüzgecinde erozyon, gözlerde tek ya da çift taraflı eksoftalmus; iç bakıda solungaçta ve karaciğerde anemi, karaciğerde yer yer kanamalar ve dalakta büyüme belirtileri ile seyreden hastalık %50'den ölüme neden olmuştur. Hastalık, bu görüntüsüyle Gökkuşağı yavru alabalığı sendromunu akla getirmektedir (Austin ve Austin, 1993, Brown ve ark., 1997). Ancak kötü bakım ve besleme koşullarında, suda ve yumurta-yavrularda izole edilmiş olan bu Gram negatif bakterilerin de önemli kayıplara yol açabileceği düşünülmektedir.

Sonuç

Mersin ilinde yavru gökkuşağı alabalıklarında görülen ölümlerin önüne geçilmesi ve verimin artırılması için su kaynaklarında saptanan bakteri ve mantarlar dikkate alınarak, balıklarda iyi bakım ve besleme koşullarına dikkat edilmesi, anaçların sağlımları esnasında yumurta ve spermaya gaita bulaşmasının önüne geçilmesi, ölü yumurtaların sağlamlardan ayrılması ve Gökkuşağı alabalığı yetiştiricilerinin balık yetiştiriciliği konusunda eğitilmesi önerilmektedir.

Kaynaklar

- Akaylı, T., Timur, G., (2004). Yavru alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) pseudomonad septisemisi üzerinde bir çalışma, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **30**(1): 121-131.
- Allen, D.A., Austin, B., Colwell, R.R., (1983). Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery, *Journal of General Microbiology*, **12** (9): 2043-2062.
- Anonim a., (1998). On the quality of water intended for human consumption, Council Directive 98/83/EC, Official Journal of the European Communities.
- Anonim b., (2004). Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Resmi Gazete: 31.12.2004, Sayı: 25687.
- Austin, B., Austin, D.A., (1993). Bacterial Fish Pathogens, Ellis Horwood Ltd. Chichester, 384 pp.
- Aydın, S., (2000). Investigation of high mortalities in eyed eggs and fry of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and Brown trout (*Salmo trutta*), *Turkish Journal of Marine Sciences*, **6**: 245-254.
- Barker, G.A.S., Smith, N., Bromage, N.R., (1989). The bacterial flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L., eggs and its relationship to developmental success, *Journal of Fish Diseases*, **12**(4): 281-293.
- Barnes, M.E., Gabel, A.C., Cordes, R.J., (2000). Bacterial populations during rainbow trout egg culture in vertical-flow tray incubators, *North American Journal of Aquaculture*, **62**: 48-53.
- Brown L.L., Cox, W.T., Levine, R.P., (1997). Evidence that the causal agent of Bacterial Coldwater Disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs, *Diseases of Aquatic Organisms*, **29**: 213-218.

- Cipriano, R.C., (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. Fish disease leaflet 68. <http://www.lsc.usgs.gov/FHB/Leaflets/FHB68.Pdf> (03.05.2007).
- Cowan, S.T., (1974). Manual for the Identification of Medical Bacteria. University Printing House, Cambridge, 238 pp.
- Daskalov, H., Stobie, M., Austin, B., (1998). *Klebsiella pneumoniae*: a pathogen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, **18**(1): 26-28.
- Derlet, R.W. Carlson, J.R., (2004). An analysis of wilderness water in Kings Canyon, Sequoia, and Yosemite National Parks for coliform and pathologic bacteria, *Wilderness and Environmental Medicine*, **15**: 238-244.
- Düzel, S., (1999). Ege Bölgesi göl sularının bakteriyolojik yönden araştırılması, *Bor-nova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **24**(38): 41-47.
- Frerichs, G.N., (1993). Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens. 257-283 pp. In: Bacterial Diseases of Fish (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Gonzalez, C.J., Lopez-Diaz, T.M., Garcia-Lopez, M.L. Prieto, M., Otero, M., (1999). Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Food Protection*, **62**(11): 1270-1277.
- Gonzalez, C.J., Santos, J.A., Garcia-Lopez, M.L., Gonzalez, N., Otero, A., (2001). Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish, *Journal of Food Protection*, **64**(5): 687-691.
- Gökten, D., (1990). Gıdaların Mikrobiyal Ekolojisi. Mühendislik Fakültesi Yayınları No:21. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 292 s.
- Gürgün, V., Halkman, A.K., (1990). Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri, Gıda Teknolojisi Derneği, 7, 146 s.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Joice, G.J., Christol, J.J., (2005). Antibiotic resistance pattern of *motile aeromonads* from farm raised fresh water fish, *International Journal of Food Microbiology*, **98**(2):131-134.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. ve Williams, S.T., (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 787 pp.
- İnal, T., (1992). Besin Hijyeni, Final Ofset A.Ş., İstanbul, 783 s.
- Inglis, V., Roberts, R.J. ve Bromage, N.R., (1993). *Bacterial Diseases of Fish* Blackwell Science Ltd., Cambridge, 312 pp.
- Kapetanović, D., Kurtović, B., Teskeredžić, E., (2005). Differences in bacterial population in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fry after transfer from incubator to pools, *Food Technology and Biotechnology*, **43** (2): 189-193.
- Kim, D.-H., Brunt, J., Austin, B., (2006). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Applied Microbiology*, ISSN 1364-5072.
- Ogara, W.O., Mbutia, P.G., Kaburia, H.F.A., Sorum, H., Kagunya, D.K., Nduthu, D.I., Colquhoun, D., (1998). Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality in Kenya, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **18**: 7-9.
- Plumb, J.A., (1983). *Microbial Fish Disease Laboratory Manual*. Brown Printing Company Montgomery, 95 pp.
- Sakai, M., Atsuta, S. Kobayashi, M., Med, K.A.E., (1989). *Pseudomonas fluorescens* isolated from the diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *The Kitasato Archives of Experimental Medicine*, **62**(4): 157-162.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J.L., (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms, *Applied*

- Environmental Microbiology*, **66**(11): 4908–4915.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V., Sruoga, A., Butkauskas, D., (2006). Assessment of microbial diversity in the river trout, *Salmo trutta fario* L., intestinal tract identified by partial 16SrRNA gene sequence Analysis. *Fisheries Science*, **72**(3): 597–602.
- Tekinşen, O.C., (1976). Suyun bakteriyolojik muayenesi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları*, 324.
- Topic, P.N., Teskeredzic, E., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., (2000). *Aeromonas hydrophila* isolated from wild freshwater fish in Croatia, *Veterinary Research Communications*, **24**(6): 371-377.