



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MB-D-2008-0002**

**KEREVİT VE BASININ
İLERİ TANI YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Lütfi AVSEVER

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN - 2008

ÖNSÖZ

Karın ve kısıkaçları gıda olarak tüketilen ve düşük kalorili bir protein kaynağı olan kerevitin ülkemizdeki doğal türü *Astacus leptodactylus*' tur. Kerevit eti, enerji değerinin düşük olması nedeniyle diyetetik bir özellik gösterir. Ayrıca, sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi mineraller ile E ve K vitaminleri yönünden de zengin bir besindir.

Türkiye'nin doğal tatlı su ıstakozu türü olan *A. leptodactylus*, özellikle Anadolu dışında da geniş bir dağılım alanı olması ve ekonomik önemi bulunması nedeniyle Avrupa'nın en popüler türlerinden biridir. Günümüzde toplam kerevit üretimi (1894 ton, 2002 verileri) 1980'li yılların yaklaşık % 15'i dolaylarındadır. İznik gölü (557 ton) ve Eğirdir gölü (237 ton) ise en önemli istihsal sahalarımız arasında bulunmaktadır.

Aphanomyces astaci'den kaynaklanan Kerevit Vebası Avrupa tatlı su ıstakozlarını 1900'lerin başından itibaren etkileyerek Avrupa'daki stokları tahrip etmiştir. 1980'li yıllara kadar Türkiye'de problem yaratmayan hastalık, söz konusu etkenin Türkiye'ye girişinin engellenememesi sonucu kendi türümüz olan *A. leptodactylus* türünü de etkisi altına almıştır.

Kerevit vebası, Office International des Epizooties (O.I.E)'de tatlı su kabuklularının en önemli hastalıklarını oluşturan liste 1 hastalığı olarak yer almakta olup, Avrupa Birliği direktiflerinin 91/67 European Community Directive (ECD)'inde izlenmesi ve bildirim zorunlu kabuklu hastalıkları listesinde bulunmaktadır. Ülkemizde 1 Nisan 2004 tarihinde ihbarı mecburi hastalıklar kapsamına alınmıştır.

Ülkemizde kerevit vebası hastalığı konvansiyonel yöntemler ile incelenmiştir. Ancak kerevit vebasının teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) kullanımına yönelik herhangi bir veri bulunmamaktadır. İhbarı mecburi bir hastalık olan kerevit vebasının teşhisinde kısa sürede ve duyarlı tekniklerin rutin teşhis laboratuvarlarında kullanılması önemlidir.

Bu araştırmada ülkemizdeki en büyük kerevit stoklarının yer aldığı İznik ve Eğirdir göllerinde ileri tanı yöntemleri kullanarak kerevit vebası hastalığının varlığının araştırılması hedeflenmiştir.

Araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi (VTF 07019 numaralı proje) ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM: HS/02/08/138 numaralı proje) tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
2.1. Gereç.....	16
2.1.1. Örnekler.....	16
2.1.2. Standart <i>Aphanomyces astaci</i> suşu.....	17
2.1.3. Besi yerleri.....	17
2.1.3.1. İzolasyon besiyeri.....	17
2.1.3.2. Sporulasyon besiyeri.....	18
2.1.3.3. Stok besiyeri.....	18
2.1.4. PCR malzemeleri.....	19
2.1.4.1. DNA ekstraksiyon kiti.....	18
2.1.4.2. Primerler.....	19
2.1.4.3. MgCl ₂	19
2.1.4.4. Taq polimerase ve 10 x PCR buffer.....	19
2.1.4.5. dNTP Set.....	19
2.1.4.6. Agarose jel.....	19
2.1.4.7. Ethidium bromid.....	20
2.1.4.8. Hph I enzimi.....	20

	Sayfa
2.1.4.9. Marker.....	20
2.2. YÖNTEM.....	20
2.2.1. Direkt tanı yöntemi.....	20
2.2.1.1. Direkt mikroskopik muayene.....	20
2.2.2. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu.....	21
2.2.2.1. İzolasyon ve kültür.....	21
2.2.2.2. İdentifikasyon.....	21
2.2.3. PZR.....	21
2.2.3.1. DNA ekstraksiyonu	21
2.2.3.2. DNA'nın amplikasyonu.....	23
2.2.3.3. Agaroz jel elektroforezi.....	24
3. BULGULAR.....	25
3.1. Klinik bulgular.....	25
3.2. Mikrobiyolojik bulgular.....	29
3.3. PZR bulguları.....	34
4. TARTIŞMA.....	36
5. SONUÇ.....	39
ÖZET.....	40
SUMMARY.....	41
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	47
TEŞEKKÜR.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>A. leptodactylus</i>	<i>Astacus leptodactylus</i>
<i>A. astaci</i>	<i>Aphanomyces astaci</i>
CEFAS	Çevre, Balıkçılık ve Aqua Kültür Merkezi (The Centre for Environment, Fisher and Aquaculture Science)
EDC	European Community Directive
O.I.E	Office International des Epizooties
PCR (PZR)	Polimerase Chain Reaction
SDA	Saboraud Dekstroz Agar
TBE	Tris-Borate-EDTA

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1.	1988-1997 yılları arasında Türkiye iç sularından elde edilen tatlı su ıstakozunun (kerevit) miktarları ile ihraç edilen dondurulmuş kerevit miktarları.....	6
Çizelge 1.2.	<i>A. astaci</i> 'nin bazı Avrupa ülkelerindeki yaygınlığı.....	7
Çizelge 2.1.	PZR' da ampliksiyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon konsantrasyonları	23
Çizelge 2.2.	PZR inkübasyonu sıcaklık ve süreleri.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.1.	Bir kerevitin morfolojisi.....	1
Şekil 1.2.	Kerevitin longitudinal kesiti.....	4

RESİMLER DİZİNİ

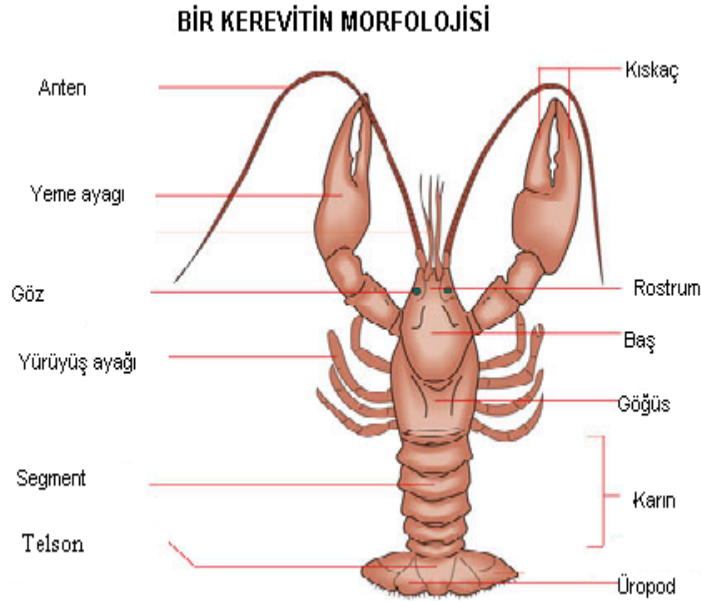
	Sayfa
Resim 1.1. Yumurtalarını taşıyan anaç kerevit.....	2
Resim 1.2. <i>A. leptodactylus</i> türünde çiftleşme.....	2
Resim 1.3. <i>A. astaci</i> 'ye ait spor kümesi fotoğrafı.....	8
Resim 1.4. <i>A. astaci</i> 'nin makroskopik görüntüsü.....	9
Resim 1.5. <i>A. astaci</i> şüpheli bir olgudan alınmış görüntü.....	11
Resim 2.1. Bu çalışmada alınan bir görüntü. İznik Gölünde pinterle kerevit avı, Eylül 2007.....	17
Resim 2.2. Kerevit numunelerinin laboratuara ulaştırılması.....	17
Resim 3.1.1. Abdominal bölgede melanizasyon. İznik Gölü, Temmuz 2007.....	25
Resim 3.1.2. Abdominal bölgede melanizasyon. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007.....	26
Resim 3.1.3. Abdominal bölgede ileri derecede melanizasyon ve kaslarda fokal beyazımsı renk değişikliği. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007.....	26
Resim 3.1.4. Abdominal bölgede ileri derecede melanizasyon.İznik Gölü, Ağustos 2007.....	27
Resim 3.1.5. Ekstremitte kaybı ve aynı bölgede melanizasyon. Eğirdir Gölü, Ağustos 2007.....	27
Resim 3.1.6. Üst sırt kabuğunda melanizasyon. Eğirdir Gölü, Ağustos 2007.....	28
Resim 3.1.7. Kuyruk tabanında melanizasyon. İznik Gölü, Eylül 2007.....	28
Resim 3.2.1. IM agar ortamında direkt kerevit dokusundan yapılan ekimde üreyen 48 saatlik mantar kolonisi İznik Gölü, Ağustos 2007.....	29
Resim 3.2.2. IM agar ortamında 48 saatlik subkültürden üreyen mantar kolonisinin petrinin arka yüzündeki görüntüsü. Egirdir Gölü, Ağustos 2007.....	30
Resim 3.2.3. IM agar ortamında 48 saatlik subkültürden mantar kolonisi. İznik Gölü, Ağustos 2007.....	30
Resim 3.2.4. Subkültürün 10. günü. Petriyi tamamen sarmış spor kümeleri ile kaplı mantar kolonisi. Eğirdir Gölü, Ağustos 2007.....	31

Resim 3.2.5. Subkültürün 10. günü. Petriyi tamamen sarmış spor kümeleri ile kaplı mantar kolonisi. İznik Gölü, Ağustos 2007.....	31
Resim 3.2.6. Subkültürden Saboraud Dekstroz Agar (SDA)' a yapılan ekim....	32
Resim 3.2.7. 48 saatlik subkültürden laktofenol pamuk mavisi ile yapılan boyama. Septasız, sporangia yapılarına sahip mantar hifaları. İznik Gölü, Temmuz 2007.....	32
Resim 3.2.8. 48 saatlik subkültürden laktofenol pamuk mavisi ile yapılan boyama. Septasız, sporangia yapılarına sahip mantar hifaları. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007.....	33
Resim 3.2.9. 10 günlük subkültürden laktofenol pamuk mavisi ile yapılan boyama. İleri sporulasyon. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007.....	33
Resim 3.2.10. Standart <i>Aphanomyces astaci</i> suşunun IM agar ortamındaki görüntüsü.....	34
Resim 3.3.1. PZR uygulamasının jel elektroforez görüntüsü.....	35

1.GİRİŞ

Tatlı su ıstakozu olarak da bilinen kerevitler (crayfish), *Astacidea* familyasından olup iç sularımızda yaygın olarak bulunurlar. Ortalama ömürleri 5 ile 20 yıldır. Bataklık ortamında hızlı gelişme kabiliyetine sahip olup, 4-5 yılda boyları 10-12 cm uzunluğa ve ağırlıkları ise 75-100 g'a erişir. Su sıcaklığına bağlı olarak Ekim-Kasım aylarında çiftleşen kerevitlerden temmuz aylarında yumurtalar açılır (Anonim 2 2008).

Şekil 1.1. Bir kerevitin morfolojisi (Anonim 2 2008).



Resim 1.1. Yumurtalarını taşıyan anaç kerevit (Anonim 2 2008).



Kerevitler omnivor canlılar olup en çok tercih ettikleri hayvansal besinler sudaki böcek larvaları, küçük omurgasız canlılar, balık yavruları ve taze balık leşleridir. Bitkisel besinlerden ise sularda doğal olarak bulunan su bitkileri ve çürümeye yüz tutmuş bitki artıklarını tercih ederler. Yumurtalarını karın altlarında taşırlar (Anonim 2 2008).

Çiftleşmeleri ise kısa bir süre için ters “Y” şeklini almaları ile mümkün olur.

Resim 1.2. *Astacus leptodactylus* türünde çiftleşme (Anonim 2 2008).



Kerevitler doğal olarak buldukları tatlı su alanlarında ekolojik dengenin birer parçası halindedirler. Beslenme özellikleri bakımından omnivor olmakla birlikte su diplerindeki organik parçacıkları da kullanabilirler (Huner 1994). Ayrıca, her türlü organik materyalin işlenmesinde oynadıkları önemli rol nedeni ile ekosistemde enerji dengeleri üzerinde etkindirler (Hessen ve ark 1993, Wallace ve ark 1997, Zhang ve ark 2003). Ayrışmakta olan materyaller üzerinden beslenen, su diplerindeki organik parçacıkların işlenmesi ve mineralizasyonunda, iç su çeşitliliği ve partikül organik madde birikiminde önemli etkileri bulunan bu canlılar için “ekosistem mühendisi” benzetmesi yapılmaktadır (Zhang ve ark 2004). Kerevitler ekosistemde oynadıkları bu roller nedeni ile durgun ve akarsu habitatları için anahtar tür olarak görülmektedirler (Hogger 1988, Momot 1995, Nyström 2002). Ortamdan yok olmaları veya yeni bir ortama sokulmaları sucul ekosistemler üzerinde çok ciddi etkiler doğurabilir (Matthews ve Reynolds 1992, Nyström ve Strand 1996).

Vücudun bölgeleri şöyle özetlenebilir:

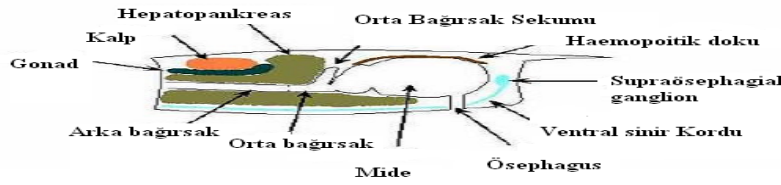
Baş Bölgesi: Baş bölgesi üzerinde saplı gözler hariç, 5 çift ekstremite vardır. Bunlardan bir çifti kısa anten, bir çifti de uzun antenlerdir. Kısa antenlerin her biri protopodit denen bir gövdeye sahip olup, bunun üzerinde de endopodit ve exopodit adı verilen iki uzantı vardır. Uzun antenler üzerinde de yine bir endopodit ve bir exopodit adı verilen iki uzantı vardır. Ayrıca uzun antenlerin kaidesinde, dışarıya açılan ve boşaltım organı olarak vazife gören birer delik bulunur. Baş bölgesinde yer alan diğer 3 çift ekstremite ise, ağız parçalarıdır. Bunların bir çifti mandibül, bir çifti birinci çeneler (maxillul), bir çifti de ikinci çeneler (maxil) olarak bilinirler (Anonim 2 2008).

Torax Bölgesi: Göğüs bölgeleri sekiz segmentten meydana gelmiştir. Bunlardan ilk üçü üzerinde çene ayakları denen maksillipedler bulunur. Bunlardan sonra gelen 5 posteriyor segment üzerinde ise yürüme bacakları denen pereipodlar bulunur. Bunlardan birinci çifti oluşturanlar diğerlerine nazaran daha kuvvetli gelişerek pens denen chelipedleri meydana getirmişlerdir. Yine bunların ikinci ve üçüncü çiftlerinin uçlarında da çok zayıf gelişmiş küçük pensler bulunmaktadır.

Dördüncü ve beşinciler ise uçlarındaki küçük penslerle sonuçlanırlar (Anonim 2 2008).

Abdomen Bölgesi: Abdomen veya karın bölgesi denilen vücudun posteriyör kısmı alttan ve üstten belirgin şekilde segmentlidir. Bu bölge, birbirleri üzerinde hareket eden 6 segmentten meydana gelmiştir. Ayrıca, son kısmında telson denilen bir kuyruk bölgesi bulunur ve anüs bunun ventralinden dışarı açılır. Abdominal bölgedeki segmentlerin her birinde 4 ayrı parça bulunur. Bunlardan dorsaldekine tergum, ventraldekine sternum ve yanlardakine pleura adı verilir (Anonim 2 2008).

Şekil 1.2. Kerevitin longitudinal kesiti (Anonim 2 2008).



Kerevitler iç sularımızda ekonomik değeri yüksek olan kabuklular olup Anadolu'nun birçok göl, baraj gölü ve akarsularında doğal olarak bulunurlar. Tatlı sularımızdan pinterlerle avlanan kerevitler satışa kadar havuzlarda bekletilir ve alıcı firmalara satılır. Buradaki kerevitler boy ölçme işlemlerine tabi tutulduktan sonra toplama havuzlarına nakledilirler. Kerevitler pazarlanıncaya kadar bu havuzlarda sirküle eden su içinde saklanırlar. Buradan ya canlı ihraç edilir ya da işlenmek üzere işletmelere sevk edilirler (Harlıoğlu 1996).

Kerevit, Türkiye'de; Akşehir, Apa, Beyşehir, Çivril (Işıklı), Eber, Eğirdir, Gölcük, Gölarmara, İznik, Manyas, Mogan, Sapanca, Terkos ve Uluabat (Apolyont) Göl'leri; Keban ve Seyhan Baraj Göl'leri; Tunca Nehri; Cori, Gelemen ve Miliç Çayları'nda; ayrıca pek çok göl, gölet ve akarsuda bulunmaktadır (Rahe ve Soylu 1989). Türk kerevitinin şu anda ülkemizde yetiştiriciliği yapılmamaktadır (Harlıoğlu 2004).

1986 yılından sonra özellikle kerevit vebasının görülmesi, aşırı avlanma ve çevre kirlenmesi nedenleriyle stoklar giderek azalmıştır (Matthews ve Reynolds 1990, Kuşat ve Bolat 1995, Harlıoğlu ve Holdich 2001). Kerevit vebasının görüldüğü su kaynaklarımız; Akşehir, Beyşehir, Çivril, Eber, Eğirdir, Gölarmara, İznik, Manyas, Mogan, Sapanca ve Uluabat Göl'leridir (Baran ve Soylu 1989, Rahe ve Soylu 1989).

Türkiye de dahil olmak üzere Avrupa'nın tamamında *Astacus* cinsine ait tatlısu istakozlarının tahrip olmasının temel nedeni çok hızlı yayılması ve yüksek mortalite ile seyretmesinden ötürü *Aphanomyces astaci* olarak gösterilmektedir (Baran ve Soylu 1989, Oidtmann ve ark 1999).

Kerevit vebası etkeni olarak bilinen *A. astaci*, tatlı su istakozlarının en tehlikeli ve yüksek infeksiyöziteli bir parazitik mantar türüdür (Köksal 1988). *A. astaci*'nin Amerikan türü dışında dünyadaki tüm tatlısu istakozu türlerini infekte etme yeteneğinde olduğu ve %100 ölüme yol açarak popülasyonları önemli düzeyde tahrip ettiği bilinmektedir (Alderman ve Polglase 1986, Rantamaki ve ark 1992). En duyarlı tür Avustralya kerevitleridir (Office International des Epizooties-O.I.E 2003).

Amerika kökenli olan *Pacifastacus leniusculus* ve *Procambarus clarkii* türü kerevitler, yoğun stres altında bulunmadıkları sürece kerevit vebasına dirençli türler olarak bilinirler (Thompson 1990). Bu özellikleri yüzünden, bu türler 21 Avrupa ülkesinde, kerevit vebası nedeni ile azalan stokları desteklemek için yerleştirilmiştir (Lowery ve Holdich 1988; Westman ve Westman 1992). Ancak, bunlar sonradan, yarattıkları sorunlar nedeni ile işgalci olarak nitelenmeye başlanmışlardır (Bubb ve ark 2004).

A. astaci, öncelikle Avrupa'daki tatlısu istakozu popülasyonlarında (*Astacus astacus*, *Austropotamobius pallipes*) eliminasyona yol açmıştır. Bu parazitik mantar türüne ilişkin ilk rapor 1860'da İtalya'dan gelmiş ve buradan Orta Avrupa ile Finlandiya ve İsveç'e kadar ulaşmıştır (Cerenius ve Söderhäll 1984). Daha sonra

1971’de Norveç, 1981’de de İngiliz Adalarında söz konusu etkenin varlığı rapor edilmiştir (Alderman ve Polglase 1986). Avrupa tatlı su istakozu stoklarının son derece olumsuz etkilendiği ve elimine olduğu dönemde Türkiye bu üründen önemli ekonomik yararlar sağlamıştır ve 1984 yılına kadar da herhangi bir problemle karşılaşmamıştır. Türkiye, 1984 yılında kendine özgü tür olan *Astacus leptodactylus* ile 7936 tonluk önemli bir üretim sağlamıştır (Cerenius ve Söderhäll 1984, Rantamaki ve ark 1992).

Türkiye’de kerevit ismiyle de bilinen tatlı su istakozu dünyada 1830’lu yıllardan sonra önemli bir ticari ürün ya da lüks bir gıda maddesi olarak değerlendirilmesine rağmen, Türkiye’de ise ancak II. Dünya savaşından sonra su ürünleri içerisinde önemli ihraç ürünleri arasına girmiştir (Kuşat ve Bolat 1995, Harlıoğlu 2004). Ülkemiz iç sularında 1988-1997 yılları arasında elde edilen tatlı su istakozunun miktarları ile dondurularak ihraç edilen kerevit miktarları Çizelge 1.1. de verilmiştir (Devlet Planlama Teşkilatı 2002).

Çizelge 1.1. 1988-1997 yılları arasında Türkiye iç sularından elde edilen tatlı su istakozunun (kerevit) miktarları ile ihraç edilen dondurulmuş kerevit miktarları.

Yıl	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Üretim (ton)	1801	986	542	320	324	404	524	551	850	1100
Dondurulmuş (ton)	321.7	148.8	152.2	153.9	157.8	80	113.2	34.2	324.2	397

Hastalığın bazı Avrupa ülkelerindeki durumu ise Çizelge 1.2. de verilmiştir (Anonim 1 2008).

Çizelge 1. 2. *A. astaci*'nin bazı Avrupa ülkelerindeki yaygınlığı (Anonim 1 2008)

*Hastalığa Duyarlı kerevit türü bulunmayan yerler.

Ülke	Yok	Bildirilmedi	Nadir	Lokal	Yaygın	Çok Yaygın
Danimarka				X		
Estonya		X				
Rusyanın Avrupa yakası		X				
Finlandiya						X
Faroe adaları*	X					
Almanya					X	
Greenland*	X					
Izlanda*	X					
Letonya			X			
Litvanya					X	
Norveç			X			
Polonya					X	
İsveç						X
Türkiye		X				

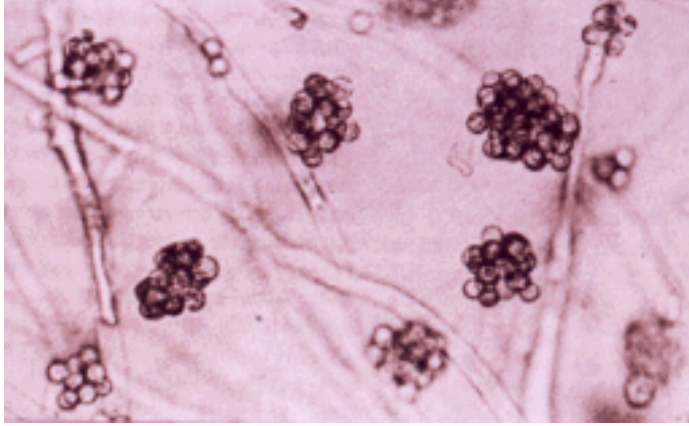
Hastalıkta bulaşma sudaki zoosporların alınması sonucu oluşur. Sporlar sularda yaklaşık 5 gün kadar canlı kalabilirler. Hastalık suyun akış yönünde hızlı, akış yönü tersinde yavaş yayılmaktadır. Hastalığın yayılmasında su ısı ve alınan zoospor miktarı etkilidir. Etken genellikle kontamine ekipmanlarla taşınır. Ayrıca balıkların hareketlerinin hastalığı bir bölgeden diğerine taşıdığına dair veriler de vardır (Oidtmann ve ark 1999).

Hastalığın konvansiyonel yöntemlerle tanısı; klinik semptomlar, etkenin besi yerindeki üreme özellikleri, hyphal yapısı ve sporlanma şekli göz önünde bulundurularak gerçekleştirilir (O.I.E 2003).

Oomycete'nin *Saprolegniales* takımına dahil olan *A. astaci*, grubunun özelliği olarak sucul yaşama çok iyi adapte olmuştur (Yavuzcan 2002). Oomycetales morfolojik bakımdan benzerlikler gösteren çeşitli türleri kapsamaktadır.

Aphanomyces cinsinde, zoosporangia (aseksüel üreme dönemi) miseloiddir (Alderman ve ark 1987). Bu cinste karakteristik olan hifal segment içeriğinin tek sıralı primer spora dönüşümü ve daha sonra sporangium ucunda cluster (spor topları) oluşturmak üzere dışarı çıkmasıdır (Cerenius ve ark 1988).

Resim 1.3. *A. astaci*'ye ait spor kümesi fotoğrafı (Diéguez-Uribeondo 1997)

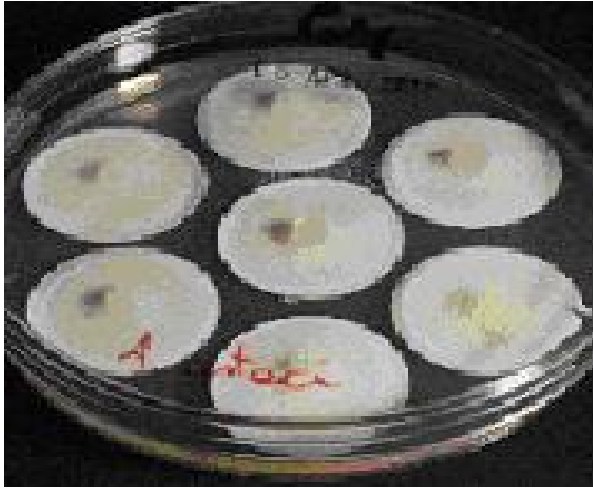


A. astaci'de spor boşalımı akiloiddir ve aplanospor olan ilk spor döneminin sporangial uçta kist haline geçmesi muhtemelen baskılanmış saprolegniöz primer zoosporunu temsil eder. *A. astaci*'de zoosporangium yerine sporangium terimi, primer zoospor yerine de primer spor terimleri kullanılmaktadır. Çünkü flagellalı primer spor bulunuşuna dair herhangi bir kanıt yoktur (Alderman ve Polglase 1986, Alderman ve ark 1987).

Basit olarak, fungal parazitin infekte edici birimi, zoosporlardır. Zoosporlar hifa içinde tek sıra primer spor olarak oluşur ve daha sonra hifal uçtan itilerek çıkar. Bu çıkıştan sonra primer sporlar kistleşir ve birbirine tutunarak bir cluster oluşturur. Belli bir dinlenme periyodunun sonunda primer kistlerden iki flagellalı sporlar teşekkül eder. Bunlar aktif olarak yüzme yeteneğindedirler ve spesifik olmaksızın kendi konakçısına doğru kemotaktik bir yönelme gösterirler. Kısa bir zaman sonra zoospor yüzme işlemini sonlandırır ve sekonder kist oluşturur. Sekonder kistler ya zoospor oluşturur ya da penetrasyon yapısı oluşturmak için çimlenir. Penetrasyon yapısı, tatlısu istakozu kütikulasını yüksek kapasitede bozabilen enzimler salgılar (Unestam ve Weiss 1970, Yavuzcan 2002).

A. astaci'nin uygun besi yerinde büyüyen kolonileri renksizdir. Hifaların, agar kültüründeki ve tatlı su istakozu dokusundaki boyutu ve görüntüsü aynıdır. Vejetatif hifalar septasızdır. Genç, aktif olarak büyüyen hifalar yoğun, kaba granüler yapıya sahipken daha yaşlı hifalar vakuollerdir ve içi boş görünebilir (Alderman ve Polglase 1986, Alderman ve ark 1987, Köksal 1988).

Resim 1.4. *A. astaci*'nin makroskopik görüntüsü (Anonim 1 2008)



Agarda aktif olarak büyüyen tallus veya tallusun bir kısmı distile suya transfer edildiğinde 20 °C'de 15-18 saatte sporangia oluşmaktadır. Sporangial yapı değişken olabilir (Alderman ve Polglase 1986, Alderman ve ark 1987, Köksal 1988).

Gelişen sporangia içerisinde sitoplazma bir seri oval olarak uzunlaşmış birime bölünür. Bu, başlangıçta protoplazmanın iplik iplik olması ile bağlantılıdır. Sitoplazmik birimler boşalmaya kadar ve çıkışa kadar oval, uzamış olarak kalır. Primer sporlar sporangiumun ucundan hızla boşalır ve sporangial uçta birikir. Bu durum sıcaklığa bağlıdır. Her bir primer spor sferiktir ve diğer Aphanomyces türlerine göre oldukça az sayıdadır (Alderman ve Polglase 1986, Alderman ve ark 1987).

A. astaci yapay besi yerinde ve laboratuvar koşullarında daha iyi gelişir. Uygun konakçısının yokluğunda doğal koşullarda uzun süre canlı kalmaz. Etken, hem kültürde hem de infekte kerevitte 60 °C' de kısa sürede ölür. -20 °C de ya da daha az sıcaklıkta 48 saat ya da daha fazla canlı kalabilir (Oidtmann ve ark 1999).

A. astaci'den kaynaklanan hastalıkla mücadelenin zorluğunun yanı sıra etkeni izole etmede de bazı zorluklar vardır. Sekonder infeksiyonlardan ileri gelen fırsatçı bakteriler izolasyonu zorlaştırmaktadır. Fungusun yavaş gelişmesi ve bakteri kontaminasyonu en önemli problemlerdendir. Etkenin izolasyonundaki bu tür problemler de çalışmalara belirli bir düzeyde engel getirmektedir (Yavuzcan 2002).

Amerikan tatlısu istakozları; *Orconectes limosus*, *Pacifastacus leniusculus* ve *Procambarus clarkii* bu fungusa karşı dayanıklı ve kısmi ya da tamamen asemptomatik taşıyıcıdırlar (Köksal 1988).

Türkiye'ye özgü tür olan *A. leptodacylus*' un da dahil Avrupa istakozları ise; *Astacus astacus*, *Astacus pachypus*, *Astacus torrentium* ve *Austropotamobius pallipes* son derece yüksek seleksiyon baskısına rağmen dirençli generasyonlar oluşturma yeteneğinde değildir (Köksal 1988). Kerevit vebası sadece kerevitleri etkiler ve doğal olarak diğer kabuklularda görülmez. Ancak bir tür Çin yengeci olan *Eriocheir sinensis* deneysel olarak infekte edilebilmiştir (O.I.E 2003).

İnfekte tatlı su istakozları infeksiyonun belirtilerini gösterebileceği gibi hiç semptom göstermeyebilir (Köksal 1988). Ancak infekte bireylerde özellikle abdominal bölgede melanize noktalar ve ekstermite kaybı görüldüğü bildirilmektedir (Cerenius ve Söderhäll 1984). Fokal kahverengi-siyah melanizasyon alanları ve kaslarda fokal beyazımsı renk değişikliği etkenin en iyi semptomlarından sayılabilmektedir (O.I.E 2003).

Resim 1.5. *A. astaci* şüpheli bir olgudan alınan görüntü (Anonim 1 2008).



Hastalığın makroskopik muayeneler ya da smear yaparak tanıya edilmesi imkansızdır. Çünkü Saprolegniaceae'lerin çoğu üyeleri benzer özellikler gösterir. Kesin tanı için moleküler yöntemler kullanılmalı ya da daha spesifik izolasyona gidilmelidir (O.I.E 2003).

Ayrıntıda dikkat edilmesi gereken diğer bir hastalık Porcelain enfeksiyonu ya da *Thelohaniasis*'dir (bir mikrosporium enfeksiyonu). Ancak burada enfekte hayvanların kaslarında parlak beyaz renk değişimi görülür. Burada kasların incelenmesinde çok sayıda ve küçük sporlar göze çarpar. Ayrıca hastalığın gelişmesi aylar alır (O.I.E 2003).

Ayrıca etkilenen istakozların hareketlerinde koordinasyon bozukluğu, yavaş hareket etme, su yüzeyine çıkma, sırt üstü devrilme, sırt kabuğundan tutularak sudan dışarıya çıkarıldıklarında makasların ve bacakların felç nedeniyle aşağıya doğru sarkması, kuyrukta hareketsizlik, suyu terketme gibi davranış bozuklukları da görülebilir (Cerenius ve Söderhäll 1984, Oidtmann ve ark 1999). Ancak klinik semptomların hiçbir diagnostik değeri yoktur (O.I.E 2003).

A. astaci'nin, hastalığı yayan sporlarının konak bulamadığı takdirde bir kaç gün kadar yaşayabildiği bildirilmiştir (Huner 1994). Yetiştiricilik ünitelerinde hastalığın gözlenmesi durumunda havuzlardaki tüm kerevitlerin çıkartılarak imha

edilmesi ve boş havuzun bir kaç gün bekletilmesinin sporların da ölümüne neden olacağı ve bu sayede hastalık etkenini pratik bir şekilde elimine etmenin mümkün olduğu ifade edilse de (Huner 1994) bu uygulamayı, geniş doğal su alanlarında yapabilmek pratikte mümkün değildir. Ayrıca bu çok değerli ürünün söz konusu hastalığını tedavi etmek ve stoklarını iyileştirmek için yapılabilecekler sınırlıdır. Henüz bu hastalığa karşı kesin etkili bir ilaç veya kimyasal madde belirlenmemiştir. En akılcı çözümün doğal su ünitelerine sağlıklı tatlı su ıstakozu yavrularını stoklamak olduğu düşünülmektedir (Kuşat ve Bolat 1995).

Kerevit vebasından korunmada akvaryum suyuna 5g/litre dozunda Magnesium Chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) eklenebileceği yönünde bilgiler yer almaktadır (Anonim 1 2008). Yine *A. astaci*'nin yüksek patojenik yapısına rağmen etkene karşı çeşitli profilaktik önlemler; elektrikli bariyerler (Jones ve Buller 2001), dezenfektanlar (Alderman ve Polglase 1986) ve infekte bölgelerde avcılığına ilişkin sıkı uygulamalar önerilmektedir. Kontamine malzemeler (ağ v.s), sodyum hipoklorit ve iodoformlarla dezenfekte edilmeli veya 24 saatten daha uzun bir süre iyice kurutulmalıdır. Korunmada önerilen yöntemler tartışmaya açık konular olmakla birlikte esas olan nokta etkenin tatlı su ıstakozu için obligat olduğu ve bu canlı bulunmadığı sürece yaşayamayacağıdır (O.I.E 2003).

Kerevit populasyonlarının korunması ve yönetimi genel olarak, her ortam için geçerli bir koruma ve yönetim stratejisi uygulayarak sağlanabilir. Bir ortam için uygun olan bir koruma ve yönetim stratejisi ortamlar arasındaki çeşitli farklılıklardan dolayı diğer bir ortam için uygun olmayabilmektedir. Bu nedenle, herhangi bir koruma ve yönetim stratejisi belirlenmeden önce o populasyonu ilgilendiren ekolojik, ekonomik, hatta sosyal faktörlerin detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir (Yavuzcan 2002).

Hastalıktan korunmada, hastalığın eradikasyonunda ve yayılmasının engellenmesinde eğitimin rolü de çok önemlidir. Hastalığın tabiatı hakkında bilgilendirilmiş yetiştiriciler, sınır bölgelerinde bilgi içeren broşürlerin dağıtılması, medyanın rolü, okullardaki eğitim, ilgili grupları içeren yoğunlaştırılmış projeler bu kapsamda değerlendirilebilir. Ayrıca etkili yollardan biri de hastalığın taşıyıcısı

konumunda olan Amerikan kerevitlerinin yayılmasının engellenmesidir. Bazı ülkelerde bu türlerin stoklanmasını yasaklayan ya da izne tabi tutan düzenlemeler olmakla birlikte, pek çok ülkede bu türlerin ithalatı kesin çizgilerle yasaklanmıştır (Anonim 1 2008).

Hastalıktan korunmada mutlaka göz önünde bulundurulması gereken bir diğer unsur ise akvaryumculuk sektörüdür. Süs amaçlı satışı yapılan ve kerevit vebasının taşıyıcısı durumunda olan Amerikan kerevitlerinin tatlı su kaynaklarına ulaşması yeni bir kerevit vebası salgınına doğurabilir. Bu sebeple akvaryumculuk sektörünün çok iyi denetlenmesi ve Amerikan kerevitlerinin ülkeye girmesinin engellenmesi gerekmektedir (Sağlamtimur 2007).

Ülkemizde kerevit vebası etkeninin izolasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Yurdumuzda konu ile ilgili olarak Köksal (1988), Baran ve Soylu (1989), Türk kerevit stoklarında *A. astaci*'nin identifikasyonu ile ilgili çalışmalarda bulunmuş ve hastalığı konvansiyonel yöntemler kullanarak teşhis etmiştir. Timur (1990), Türkiye'deki bazı göllerde kerevit vebasının varlığını araştırmış, hastalığın varlığını konvansiyonel yöntemlerle ortaya koymuştur. Yavuzcan (2002), Mogan gölünden *A. astaci*'nin konvansiyonel yöntemlerle izolasyonunu yaparken, etkenin patojenitesinin haemolymph kalsiyumu ve su sertliği ile ilişkisini araştırmıştır. Harlıoğlu (2007), 1970'li yıllarda Türkiye'nin Avrupa'nın en önemli kerevit sağlayıcısı durumunda iken günümüze gelindiğinde bu konuda oldukça geriye düşmesinin sebeplerini araştırmış ve bunu suların kirlenmesi ve kerevit vebası ile ilişkilendirmiştir. Aynı araştırmacı farklı bir çalışmada (2007), yabancı kerevit türlerinin ülkemizde stoklanmasının getirebileceği muhtemel riskler ile ilgili olarak, özellikle Amerikan kerevit türlerinin *A. astaci* taşıyıcısı olduklarının önemini vurgulamış ve bu türlerin yerli türümüz açısından tehlikelerine dikkat çekmiştir.

Diğer taraftan dünyada *A. astaci*'nin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle teşhisinin yapıldığına dair daha fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Unestam ve Weiss (1970), tatlı su istakozu ile *A. astaci* arasındaki konak-parazit ilişkisini incelemişlerdir. Häll ve Unestam (1980), *A. astaci* üzerine fungusidlerin etkisini araştırmış ve malaşit yeşilini en etkili fungusid olarak belirtmiştir. Persson ve

Soderhall (1983), tatlı su ıstakozu *Pacifastacus leniusculus*'un *A. astaci*'ye karşı direnci üzerine araştırmalar yapmış, farklı bir araştırmada ise (1987) aynı araştırmacılar, haemocyt sayısının tatlı su ıstakozu *Pacifastacus leniusculus*'un *A. astaci*'ye karşı direncindeki rolünü incelemiştir. Alderman ve Polglase (1986), *A. astaci*'nin izolasyon ve kùltürü üzerine çalışmalar yürütmüş, özellikle etkenin laboratuvar koşullarında üretilmesi yönünde bilgiler elde etmiştir. Matthews ve Reynolds (1990), İrlanda'daki kerevit stoklarında *A. astaci*'nin oluşturduğu klinik belirtiler ile ilgili çalışmalar yürütmüş, hastalığın her zaman klinik belirti göstermediğini ortaya koymuştur. Rantamaki ve ark (1992), yapmış oldukları çalışmada MgCl₂ uygulamasının *A. astaci*'nin bulaşmasını önlemede etkili olduğu sonucuna varmış ve göl suyuna ilave edilmesi gereken MgCl₂ miktarlarını saptamıştır. Holdich ve arkadaşları (1999), yaptıkları çalışmada Avrupa'nın bazı bölgelerinde yerli kerevit popülasyonunun *A. astaci*'ye bağlı olarak yok olduğunu, yerlerini kerevit vebasına dirençli Amerikan tatlı su ıstakozlarının aldığını ortaya koymuştur. Jones ve Buller (2001), hastalık etkenini Avustralya ve Yeni Zellanda'da konvansiyonel tanı yöntemlerini kullanarak teşhis etmişlerdir. Bangyeekhun ve ark (2001), moleküler yöntemler kullanarak *A. astaci*'nin iki farklı proteinaz geninin karakterizasyonunu ortaya koymuşlardır. Oitmann ve ark (2002), *A. astaci*'nin bulaşma yolları üzerine yaptıkları araştırmada hastalığın bulaşmasında taşıyıcı konumda olan Amerikan kerevitleri ile etkenin sporlarını mekanik olarak taşıyan balıklar üzerinde durmuştur. Oitmann ve ark (2004), yaptıkları başka bir çalışmada klinik örneklerden PZR (PCR) yöntemi ile *A. astaci*'nin varlığını ortaya koymuşlar ve etkenin teşhisinde bu yöntemin O.I.E'de referans yöntem olarak kabul edilmesini sağlamışlardır.

Kerevit vebası etkeni olan *A. astaci*, 2006 yılı Ekim ayında Norveç'te bildirilmiştir (Anonim 1 2008). Araştırmacılar hastalığı, en yakın duyarlı Nobel kerevitlerine 100 km uzaklıktaki bir tatlı su kaynağında yaşayan Amerikan Signal kerevitlerinde (*Pacifastacus leniusculus*) tespit etmişlerdir. Hastalık etkeninin *A. astaci* olduğu PZR ile kesinlik kazandıktan sonra hastalığın duyarlı türlere bulaşmasını engellemek için Amerikan Signal kerevitleri için bir eradikasyon programı başlatılmıştır Çevre, Balıkçılık ve Aqua Kùltür Merkezi (CEFAS) tarafından doğrulan bir diğer vaka 2007 yılında İngiltere'deki Waveney nehrinde,

Astacus leptodactylus türünde ortaya çıkan kerevit vebası vakasıdır (CEFAS 2007). Bildirilen son kerevit vebası mihrakı ise 2008 yılında Çek Cumhuriyetinde çıkan salgındır (Kozubíková ve ark 2008).

Kerevit ihracatının ülkemize sağladığı önemli ekonomik girdi dışında, kerevitlerin tatlı su kaynaklarının ekolojik dengesi için kilit rol oynuyor olması, konu ile ilgili yapılacak araştırmaları önemli kılmaktadır. Ülkemizdeki kerevit ihracatı, 2002 verilerine göre, 1980'li yıllarla karşılaştırıldığında % 15 dolaylarındadır (Devlet Planlama Teşkilatı 2002). Bu düşüşün temel nedeni ise bir çok araştırmacı tarafından (Timur 1990, Kuşat ve Bolat 1995, Yavuzcan 2002, Harlıoğlu 2004) kerevit vebası olarak gösterilmektedir.

Bu çalışmada kullanılan PZR yöntemi, hedef DNA sekansının in vitro olarak enzimatik amplikasyonunu sağlayan güvenilir, duyarlı, hızlı bir moleküler tekniktir. Hastalığın kısa sürede ve güvenilir olarak teşhis edilmesinde bu yöntem tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Yurdumuza bu hastalığın teşhisinde PZR'nun kullanıldığı bir çalışma henüz mevcut değildir. Ulusal ekonomi kayıpları göz önüne alındığında duyarlı ve hızlı tekniklerin laboratuvarında kullanılmasının önemi tartışılmaz.

Bu çalışma ile ülkemizdeki en yoğun kerevit stoklarının bulunduğu İzmit ve Eğirdir göllerinde hastalığın varlığının konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Etkenin kesin teşhisi için PZR ile doğrulama önerilen bir yöntemdir (O.I.E 2003).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekler

Bu çalışmada örnekler, kerevit vebası etkeninin üreyebildiği su sıcaklığı dikkate alınarak (O.I.E 2003), Haziran, Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım ve Aralık ayları boyunca, ülkemizde kerevit potansiyelinin en fazla olduğu İznik ve Eğirdir göllerinden temin edilmiştir.

Altı ay boyunca her iki gölden her defasında örnekleme yöntemi ile 30 adet canlı kerevit laboratuvara taşınmıştır. Toplamda ise 180 İznik, 180 Eğirdir gölleri olmak üzere 360 kerevit üzerinde çalışılmıştır. İznik gölünden kerevitlerin temini kayak ile avlanarak elde edilmiş olup, Eğirdir gölünden ise ilgili koporatifçe yakalanan kerevitlerden temin yoluna gidilmiştir. Avlanma esnasında İznik gölünden tüm istasyonlardan atılan pinterler değerlendirilmiş, böylece örneklerin gölü temsili sağlanmıştır. Eğirdir gölü için ise koporatifin yakalanan kerevitleri topladığı toplama havuzundan rasgele örnekleme yapılmış olup bu da gölü temsil eder niteliktedir. Toplanan bu kerevitler nemli kalmalarına dikkat edilerek, soğuk zincirde ve canlı olarak laboratuvara getirilmiştir. Çalışmalar Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Resim 2.1. Bu çalışmada alınan bir görüntü. İznik Gölünde pinterle kerevit avı, Eylül 2007



Resim 2.2. Kerevit numunelerinin laboratuvara taşınması



2.1.2. Standart *Aphanomyces astaci* suşu

Standart *A. astaci* suşu, Kerevit vebasının uluslararası referans birimi olan CEFAS- İngiltere'den temin edilmiştir.

2.1.3. Besi Yerleri

2.1.3.1. İzolasyon besi yeri

IM agar:

Agar.....	2 g
Yeast extract.....	1 g
Glucose.....	5 g
Oxolinic acid.....	10 mg

Yukarıdaki karışım, 1000 ml distile suya ilave edilip otoklavlandıktan sonra, 40 °C'ye kadar soğutulup, içine steril 1.0 g penicillin eklenerek IM agar ortamı elde edilmiştir.

2.1.3.2. Sporulasyon besi yeri

PG1 Medium

Steril göl suyundan oluşan agarsız ortamdır.

2.1.3.3. Stok besi yeri

Pepton Glukoz besi yeri

100 ml steril göl suyu içerisine 1 g pepton, 2 g glikoz, 2 g agar kondu. İçerisine stoklanması istenen mantar miselleri yerleştirildikten sonra üzerine steril zeytin yağı eklendi.

2.1.4. PZR Malzemeleri

2.1.4.1. DNA Ekstraksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu için Rosch High Pure Template Kit (Katolog no: 11 796 828 001) kullanıldı.

2.1.4.2. Primerler

Metabion International AG Marka Primerler kullanıldı. Primer çiftinin formülasyonu (O.I.E 2003),

Forward primer : 5' AAG-AAG-GCT-AAA-TTG-CGS-TA-3'

Reverse primer: 5'-CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3'

2.1.4.3. MgCl₂

SIGMA marka 15 mM MgCl₂ kullanıldı.

2.1.4.4. Taq polymerase ve 10 x PCR buffer

SIGMA'nın Taq Polimeraz ve 10 x PCR buffer'ı kullanıldı.

2.1.4.5. dNTP Set

Fermentas marka dNTP Set kullanıldı.

İçeriği:

0.25 ml 100 mM dATP

0.25 ml 100 mM dCTP

0.25 ml 100 mM dGTP

0.25 ml 100 mM dTTP

Her birinden 0.2 mM kullanıldı.

2.1.4.6. Agarose jel

Önce TBE (*Tris-Borate-EDTA*) buffer hazırlandı.

108 gm Tris base
55 gm Boric acid
9.3 gm Na₄EDTA

Karışım 1 litre suya eklendi. pH'ı 8.3' e ayarlandı.

Hazırlanan TBE buffer, % 2.0 agarozla karıştırıldı, mikro dalga fırında bekletilerek jel haline getirildi. SIGMA marka Agaroz kullanıldı.

2.1.4.7. Ethidium bromid

SIGMA marka % 1 lik Ethidium bromid kullanıldı.

2.1.4.8. Hph I Enzimi

Fermentas Marka Hph 1 Restriksiyon enzimi kullanıldı.

2.1.4.9. Marker

Fermantes marka 100 bp'lik DNA Ladder kullanıldı.

2.2. Yöntem

O.I.E Manual Aquatic Animal Diseases'de bildirilen metot kullanılmıştır. Canlı kerevitler yöntemde belirtildiği şekli ile eterle bayıltılarak öldürülmüştür.

2.2.1. Direkt tanı yöntemi

2.2.1.1. Direkt mikroskopik muayene

Her bir kerevitin lezyonlu dokuları başta olmak üzere, yumuşak abdominal kütüküla, kuyruk dokusu, peri anal bölge kütükülası, sırt kabuğu ile kuyruk arasındaki kütüküla, yürüyüş ayakları ve solungaçlarından steril lam ile yapılan kazıntılar ışık mikroskopunda mantar hifaları yönünden incelenmiştir.

2.2.2. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu

2.2.2.1. İzolasyon ve kültür

İzolasyon amacıyla IM agar (Alderman ve Polglase 1986, O.I.E 2003) kullanıldı. Kerevit dokusundan mantarın izolasyonu için varsa melanize alanlar başta olmak üzere, yumuşak abdominal kütüküla, kuyruk dokusu, peri anal bölge kütükülası, sırt kabuğu ile kuyruk arasındaki kütüküla, yürüyüş ayakları ve solungaçlar % 70'lik etil alkol ile silindikten sonra steril bir makasla kesilerek ayrıldı. Çıkarılan bu bölgeler içinde steril distile su bulunan petriyer içerisine yerleştirilerek steril bisturi ile 1-2 mm büyüklükte parçalara ayrıldı. Bu doku parçaları, IM agar ortasına plante edildi. Doku plante edilen besi yerleri 22 °C' de inkübasyona bırakıldı (O.I.E 2003).

2.2.2.2. İdentifikasyon

IM agarda üreyen mantar miselleri makroskopik ve mikroskopik görünüşleri yönünden *A.astaci*'nin morfolojik özellikleri dikkate alınarak incelendi. In vitro olarak sporlanmanın sağlanması için agar besi ortamında gelişen fungal koloninin uçlarından steril makasla küçük bir parça kesilerek bu parça PG₁ agarsız ortam (içerisinde steril musluk suyu bulunan petri kapları) içerisinde 20 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda *A. astaci*'ye ait karakteristik spor boşalması yönü ile gözlendi.

2.2.3. PZR

Oidtmann ve arkadaşlarının geliştirdiği ve O.I.E tarafından referans olarak belirtilen metot (O.I.E 2003) kullanıldı. Restriksiyon aşamasında Hph I enzimi kullanıldı.

2.2.3.1. DNA ekstraksiyonu

Ekstraksiyon aşamasında Roche'un High Pure PCR Template Preparation Kiti kullanıldı.

İM agarda üremiş üç günlük kültürlerden her birinden 0.5 g misel, agar yüzeyinden uzaklaştırılarak içinde 100 ml steril distile su bulunan tüplere yerleştirildi. Negatif kontrol için distile su, pozitif kontrol için aynı miktarda standart *A. astaci* miseli kullanıldı. Ekstarksiyona başlamadan önce su banyosu 70 °C'ye ayarlanarak içerisine 200 µl elution buffer yerleştirildi.

10 ml tüpler içerisine konan miseller iki dakika boyunca hızlı devirde vortekslendi. Sonra her birinden 200 µl alınarak 1.5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine yerleştirildi. 3000 g 5 dakika santrifüj edildi. Dipte toplanan pelet 200 µl'lik, içinde PBS bulunan tüplere aktarıldı. Üzerine 10 µl lizozim (0.5 mg/ml), 200 µl binding buffer, 40 µl proteinaz K eklendi, hızlıca karıştırıldı ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. 10 dakika sonunda üzerine 100 µl isopropanol eklenerek hızlıca karıştırıldı. Karışım buradan kit içerisinde yer alan ve toplama tüpü içerisine yerleştirilmiş olan filtre tüplerine alındı. Birbiri içerisine girmiş iki tüp bu şekilde standart santrifüj tüpüne yerleştirildi. 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpünden santrifüj sonrası toplama tüpüne geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte uzaklaştırıldı. Sonra ekstraksiyonu yapılan DNA'nın yıkanması işlemine geçildi.

Filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. Sonra toplama tüpünün içinde santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 500 µl removal buffer solüsyonundan eklendi. 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpü buradan yeni bir toplama tüpüne konarak aynı işlem removal buffer yerine bu kez 500 µl wash buffer kullanarak iki kez daha tekrar edildi. Bu şekilde DNA'nın yıkanması işlemi tamamlandı. Kalan son sıvıyı da filtreden uzaklaştırmak için filtre tüpü bir kez daha toplama tüpüne yerleştirildi ancak bu kez üzerine sıvı eklenmeden 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. DNA'nın tamamen rezervuarlarından arındırılması için elution aşamasına geçildi.

Filtre tüpü 1,5 ml lik temiz, steril mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 200 µl, daha önce su banyosunda 70 °C'ye ısıtılmış olan elution buffer eklendi. Karışım 8000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası DNA, rezervuarlarından

tamamen ayrılıp filtreden süzülerek mikrosantrifüj tüpüne toplandı. Ekstrakte edilen DNA'lar PZR'nda kullanılmaya kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

2.2.3.2. DNA'nın Amplikasyonu

PZR' da ampliksiyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon konsantrasyonları Çizelge 2.1. de verilmiştir.

Çizelge 2.1. PZR' da ampliksiyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon konsantrasyonları

Reaksiyon bileşeni	Konsantrasyonu
Primer 1	0.5 μM
Primer 2	0.5 μM
dNTP karışımı	0.2 mM
10x PCR buffer	5 μl
MgCl ₂	1.5 mM
Taq polimeraz	1.25 U

Örnek sayısına göre hazırlanan karışım, steril PZR tüplerine kondu. Her bir karışım üzerine 2.0 μl DNA eklendi. Final konsantrasyon, steril distile su ile 50 μl 'ye tamamlanarak Termal Cyler (Biometra marka)'a yüklendi. Kullanılan Taq polimeraz ısıya dayanıklı olmadığı için $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakikalık ön ısıtma aşaması uygulanmadı. Her aşamada 45 siklus gerçekleştirildi. Final ekstensiyon aşamasında tek siklus yapıldı. PZR inkübasyonu sıcaklık ve süreleri Çizelge 2.2. de verilmiştir.

Çizelge 2.2. PZR inkübasyonu sıcaklık ve süreleri

Denaturasyon	$94\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 dakika
Primer bağlanma	$54\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 dakika
Ekstensiyon	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 dakika
Ekstensiyon	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	7 dakika

Amplifikasyon ürünü $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırıldı. Elde edilen ürünler daha sonra konfirmasyon amacıyla Hph 1 (5 units) restriksiyon enzimi ile muamele edildi. Bunun için 10 μl reaksiyon karışımı hazırlandı. 1 μl Hph 1, 1 μl 10x buffer B (Restriksiyon enzimine ait), 8 μl ürün karıştırılarak $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ su banyosunda bir gece bekletildi. Ertesi gün PZR ürünleri (Standart suşa ait amplifikasyon ürünü, saha suşlarına ait amplifikasyon ürünleri, restriksiyon ürünleri) çözdürülerek Agaroz jelde yürütüldü.

2.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Parafin kağıdı üzerinde 2 μl boya solüsyonu (Loading buffer), 1 μl Etidium bromid, 10 μl Marker (DNA Ladder) karıştırılarak jelin 1. kuyucuğuna yerleştirildi. 2. kuyucuğa negatif kontrol için 10 μl steril distile su kondu. 3. kuyucuğa 2 μl boya solüsyonu, 1 μl Etidium bromid ve 8 μl standart *A. astaci* suşuna ait DNA amplifikasyon ürünü; 4. kuyucuğa 2 μl boya solüsyonu, 1 μl Etidium bromid ve 8 μl standart *A. astaci* suşuna ait DNA restriksiyon ürünü; diğer kuyucuklara (5-12) ise 2 μl boya solüsyonu, 1 μl Etidium bromid ve 8'er μl şüpheli DNA ürünleri jeli delmeden ve taşırmadan dikkatlice yerleştirildi. 100 V elektrik akımında 35 dakika yürütüldü. Sonra jel, elektroforez cihazından çıkartılarak kurulandı ve UV cihazında ultraviyole ışını altında okutuldu.

3. BULGULAR

3.1. Klinik bulgular

Araştırma kapsamında incelenen su ünitelerine ait tatlısu istakozlarında (*Astacus leptodactylus*) klinik semptom olarak abdomen başta olmak üzere; ekstremitelerde, üst kabukta ve kuyrukta kahverengi renkli melanize alanlara, bir kısmında karın kaslarında fokal beyazımsı renk değişikliğine, bazı kerevitlerde ise ekstremitte kaybına rastlanmıştır. Abdominal kütükülada ya da gözlerde hifa varlığına rastlanmamıştır. Suyu terk etme, koordinasyon bozukluğu ve paraliz bulguları gözlenmemiştir.

Resim 3.1.1. Abdominal bölgede melanizasyon. İznik Gölü, Temmuz 2007.



Resim 3.1.2. Abdominal bölgede melanizasyon. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007.



Resim 3.1.3. Abdominal bölgede ileri derecede melanizasyon ve kaslarda fokal beyazımsı renk değişikliği. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007.



Resim 3.1.4. Abdominal bölgede ileri derecede melanizasyon. İznik Gölü, Ağustos 2007.



Resim 3.1.5. Ekstremité kaybı ve aynı bölgede melanizasyon. Eğirdir Gölü, Ağustos 2007.



Resim 3.1.6. Üst sırt kabuğunda melanizasyon. Eğirdir Gölü, Ağustos 2007.



Resim 3.1.7. Kuyruk tabanında melanizasyon. İznik Gölü, Eylül 2007.



İznik gölünden sağlanan 180 kerevitin 27 tanesinde, Eğirdir gölünden sağlanan 180 kerevitin ise 25 tanesinde benzer lezyonlara rastlanmıştır. Temmuz, Ağustos ve Eylül aylarında rastgele örnekleme yöntemi ile temin edilen kerevitlerin dörtte birinden fazlası

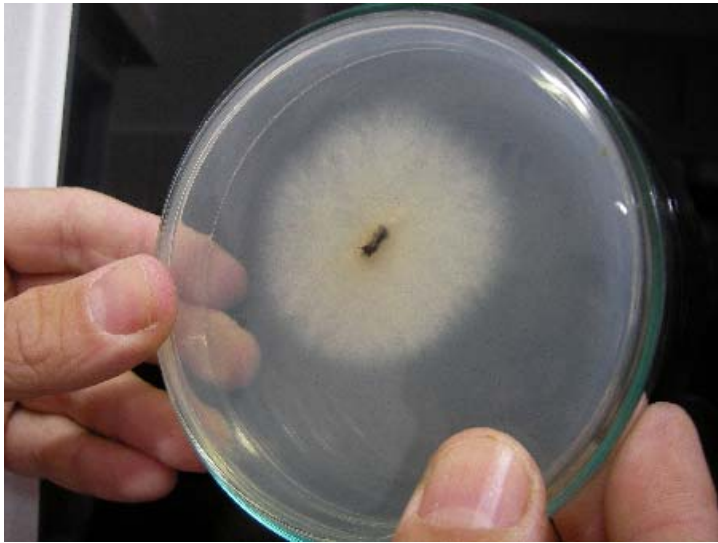
lezyonlu iken, lezyon görölme sıklığı Ekim ayında azalmış, su sıcaklığının daha da düşmesi ile Kasım ve Aralık aylarında ise lezyonlu kerevite rastlanmamıştır.

Makroskopik bakıda lezyonlu kerevitlerin taşınma sırasında semptom göstermeyenlere oranla daha çabuk öldükleri gözlenmiştir.

3.2. Mikrobiyolojik Bulgular

Özellikle lezyonlu bölgelerden yapılan ekimlerde 3. günde agar yüzeyinde yaklaşık 4-5 cm çapında mantar üremesi gözlenmiştir. Kolonilerin çoğunluğunun beyaz ya da gri renkte olduğu saptanmıştır. Petrinin arka yüzünden bakıldığında hakim olan renk grimtrak-sarıdır. Genç, aktif olarak büyüyen hifaların daha az sayıda spora sahip olduğu, yaşlı hifaların ise siyah renkte yaygın sporulasyon gösterdiği gözlenmiştir. Petri kutularına yapılan doku plantasyonunu takiben petrinin tüm yüzeyi yaklaşık 5 günde tamamen kolonize olmuştur. Büyüme 22 ° C'de optimal iken 26 ° C' de üreme gerçekleşmiştir. Çalışmada bakteriyel kontaminasyona bir kaç ekim dışında rastlanmamıştır.

Resim 3.2.1. IM agar ortamında direkt kerevit dokusundan yapılan ekimde üreyen 48 saatlik mantar kolonisi. İznik Gölü, Ağustos 2007



Resim 3.2.2. IM agar ortamında 48 saatlik subkültürden üreyen mantar kolonisinin petrinin arka yüzündeki görüntüsü. Egirdir Gölü, Ağustos 2007.



Resim 3.2.3. IM agar ortamında 48 saatlik subkültürden mantar kolonisi. İznik Gölü, Ağustos 2007.



Resim 3.2.4. Subkültürün 10. günü. Petriyi tamamen sarmış spor kümeleri ile kaplı mantar kolonisi. Eğirdir Gölü, Ağustos 2007.



Resim 3.2.5. Subkültürün 10. günü. Petriyi tamamen sarmış spor kümeleri ile kaplı mantar kolonisi. İznik Gölü, Ağustos 2007.



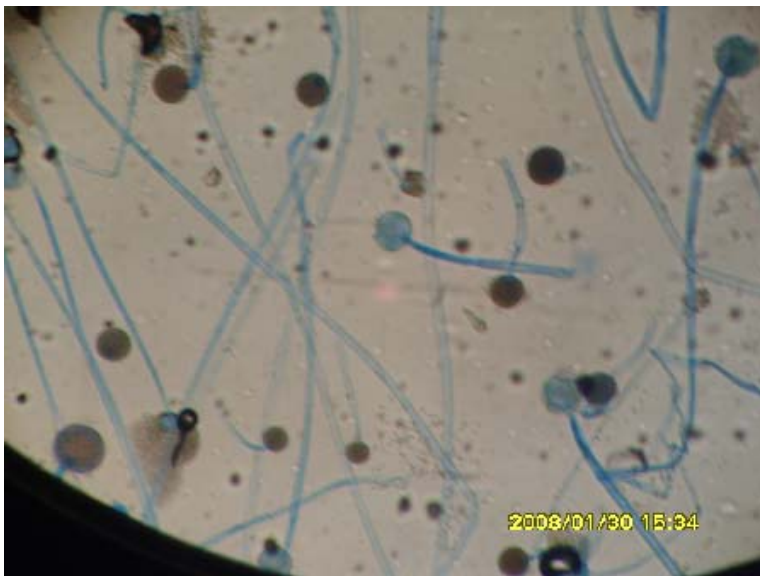
10. günden sonra mantar üremesinin bütün petriyi kapladığı görüldü. Lezyon göstermeyen kerevitlerin bazılarında abdominal bölgeden yapılan ekimlerde de üremeler

şekillendi. Saboraud Dekstroz Agar (SDA)'da üreme olmadı. Ancak Patetes Dekstroz agara yapılan subkültürlerde üreme IM agar ortamındaki benzer görünümde gerçekleşmiştir. Üreyen mantar kolonileri mikroskopik bakıda septasız, sporangia yapılarına sahip mantar miselleri şeklinde gözlenmiş olup, sporangiaların bazıları siyah spora sahiptir. Sporlanma yaşlı kolonilerde artmaktadır. Bu görüntüler lezyonlu bölgelerden yapılan smearlardan alınan görüntüler ile uyum göstermektedir.

Resim 3.2.6. Subkültürden Saboraud Dekstroz Agar (SDA)' a yapılan ekim. 10 gün sonrası ve üreme yok.



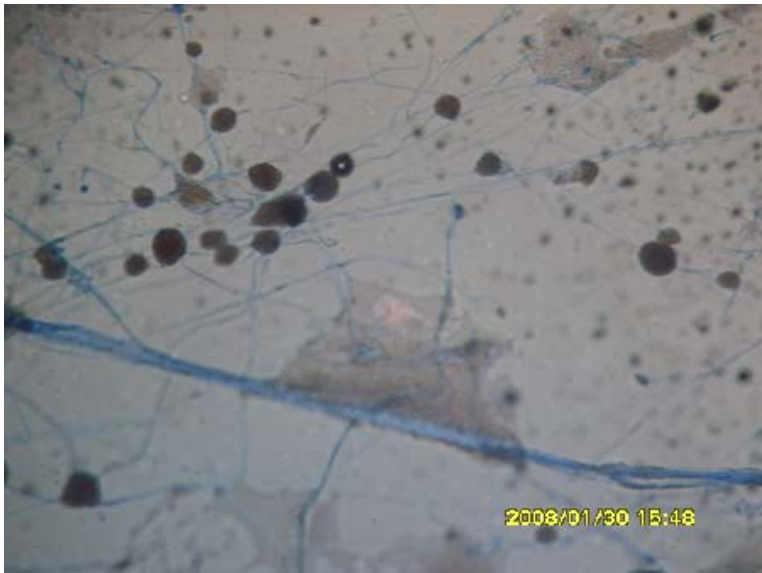
Resim 3.2.7. 48 saatlik subkültürden laktofenol pamuk mavisi ile yapılan boyama. Septasız, sporangia yapılarına sahip mantar hifaları. İznik Gölü, Temmuz 2007



Resim 3.2.8. 48 saatlik subkültürden laktofenol pamuk mavisi ile yapılan boyama. Septasız, sporangia yapılarına sahip mantar hifaları. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007



Resim 3.2.9. 10 günlük subkültürden laktofenol pamuk mavisi ile yapılan boyama. Septasız, sporangia yapılarına sahip mantar hifaları ve ileri sporulasyon. Eğirdir Gölü, Temmuz 2007



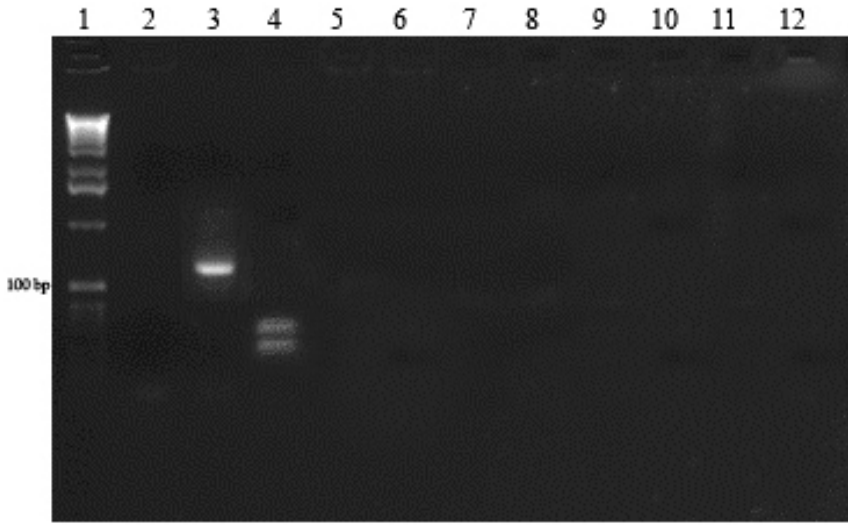
Resim 3.2.10. Standart *A. astaci* suşunun IM agar ortamındaki görüntüsü



3.3. PZR Bulguları

PZR yöntemi, öncelikle *A. astaci* standart suşu kullanılarak optimize edildi. Kerevitlerden elde edilen 56 mantar izolatu optimize edilen bu yöntem ile *A. astaci* yönünden incelendi. Standart *A. astaci* suşu pozitif kontrol, distile su negatif kontrol alındı ve saha izolatları ile birlikte jelde yürütüldü. Standart suşta restriksiyon enzimi öncesi 115 bp, restriksiyon enzimi sonrası 55 ve 60 bp'lık bant aralığı oluşurken saha suşlarında bant oluşumu gözlenmedi.

Resim 3.3.1. PZR uygulamasının jel elektroforez görüntüsü



1. Marker (100 bp), 2. Negatif Kontrol (steril distile su), 3. Standart *Aphanomyces astaci* amplifikasyon ürünü (115 bp), 4. Standart *A. astaci* suşuna ait restriksiyon ürünü (55-60 bp). 5-12. Saha suşları amplifikasyon ürünleri.

4. TARTIŞMA

Türk kereviti olarak bilinen *Astacus leptodactylus* iç sularımızda ekonomik değeri oldukça yüksek olan bir su canlısı olup, Anadolu'nun birçok göl, baraj gölü ve akarsularında doğal olarak bulunur (Harlıoğlu 1996). Kerevitler tatlısu kaynaklarının ekolojik dengelerinin korunmasında da anahtar roldeki canlılardır (Hogger 1988, Momot 1995, Nyström 2002).

Ülkemiz, 1980'lere kadar Avrupa ülkelerinin en önemli kerevit sağlayıcısı konumunda iken, ilk kez 1984 sonbaharında Denizli'nin Çivril gölünde gözlenen ve diğer göllerimize de yayılan kerevit vebasına bağlı olarak stoklar büyük miktarda tahrip olmuştur (Harlıoğlu 2004). Hastalık, O.I.E 'de tatlı su kabuklularının en önemli hastalıklarının dahil edildiği liste 1 hastalıkları kapsamında yer almakta olup, ülkemizde 1 Nisan 2004 tarihinden itibaren ihbarı mecburi hastalıklar listesinde yer almaktadır.

Amerika kıtası dışında dünyanın kerevit popülasyonuna sahip bir çok ülkesinde kerevit vebasının bu popülasyonu tehdit eden en önemli sorun olduğu bildirilmiştir (Hastein ve Gladhaug 1973, Matthews ve Reynolds 1990, Oidtmann ve ark. 1999, O.I.E 2003). Türkiye'de ise hastalık farklı araştırmacılar tarafından değişik yıllarda konvansiyonel yöntemler kullanarak teşhis edilmiştir (Baran ve Soylu 1989, Köksal 1988, Timur 1990, Yavuzcan 2002). Hastalığın dünyada en son 2008 yılında Çek Cumhuriyeti'nde gözlenmesi (Kozubíková ve ark 2008) ise yeni bir salgının her an ortaya çıkabileceği olasılığını canlı tutmaktadır.

Konu ile ilgili yapılması gerekenlerin başında hastalığın taşıyıcısı konumundaki Amerikan kerevitlerinin ülkeler arası dolaşımını kontrol altında tutmak ve hastalığın tabiatını çok iyi bilmek gelmektedir. Hastalığın ülkemize sıçradığı bir durumda hastalık kısa sürede teşhis edilmeli ve gereken önlemler en hızlı şekilde alınmalıdır. Bu da konu ile

ilgili yeterli bilgi birikiminin bulunması ve ileri tanı yöntemlerinin kullanılması ile daha mümkün bir hale gelebilir. Araştırmanın başlıca hedefleri bu deneyim ve donanıma sahip olabilmek ve hastalığın İznik ve Eğirdir göllerindeki son durumu hakkında bilgi sahibi olmaktır.

Çivril gölündeki ilk salgında gölden toplanan kerevitlerde üçte bire yakın oranda karın bölgelerinde kahverengi melanize sahalar taşıyan bireyler bulunduğu, ayrıca kerevitlerde koordinasyon bozukluğu ve paraliz semptomlarına rastlandığı bildirilmiştir (Baran ve Soylu 1989). Bu çalışmada ise kerevitlerde koordinasyon bozukluğu ve paraliz semptomlarına rastlanmamıştır. Ancak özellikle yaz aylarında kerevit avlamak amacıyla göle atılan her pinterden üçte bire yakın oranda karın bölgelerinde kahverengi melanize alanlar taşıyan kerevite rastlanmış olması ile ilgili literatüre benzerlik göstermektedir.

Çalışmada gözlenen klinik semptomlar; tatlısu ıstakozlarında hastalık semptomu olarak bulunduğu kaydedilen melanize alanlar, kaslarda fokal beyazımsı renk değişikliği ve eksremite kaybı gibi olgular bakımından kerevit vebasası ile ilgili önceki bildirimlerle uyumludur (Unestam ve Weiss 1970, Cerenius ve Söderhäll 1984, Alderman ve Polglase 1986, Baran ve Soylu 1989, Yavuzcan 2002). Ancak yine bu bildirimlerde anlatılan koordinasyon bozukluğu, suyu terk etme ve paraliz olgularına rastlanmamıştır.

Semptomların melanize alanlarla sınırlı kalması, hastalığın gözle görülür bir mortaliteye sahip olmaması, O.I.E'nin genel olarak bildirdiği hastalığın klinik bulgularıyla uyum göstermemekte, ancak *A. leptodactylus* türünün kerevit vebasasına karşı Avrupa tatlı su ıstakozlarına göre daha dirençli olabileceğine yönelik bulgulara (Oidtmann ve ark 1999) ve de hastalığın duyarlı bazı kerevit türlerinde kronik seyrettiğine yönelik çalışmalara uyum sağlamaktadır (Anonim 1 2008).

A. astaci'nin üreme özellikleri ve hifa yapısı ile ilgili bulgularımız diğer araştırmacılar tarafından belirtilen (Unestam ve Weiss 1970, Alderman ve Polglase 1986, Alderman ve ark 1987, Jones ve Buller 2001) *A. astaci*'nin ayırıcı tanı kriterlerine uyum göstermemektedir. Kerevit dokusundan yapılan ilk ekimlerde pozitif olgularda üreme 48 saat içerisinde gerçekleştiği halde *A. astaci* için bildirilen süre daha uzundur (O.I.E 2003).

Kerevitlerin lezyonlu bölgelerinden ve kültürden yapılan boyamalar birbiri ile uyum gösterdiği halde *A. astaci* ile karşılaştırıldığında benzerlik kısıtlı düzeydedir.

Yavuzcan (2002), yaptığı araştırmada bakteriyel kontaminasyonun izolasyonda en büyük sorunlardan biri olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada ise I.M agar ortamı (Oxolinic acid ve Penicillin ihtiva eden) kullanılmış ve birkaç ekim dışında bakteriyel kontaminasyona rastlanmamıştır.

Temmuz ayından başlanarak yapılan kontrollerde tatlı su ıstakozlarından *A. astaci* şüpheli mantar izolatları sayısı aydan aya azalma göstermiştir. Ekim ayında çok az izolasyon yapılabilmiş olup, Kasım ve Aralık aylarında her iki gölden de şüpheli mantar izolatu elde edilememiştir. Bu, su sıcaklığının düşmesi ile ilişkilendirilmekte olup, bu bilgi, *A. astaci*'nin ve kerevitlerin diğer mikotik infeksiyonlarının hastalık oluşturma periyotları ile ilgili verilerle uyum göstermektedir. (Alderman ve Polglase 1986, Alderman, Polglase ve Frayling 1987, Diéguez -Uribeondo ve ark 1994, O.I.E 2003).

Araştırma bulgularında yer alan hastalığın klinik seyri, etkenin besi yerinde üreme süresi, üreme özellikleri, hifa ve sporlarının mikroskopik görüntüsü, kerevitlerde kronik infeksiyon oluşturan *Saprolegnia* ve *Achlya* türleri ile ilgili çalışmalarla uyum göstermektedir (Diequez- Uribeondo ve ark 1994).

SONUÇ

Bu çalışmada Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım ve Aralık 2007 aylarında 6 kez İznik, 6 kez de Eğirdir göllerine gidilerek; 180 adet (30 adet x 6 ay) İznik, 180 adet (30 adet x 6 ay) Eğirdir göllerinden olmak üzere 360 adet canlı tatlısu ıstakozu incelenmiştir. Bunlardan 27 tanesi İznik, 25 tanesi Eğirdir olmak üzere toplam 52 tanesi lezyonlu örneklerdir. Eldeki örneklerden lezyonlu alanlar başta olmak üzere yumuşak abdominal kütikula, kuyruk dokusu, peri anal bölge kütikulası, sırt kabuğu ile kuyruk arasındaki kütikula, yürüyüş ayakları ve solungaçlarından IM agar ortamına ekimler yapılmış, 22 °C'de inkubasyona bırakılmış ve ortalama 2-3 gün içinde özellikle lezyonlu alanlardan yapılan ekimlerde mantar üremesi gerçekleşmiştir. Makroskopik lezyon göstermeyen 3 kerevit numunesinin ekiminde de benzer üremeler gözlenmiştir. Sonuç olarak İznik gölünden yapılan ekimlerde 30 adet, Eğirdir gölünden yapılan ekimlerde 26 adet *A. astaci* şüpheli mantar üremesi saptanmıştır. Bu üremelerin *A. astaci* olup olmadığı konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Her iki yöntemle de iki göldeki kerevitlerde *A. astaci*'ye benzer şekilde lezyon oluşturan enfeksiyonun *A. astaci*'den kaynaklanmadığı anlaşılmıştır.

ÖZET

Kerevit Vebasının İleri Tanı Yöntemleri ile Araştırılması.

Bu çalışmada, *A. astaci*'nin varlığının araştırılması amacıyla İznik ve Eğirdir göllerinden her ay 30 ar olmak üzere Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım ve Aralık aylarında, İznik gölünden 180, Eğirdir gölünden 180 kerevit rasgele örnekleme yöntemi ile alındı.

Araştırmada kullanılan 360 canlı kerevit numunesinden 56 adet *A. astaci* şüpheli mantar izole edildi. İznik gölünden 180 adet örneğin 30 (%16.6)'undan, Eğirdir gölünden ise 180 adet örneğin 26 (% 14.4)'sından olmak üzere kullanılan 360 canlı kerevit örneğinin 56'sından *A. astaci* şüpheli mantar izole edildi.

Şüpheli izolatların konvensiyonel ve moleküler yöntemlerle incelemesinde mantar izolatlarının *A. astaci* olmadığı anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: *Aphanomyces astaci*, izolasyon, identifikasyon, PZR.

SUMMARY

Investigation of Crayfish Plague by Advanced Diagnostic Techniques.

At this work, for investigation of the existence of *Aphanomyces astaci*, at July, August, September, October, November, December in 2007, 180 crayfish from İznik and 180 crayfish from Eğirdir lakes, a total of 360 crayfish was collected by random sampling.

56 *A.astaci* suspected fungal isolates were obtained from 360 live crayfish samples used in this work. 30 of the 180 samples from the Iznik Lake (%16.6) and 26 of the 180 from the Egridir lake (% 14.4) were suspected *A.astaci* fungal isolates.

With the conventional and molecular examinations of the suspected isolates, these fungal isolates were found not to be *A.astaci*.

Key words: *Aphanomyces astaci*, isolation, identification, PCR

KAYNAKLAR

Alderman DJ, Polglase JL (1986) *Aphanomyces astaci: isolation and culture*, Journal of Fish Diseases, 9: 367-379.

Alderman DJ, Polglase JL, Frayling M (1987) *Aphanomyces astaci pathogenicity under laboratory and field conditions*. Journal Fish Diseases, 10: 385-393.

Anonim 1 *Aphanomyces astaci* www.nobanis.org/search.asp.
Erişim tarihi: 06.06.2008

Anonim 2 *Crayfish*.
<http://images.google.com.tr/imgres?imgurl=http://magickcanoe.com/crayfish/crayfish-w-eggs-large.jpg&imgrefurl=http://ma>
Erişim tarihi: 04.04.2008

Bangyeekhun E, Cerenius L, Söderhäll K (2001) *Molecular cloning and characterization of two serine proteinase of Aphanomyces astaci*. Journal of Invertebrate Pathology, 9: 212-218.

Baran I, Soylu E (1989) *Crayfish plague in Turkey*. Journal of Fish Diseases, 12: 193-197.

Bubb DH, Thom TJ, Lucas MC (2004) *Movement and dispersal of the invasive Pacifastacus leniusculus in upland rivers*. Freshwater Biology, 49: 357-368.

Cerenius L, Söderhäll K (1984) *Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in Aphanomyces astaci*. Experimental Mycology, 8:370-377.

Cerenius L, Söderhäll K, Persson M, Ajaxon, R (1988) *The crayfish plague fungus Aphanomyces astaci –diagnosis, isolation, and pathobiology*. Freshwater Crayfis, 7: 131-144.

CEFAS (2007) [News Releases 2007](#) Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (Cefas) Weymouth, Dorset. England.

Devlet Planlama Teşkilatı (1989) *İhraç edilen kerevit miktarları*, DPT. Ankara

Devlet Planlama Teşkilatı (2002) *Balıkçılık istatistikleri*, DPT. Ankara.

Diéguez-Uribeondo J, Cerenius L, Söderhall K (1994) *Saprolegnia paracitica and it's virulance on there different species of crayfish aquaculture*. Aquaculture, Netharland. 120: 219-228

Diéguez-Uribeondo J, Temiño C, Muzquiz J (1997) *The crayfish plague fungus (Aphanomyces astaci) in Spain*. Bull Fr Peche Piscic, 347: 753-763.

Häll L, Unestam T (1980) *The effect of fungicides on survival of the crayfish plague fungus, Aphanomyces astaci*. Institute of Physiological Botany, University of Uppsala, Box 540, S-751 21 Uppsala, Sweden.

Harhoğlu MM (1996) *Comparative biology of the signal crayfish, Pacifastacus leniusculus (Dana), and thenarrow-clawed crayfish, Astacus leptodactylus Eschscholtz*. Unpublished Ph.D. thesis, University of Nottingham.

Harhoğlu MM, Holdich DM (2001) *Meat yields in the introduced crayfish, Pacifastacus leniusculus and Astacus leptodactylus, from British waters*. Aquaculture Research, 32: 411-417.

Harhoğlu MM (2004) *The present situation of freshwater crayfish, Astacus leptodactylus (Eschscholtz,1823) in Turkey*. Aquaculture Research, 230: 181-187.

Harhoğlu MM, Yonar SM (2007) *Yabancı tatlı su istakoz türlerinin Türkiye'ye stoklanmasının meydana getirebileceği muhtemel sonuçlar*. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 24: 213-128.

Hastein T, Gladhaug O (1973) *The present status of crayfish- plague in Norway freshwater crayfish*. Freshwater Crayfish, 2: 273-275.

Hessen DO, Kristiansen G, Skurdal J (1993) *Nutrient release from crayfish and its potential impact on primary production in lakes, freshwater crayfish*. University of Southwestrn Louisiana. USA 9: 311-317.

Hogger JB (1988) *Ecology, population biology and behaviour, freshwater crayfish: Biology, management and exploitation* (Eds. Holdich, D.M.; Lowery, R.S.), Chapman & Hall, London, 114-144.

Holdich DM, Rogers WD, Reynolds JD (1999) *In: Crayfish in Europe as alien species*. A.A. Balkema, Rotterdam and Brookfield, 221–235.

Huner JV (1994) *Freshwater crayfish aquaculture in North America, Europe, and Australia: Families Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae*, Food Products Press, New York, USA, 312s.

Jones B, Buller N (2001) *Australian standard diagnostic techniques for aquatic animal health*. Fisheries and Animal Health laboratory.

Kozubíková E, Petrušek A, Ďuriš Z, Martín MP, Diéguez-Uribeondo J, Oidtman B (2008) *The old menace is back: Recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic*, Charles University in Prague, Faculty of Science.

Köksal G (1988) *Astacus leptodactylus in Europe. In: Freshwater crayfish: Biology, management and exploitation* (eds D.M. Holdich and R.S. Lowery), Croom Helm, London and Timber Press, Oregon, 365-400.

Kuşat M, Bolat Y (1995) *Eğirdir Gölü (Türkiye) tatlı su istakozu (Astacus leptodactylus salinus, Eschscholtz 1823)'nun boy ağırlık dağılışı ve kerevit vebası hastalığının incelenmesi*. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 12: 69-74.

Lowery RS, Holdich DM (1988) *Pacifastacus leniusculus in North America and Europe, with details of the distribution of introduced and native crayfish species in Europe*. *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation* (Eds. Holdich, D. M.; Lowery, R. S.), Croom Helm, 283-308.

Matthews M, Reynolds JD (1990) *Laboratory investigations of the pathogenicity of Aphanomyces astaci for Irish freshwater crayfish*. *Hydrobiologia*, 203: 121-126.

Matthews M, Reynolds JD (1992) *Ecological impact of crayfish plague in Ireland*, *Hydrobiologia*, 234: 1-6.

Momot WT (1995) *Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems*, *Reviews in Fisheries Science*, 3: 33-6

Nyström P, Strand JA (1996) *Grazing by a native and an exotic crayfish on aquatic macrophytes*, *Freshwater Biology*, 36: 673-682.

Nyström P (2002) *Ecology. Biology of Freshwater Crayfish* (Ed. Holdich, D.M.), Blackwell Scientific, Oxford, 192-235.

Office International des Epizooties-OIE. (2003). *International Aquatic Animal Health Code*. OIE, Paris.

Oidtmann B, Cerenius L, Schmid I, Hoffmann R, Söderhäll K (1999) *Crayfish plague epizootics in Germany-classification of two German isolates of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* by random amplification of polymorphic DNA*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35: 235-238.

Oidtmann B, Heitz E, Rogers D, Hoffman RW (2002) *Transmission of crayfish plague*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52: 159-167.

Oidtmann B, Schaefer N, Cerenius I, Söderhäll K, Hoffmann RW (2004) *Detection of genomic DNA of the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* (Oomycete) in clinical samples by PCR*. *Veterinary Microbiology*, 100: 269-282.

Persson M, Söderhäll K (1983) **Pacifastacus leniusculus* and its resistance to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci**. *Freshwater crayfish*, 5: 292-298.

Persson M, Söderhäll K (1987) *The influence of haemocyte number on the resistance in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci**, *Journal of Fish Diseases*, 10: 205-213.

Rahe R, Soylu E (1989) *Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*)*, *Journal of Invertebral. Pathology*, 54: 10-15.

Rantamaki J, Cerenius L, Söderhäll K (1992) *Prevention of transmission of the crayfish plague fungus (*Aphanomyces astaci*) to the freshwater crayfish *Astacus astacus* by treatment with $MgCl_2$* . *Aquaculture*, 104: 11-18.

Sağlamtimur B (2007) *Türkiye'nin iç su alanlarında kerevitin önemi ve gelecekte kerevit stoklarını bekleyen tehditler*. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, 3-5: 57-63.

Timur G (1990). *Crayfish plague in some lakes of Turkey* Bull Eur Ass Fish Pathol, 10: 100-103.

Thompson A (1990) *Plague- some lessons to be learned*, Fish Farmer, 13: 54-56.

Unestam T, Weiss DW (1970) *The host parasite relationship between freshwater crayfish and the freshwater crayfish disease fungus, Aphanomyces astaci*. Journal General Microbiology, 60: 77-90

Wallace JB, Eggert SL, Meyer JL, Webster JR (1997) *Multiple trophic levels of a forest stream linked to terrestrial litter inputs*, Science, 277: 102-104.

Westman K, Westman P (1992) *Present status of crayfish management in Europe, Report from the EIFAC Workshop on Crayfish Management and Stocking*, Kuopio, Finland. Finnish Marine Research, 14:1-22.

Yavuzcan YH (2002) *Tatlısu istakozlarında (Astacus leptodactylus Esch.) Aphanomyces astaci patojenitesinin belirlenmesi, haemolymph kalsiyumu ile su sertliğinin A. astaci patojenitesine etkisi*. A.Ü. Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Proje No: 2001-0711034.

Zhang Y, Negishi JN, Richardson JS, Kolodziejczyk R (2003) *Impact of marine-derived nutrients on stream ecosystem functioning*, Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 270: 2117-2123.

Zhang Y, Richardson JS, Negishi JN (2004) *Detritus processing, ecosystem engineering and benthic diversity: a test of predator-omnivore interference*, Ecology Journal of Animal, 73: 756-766.

ÖZGEÇMİŞ

1 Nisan 1979'da Uşak'ta doğdum. 1996 yılında Samsun Veteriner Sağlık Meslek Lisesini ve 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesini bitirdim. Hakkari Yüksekova'da yedek subay olarak askerliğimi yaptıktan sonra Veteriner Hekim olarak Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Kars ve Afyon Tarım İl Müdürlüklerinde çalıştım. 2004 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora başladım. 2005 yılında Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne tayin oldum. Hala aynı kurumda veteriner hekim olarak görev yapmaktayım. Şu anda Enstitü'nün Avrupa Birliği Ulusal Balık Hastalıkları Referans Laboratuvarında çalışmaktayım.

TEŞEKKÜR

Çalışma esnasında her anlamda desteklerini benden esirgemeyen başta Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı danışmanım sayın Prof. Dr. Osman Kaya olmak üzere, Yrd. Doç. Dr. Süheyla Türkyılmaz ve diğer Anabilim Dalı öğretim üyelerine; Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden Enstitü Müdürü sayın Necdet Akkoca, Enstitü İdari Müdür Yardımcısı sayın Hasan Aktar ve Enstitü Teknik Müdür Yardımcısı sayın Dr. Ayşen Beyazıt ile birlikte, Dr. Öznur Yazıcıoğlu, Dr. Seza Eskiizmirliler, Dr. Olcay Türe Göksu, Dr. Şerife İnçoğlu, Dr. Gülnur Kalaycı, Dr. Fethiye Çöven ve Bakteriyel Balık Hastalıkları Laboratuvarı şefi Uzman Veteriner Hekim Necla Türk'e; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Tijen Özacar, Doç. Dr. Cengiz Çavuşoğlu, Doç. Dr. Süleyha Hilmi Polat ve diğer Anabilim Dalı öğretim görevlilerine, ayrıca mesai arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ve şükranlarımı sunarım.