

Sinop ilindeki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonu

Isolation and characterization of *Vibrio* spp. from anchovy and garfish in the Sinop province

Cumhur AVŞAR¹, İsmet BERBER¹, Ahmet Kenan YILDIRIM¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Sinop ilindeki balıkçılardan temin edilen hamsi ve zargana balık örneklerinden izole edilen *Vibrio* türlerinin karakterizasyonu ile bu izolatların antibiyotik dirençlilikleri, plazmid DNA ve SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezis) toplam hücre protein profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Balık örnekleri taze olarak alınmış, buz üzerinde korunarak laboratuvara getirilmiş ve hemen analize alınmıştır. Balık örnekleri 25 g tartılarak zenginleştirme amacıyla %3 NaCl içeren steril alkali peptonlu su (225 mL) besiyerine ilave edilmiş ve 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası Tiyosülfat Sitrat Safra Sükroz (TCBS) agar besiyerinde gelişen sarı, yeşil veya mavi-yeşil koloniler Tripton Soya Agar (TSA) besiyerine ekilmiş ve izolatların daha sonraki tanımlaması için bir gece süreyle inkübe edilmiştir. İzolatlar morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere göre tanımlanmıştır. Bunlara ek olarak izolatların yedi farklı antibiyotiğe karşı dirençliliği disk-difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca, izolatların SDS-PAGE hücre protein ve plazmid DNA profilleri de çıkarılmıştır.

Bulgular: Toplam 44 adet balık örneği *Vibrio* türlerinin belirlenmesine yönelik çalışılmış ve morfolojik, biyokimyasal özellikleri yönünden incelenmiştir. İnceleme sonucunda; 12 adet *Vibrio* spp. belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: In this study it was aimed to characterize the *Vibrio* species isolated from anchovy and garfish samples obtained from fishermen and to determine the antibiotic resistances, plasmid DNA and SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) whole cell protein profiles of these isolates.

Method: The fish samples were taken as fresh, kept in ice during transport to the laboratory and immediately taken for analysis. The fish samples weighed as 25 grams were added into 225 mL of sterile alkaline peptone water supplemented with 3% NaCl broth for enrichment purpose and incubated at 37 °C for 18 to 24 hours. After incubation, yellow, green or blue-green colonies growing on Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar were subcultured on Triptone Soya Agar (TSA) and incubated overnight for further identification of the isolates. The isolates were identified according to morphological, physiological and biochemical tests. Moreover, the resistances against seven different antibiotics of isolates were determined by disk-diffusion method. In addition, the SDS-PAGE cell protein and plasmid DNA profiles of isolates were determined.

Results: Totally 44 fish samples were tested for determining *Vibrio* species and were analyzed according to their morphological, biochemical

* Bu çalışma; 6. Ekoloji Sempozyumu'nda (6-9 Mayıs 2015, Sinop-TÜRKİYE) poster bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SİNOP



İletişim / Corresponding Author : Cumhur AVŞAR

Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, SİNOP

Tel : +90 538 453 36 39

E-posta / E-mail : cumhur.avsar@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.08.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 04.01.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2016.58815

Avşar C, Berber İ, Yıldırım AK. Sinop ilinde ki hamsi ve zargana balıklarından *Vibrio* spp. izolasyonu ve karakterizasyonu. Türk Hij Den Biyol Derg, 2016; 73(2): 121-30.

izolatların, seftazidime %66,6, gentamisine %25, tetrasikline %16,6, seftiazona %91,6, amikasine %16,6, ofloksine %25 ve penisilin G'ye %58,3 oranında antibiyotik dirençlikleri saptanmıştır. Ayrıca, test edilen izolatların MARI (Çoklu Antibiyotik Dirençlilik İndeks) değeri 0,41 oranında bulunmuştur. *Vibrio* spp. izolatlarının SDS-PAGE toplam hücre protein profillerine göre oluşturulan nümerik analiz %80 ve üzerinde benzerlik seviyesinde iki temel küme oluşturmuştur. *Vibrio* spp. izolatların tümünde 1-4 plazmid DNA (1590 - 27000 bp aralığında) tespit edilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, balıklar yakalandıktan sonra yeterince dondurularak, pişirilerek ve uygun şartlarda depolanarak; ayrıca paketlenme esnasında çapraz bulaşlara engel olunarak mikrobiyal enfeksiyonların önlenilebileceğini söylemek mümkündür. Ayrıca, bakterilerden dolayı kıyı sularında meydana gelen bulaşlar, deniz suyu kaynaklarının kalitesinde düşümlere ve bu yolla da insan sağlığında riske ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Çalışmamız, sağlık için potansiyel risk olabilen ve balıklardan izole edilebilen, antibiyotiklere dirençli *Vibrio* spp. suşlarının varlığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vibrio*, balık, SDS-PAGE, plazmid, antibiyogram

properties. At the end of the analysis; 12 *Vibrio* species were determined. The isolates were resistant against to ceftazidime 66.6%, gentamisine 25%, tetracycline 16.6%, ceftriaxone 91.6%, amikacine 16.6%, ofloxacin 25% and penicillin G 58.3%. In addition, The MARI (Multiple Antibiotic Resistance Index) values of tested strains were found at the rate of 0.41. The numerical analysis of SDS-PAGE whole-cell protein profiles of *Vibrio* spp. isolates revealed two major clusters at similarity levels of 80% and above. The 1-4 plasmide (range 1590 - 27000 bp) in all of the isolates were determined.

Conclusion: As a result, it is possible to say that microbial infections can be prevented by adequate freezing and cooking, proper storage and processing after harvesting and avoidance of cross-contamination during fish handling. In addition, the coastal contamination due to bacteria leads to decline in the quality of seawater resources and so leads to risks to human health and economic losses. Furthermore, our study indicated that the presence of antibiotic resistant *Vibrio* spp. strains isolated from fishes might be potential risk for health.

Key Words: *Vibrio*, fish, SDS-PAGE, plasmide, antibiogram

GİRİŞ

Bakteriler; toprak, hava, su, hayvan ve bitki yüzeylerinde bulunurlar. Bazıları hastalık etkeni olmakla beraber çoğu zararsız ve organik atıkların geri dönüşümü sırasındaki yararlı etkileri ve birçok faydalı ürünü üretmeleri nedeniyle biyoteknolojide oldukça önemli bir yere sahiptirler. *Vibrio* cinsi; virgül veya kıvrık şekilli, Gram negatif, kamçılı, endospor oluşturmayan, kapsülsüz, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif formlar, tek başına veya koloni şeklinde görülürler (1). Bu cinsin hücre büyüklüğü yaklaşık 1-4 µ boyunda ve 0,3-0,6 µ enindedir. Genellikle 22 °C ile 40 °C arası ideal büyüme sıcaklıklarıdır. Bu cinsin

üyeleri, karbon ve azot kaynağı olarak mineral tuzları ve asparajin içeren besi-yerlerinde gelişme gösterirler (2). *Vibrio* türlerinin spor ve kapsülü olmadığından yeryüzünde farklı çevrelerde dağılım göstermemektedirler. *Vibrio* cinsinin asıl habitatu tatlı su, asidik su, tuzlu su ve bu sularda yaşayan organizmalardır (3). *Vibrio* türleri neredeyse tüm antimikrobiyal ilaçlara karşı yüksek duyarlılığa sahip olarak nitelendirilmişlerdir. Son on yıldır; insan, tarım alanı ve su ürünleri yetiştiriciliği aracılığıyla antimikrobiallerin aşırı kullanılmasından dolayı çoğu bakteri cinsinde antibiyotik dirençliliği ortaya çıkmış ve zamanla değişim göstermiştir (4).

Bu bakteri türleri, insanlarda ve hayvanlarda zorunlupatojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler (5). Bulaş olmuş içme suyu ve gıdalarla bulaşan ve şiddetli diyarenin etkeni olan *Vibrio cholerae*'da bu grubun üyesidir. Ayrıca *V. parahaemolyticus* ve *V. fluvialis*, akut gastroenteritin sebepleridir. Bunların dışında, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, ve *V. damsela*; yara enfeksiyonları, septisemi, menenjit gibi ekstraintestinal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Yapılan araştırmalar, *Vibrio* spp. ile meydana gelen yara enfeksiyonlarının sebebinin, hastaların tuzlu ve hafif tuzlu su ile temas ettiğinde oluştuğunu göstermiştir (6). İnsanlarda genellikle barsak hastalığı bulaşı; su, kabuklu deniz hayvanları veya diğer deniz ürünlerinin tüketimi ile ilişkilendirilmiştir (7).

Sinop İlinde yıl boyunca balık; turizme açık bir yer olması nedeniyle yazın ayrıca midye çok tüketilmektedir. Şehir merkezinin yarım ada şeklinde denize kıyısının olması nedeniyle atıkların direkt denize ulaştığı ve su ürünlerinin mikrobiyal kirliliğe maruz kaldığı bilinmektedir. Tüm bu durumlar göz önüne alınarak bu çalışmada, Sinop İli'nde satışa sunulan hamsi ve zargana balık örneklerinden; *Vibrio* spp. biyokimyasal testlerle karakterize edilmesi, toplam hücre protein profillerinin SDS-PAGE ile karşılaştırılması, antibiyotik dirençliliklerinin tespit edilmesi ve ayrıca plazmid DNA profillerinin çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Sinop ilinde gün içinde avlanan hamsi ve zargana balıkları Eylül 2014 - Ocak 2015 tarihleri arasında satıcılardan alınmış ve buz içerisinde laboratuvara getirilmiştir.

Bu çalışma, Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler-Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Laboratuvara getirilen toplam 44 balık örneğinin iç organları atılarak geriye kalan kısımları 25 gram olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bakterilerin izolasyonu

Balık örneklerini zenginleştirme amacıyla %3 NaCl içeren alkali peptonlu sıvı (225 mL) besiyerine ilave edilmiş ve stomacherde homojenize edilerek 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası zenginleştirme besiyerinden TCBS Agar besiyerine çizme ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda TCBS agar besiyerinde gelişen 2-3 mm çapında, yuvarlak, sarı, yeşil veya mavi-yeşil renkli koloniler şüpheli koloni olarak değerlendirilmiştir (2). Gram boyama sonrasında Gram negatif, düz veya kıvrık çomak şeklinde görülen kolonilere oksidaz testi yapılmış ve oksidaz pozitif sonuç veren şüpheli kolonilerden TSA besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası bu koloniler indol, Voges-Proskauer (VP), jelatinaz aktivite, sitrat, nitrat, üre, karbonhidrat fermentasyon testi ve %6 NaCl'de gelişebilmeleri incelenmiştir. TSA'dan alınan koloniden üç şekerli demir (Triple Sugar Iron-TSI) agar besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda biyokimyasal test sonuçları, laktoz, sükröz ve glikoz fermentasyonu, gaz ve hidrojen sülfür (H₂S) oluşumu değerlendirilmiştir (8).

Antibiyogram testi

İzolatların antibiyotik dirençlilik testleri disk difüzyon tekniğine göre yapılmıştır (9). Taze kültürlerden 5 mL Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyerinde 35 ± 2 °C'de 18 saat geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerden 0,5 McFarland skalası esas alınarak yaklaşık olarak 1-2 x 10⁸ kob/mL bakteri stok solüsyonları hazırlanmış ve Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerine 100 µL ekimleri yapılmıştır. Ekim sonrası penisilin (P- 10µg), gentamisin (Gen- 10 µg), seftazidim (Caz- 30 µg), tetrasiklin (Te- 30 µg), seftriazone (Cro- 30 µg), amikasin (Ak- 30 µg) ve ofloksasin (Ofx- 5 µg) antibiyotik

diskleri besiyerlerine yerleştirilmiş ve 18 saat 35 ± 2 °C'de geliştirildikten sonra oluşan inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülmüştür. Zon çapları değerlendirmesinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI) (10) tarafından Enterobacteriaceae grubu için belirtilen standartlar kullanılmıştır. Ayrıca izolatların test edilen antibiyotiklere karşı çoklu antibiyotik dirençlilik indeksleri (MARI) aşağıda gösterilmiş olan ve Sarter ve ark. (11) tarafından belirtilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$MARI = A / (B \times C)$$

A= Antibiyotiğe dirençli olanların toplam sayısı;

B= Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin toplam sayısı;

C= Test edilen izolatların toplam sayısı.

Toplam hücre proteinlerinin belirlenmesi

Toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonu için Laemmli (12)'nin SDS-PAGE yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aktifleştirilen *Vibrio* spp. izolatlarından beşer mL TSB besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kültürler 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edilmiş ve üst sıvı kısmı atılarak pelet üzerine 100 µL serum fizyolojik ilave edilerek üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası kalan pelet üzerine 20 µL örnek tamponu ilave edilmiş ve 80 °C'de 5 dk kaynatılarak çözümlü proteinler ekstrakte edilmiştir. Örnekler elektroforez yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Bakteri kültürlerinden ekstrakte edilen toplam hücre proteinleri, 1 mm kalınlığında dikey elektroforez tankında (Hofer SE400, USA) %4'lük toplayıcı jel boyunca 20 mA ile %10'luk ayırıcı jelde 30 mA'lık sabit akım uygulanmış ve comassie brillant mavi (R-250) boyası ile boyanarak belirlenmiştir. Yürütme işlemi toplayıcı ve ayırıcı jel proteinlerin

molekül ağırlıkları, marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas, SM0661) kullanılarak hesaplanmıştır.

Plazmid DNA izolasyonu

Plazmid DNA izolasyonu Sambrook ve ark. (13)'ünün yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Aktif *Vibrio* spp. kültürleri 10 000 rpm'de ve 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı kısmı atılarak pelet içerisinde 100 µL soğuk çözelti I (50 mM glikoz, 25 mM Tris-HCL - pH 8,0, 10 mM EDTA - pH 8,0) ile sulandırılıp karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra üzerine 200 µL çözelti II (%1 SDS, 0,2 N NaOH) ilave edilerek tüp birkaç defa alt üst edilerek ve iyice karışması sağlandıktan sonra 15 dk buzda bekletilmiştir. Süre bitiminde 10 000 rpm'de, 7 dk santrifüj işlemi yapılmış ve üst sıvı kısmı alınarak fenol: kloroform (1:1) eklenerek karıştırma işlemi yapılmıştır. Bu işlem, plazmid DNA'nın protein kalıntılarında arınması için iki kez yapılmıştır. 10 000 rpm'de, 5 dk santrifüj işlemi sonrası üst sıvı kısım üzerine iki katı kadar soğuk saf etil alkol ekleyerek buz içerisinde 15 dk bekletilmiştir. Süre bitiminden sonra 10 000 rpm'de, 10 dk santrifüj işlemi yapılmış ve pelet üzerindeki alkol tamamen uçurulduktan sonra %70'lik soğuk etil alkol ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra alkolün tamamen uzaklaşması sağlanmış ve 50 µL Tris-EDTA (TE) tamponu içerisinde çözülmüş ve analize kadar -20 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen plazmid örneklerin agaroz jel elektroforezi için %0,7'lik agaroz jeli (1X TBE (Tris Borat EDTA) tamponunda 5 µL etidyum bromid eklenerek hazırlanmıştır. Plazmid örnekleri agaroz jel kuyucuklarına konulduktan sonra jel elektroforez cihazında (Thermo Scientific-MS1509112955, UK) yürütme tamponu ile 80 voltluk sabit akımda ve yaklaşık 2,5-3 saat süre ile yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme işleminin bitiminde, jellerin fotoğrafları UV transillüminatörde (Cleaver-MicroDOC, UK) çekilmiştir.

Veri Analizi

Protein profillerinin istatistiksel analizinde; jeller, yüksek çözünürlükle bir tarayıcı (HP Scanjet, G2410) kullanılarak bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Ayrıca, plazmid DNA örneklerinin yürütüldüğü jellerin fotoğrafları UV transillüminatör (Cleaver-MicroDOC, UK) altında çekilip diğer işlemler için bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Her bir bandın molekül ağırlığı Total Lab 1D Manual R11.1, UK programı kullanılarak hesaplanmış ve jel görüntüleri programa yüklendikten sonra bantlar piksel pozisyonlarına göre belirlenmiştir.

Küme analizi için veriler Phoretix 1D-Pro (Totalab, UK) programı kullanarak Jaccard'ın benzerlik katsayısı temeline dayanan unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendrogram oluşturulmuştur.

BULGULAR

Çalışmamızda, Sinop ilindeki balık satıcılarından bir kg olacak şekilde alınan toplam 44 adet hamsi ve zargana balık örneklerinden *Vibrio* spp. taraması yapılmış ve toplam 12 örnekte izolasyon gerçekleştirilmiştir. Bakteri izole edilen balık örnekleri, toplandıkları zaman ve bakteri izolatlarına ait numara ve sembolleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

İzolasyonu yapılan ve olası *Vibrio* spp. izolatlarının doğrulamalarının yapılabilmesi için morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır (Tablo 2). İzolatların tümünün katalaz, oksidaz, nitrat kullanımı, jelatinaz aktivite, sitrat ve %6 NaCl'de gelişebilme testlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. İzolatların %58,3'ü için indol pozitif, tümü için ise üreaz, H₂S ve Voges-Proskauer testlerinin negatif oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca tüm izolatlar, glikozu fermente ederken, sakkarozu %66,6'sının, laktozu

%75'inin, mannozu %33,3'ünün ve arabinozu ise %25'inin kullanabildiği görülmüştür (Tablo 2).

Tablo 1. *Vibrio* spp. izolatlarının numaraları/sembolleri izole edildikleri balık isimleri ve balıkların temin edildikleri tarihler

<i>Vibrio</i> spp. İzolat Numarası	<i>Vibrio</i> spp. İzole Edilen Balık Sembolü	<i>Vibrio</i> spp. İzole Edilen Balık İsmi	Balık Örneklerin Alınma Tarihi
1	Z1	Zargana	14 Eylül 2014
2	Z2	Zargana	17 Eylül 2014
3	Z3	Zargana	4 Ekim 2014
4	Z4	Zargana	16 Ekim 2014
5	Z5	Zargana	26 Ekim 2014
6	Z6	Zargana	28 Ekim 2014
7	H1	Hamsi	21 Kasım 2014
8	H2	Hamsi	27 Kasım 2014
9	H3	Hamsi	6 Aralık 2014
10	H4	Hamsi	11 Aralık 2014
11	H5	Hamsi	28 Aralık 2014
12	H6	Hamsi	4 Ocak 2015

Yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre izolatların; seftazidime %66,6, gentamisine %25, tetrasikline %16,6, seftiazona %91,6, amikasine %16,6, ofloksine %25 ve penisilin G'ye %58,3 oranında direnç gösterdikleri saptanmıştır (Tablo 3). Ayrıca belirtilen kriterlere göre MARI değeri 0,2'den yüksek ise; aşırı antibiyotik vb. ilaçların kullanıldığı (yüksek risk) çevrelerden köken alan bakteriyel suşları, değerin 0,2'ye eşit veya daha düşük olması ilaç kullanımının nadir olduğu (düşük risk) çevresel örneklerden köken alan suşları göstermektedir. Çalışmamızda, MARI değeri 0,41 olarak yüksek risk sınıfında bulunmuştur.

Plazmid profiline göre tüm izolatlarda 1-4 plazmid (1.590-27.000 bp aralığında) görülmüştür. İzolatların tümünde 19.400 bp'lik plazmid bulunmakta olup bu durum plazmid profillerine göre izolatlar arasında yüksek benzerlik olduğunu göstermiştir (Şekil 1).

Tablo 2. *Vibrio* spp. izolatlarının numaraları/sembolleri, izole edildikleri balık isimleri ve balıkların temin edildiği tarihler

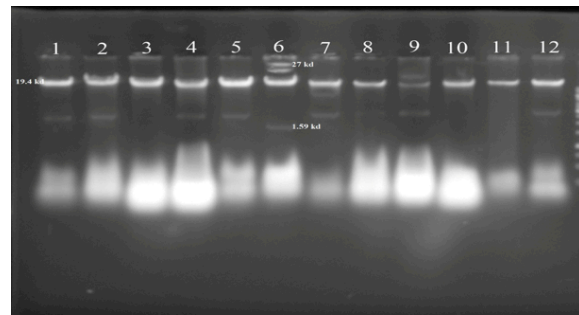
izolat	Gram boyama	Hareket	Katalaz	Oksidaz	İndol	Üreaz	Nitrat kullanımı	H ₂ S	VP testi	%6 NaCl gelişebilme	Jelatinaz aktivite	Sitrat	Glikoz	Sakkaroz	Laktöz	Mannoz	Arabinoz
Z1	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Z2	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Z3	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Z4	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Z5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Z6	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
H1	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
H2	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
H3	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
H4	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H5	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
H6	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

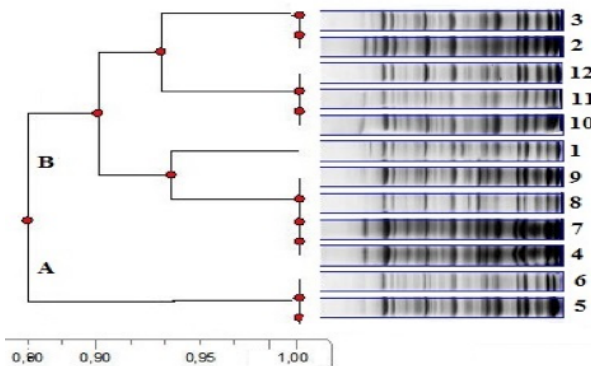
Tablo 3. *Vibrio* spp. izolatlarının antibiyogram sonuçları

izolat		Antibiyotik Diskler ve Zon Çaplarına (mm) göre Direnç Profilleri						
		P 10	Cro 30	Ak 30	Oft 5	Te 30	Gen 10	Caz 30
1	Z1	R	R	S	S	S	S	S
2	Z2	S	R	S	I	I	S	R
3	Z3	R	R	S	R	S	S	R
4	Z4	S	R	S	S	R	S	I
5	Z5	S	R	R	S	S	R	R
6	Z6	R	R	I	S	S	R	I
7	H1	S	S	R	R	I	S	R
8	H2	R	R	S	R	R	S	R
9	H3	R	R	S	S	I	S	R
10	H4	R	R	S	S	S	S	R
11	H5	S	R	I	I	I	S	R
12	H6	R	R	S	S	S	S	S

R: Dirençli; S: Duyarlı; I: Orta derecede dirençli

Ayrıca, izolatlar ait toplam hücre protein profillerine dayalı oluşturulan dendrograma göre %80 ve üzerinde iki gruba (A ve B) ayrıldığı, A grubunda 5 ve 6 numaralı zargana balık örneklerinden izole edilen suşların olduğu, B grubunun ise kendi içerisinde %91 ve üzerinde benzerlik gösterdiği görülmüş ve bu gruba göre zargana ve hamsi balık örneklerinden izole edilen suşların birbirlerine yüksek oranda benzer oldukları tespit edilmiştir (Şekil 2).

Şekil 1. *Vibrio* spp. izolatlarına ait plazmit DNA görünümü



Şekil 2. *Vibrio* spp. izolatlarına ait SDS-PAGE toplam hücre protein profil dendrogramı

TARTIŞMA

Deniz ve nehir ağız ortamlarında yaşayan *Vibrio* türleri (özellikle *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ve *V. cholerae*) gastrointestinal hastalıklar ve bazı durumlarda septisemi nedenidirler. Sebep oldukları enfeksiyonlar ise önemli seviyelerde bakteri içeren kabuklu deniz ürünleri veya diğer deniz mahsullerinin uygunsuz işlenmesi, yetersiz pişirilmesi veya çiğ tüketilmesi ile artmaktadır (14).

Amos (15); *Vibrio* cinsi bakterilerde spor ve kapsül bulunmadığından dolayı farklı çevrelere yayılış gösteremediğini, bunun için habitatlarının sucül ortam olduğundan deniz ürünlerinde sıkça bulunduğunu belirtmiştir. Hâstein ve ark. (16) yapmış oldukları çalışmalarında ise *Vibrio* türlerinin sucül çevrelerde yaygın olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir. Morris (17); epidemik *V. cholerae* suşlarının çevresel kaynaklardan insanlara ve deniz ürünlerine bulaştığını, *V. vulnificus* ve *V. parahaemolyticus* dâhil diğer *Vibrio* türleri ile *V. cholerae*'nin epidemik olmayan suşlarının deniz ürünlerinin çiğ ya da az pişmiş olarak tüketilmesi ile insanlarda enfeksiyonlara neden olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, Japonya'da gıda yolu ile bulaşan hastalıkların en az %25'inin bu bakteriden kaynaklandığı, Hindistan'da ise ishali hastaların %3,5 ile %23,9'undan bu etkenin izole edildiği

bildirilmiştir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (18), *Vibrio* türlerinin çoğunun gıda kaynaklı olduğunu, sucül ortamlarda yaşayıp ancak kirlenmiş su kaynakları aracılığıyla yayılabildiğini ve bu bakterilerin çoğunun hayatta kalabilmek için sıcak iklimlerde yayılış gösterdiğini bildirmiştir. Korun (19); ülkemizde kültür balığı yetiştiriciliği yapan işletmelerde özellikle levrek ve son zamanlarda gökkuşacağı alabalığı işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplar olduğunu ve bu kayıpların bakteriyel hastalıklara (*Vibriosis*, *yersiniozis*, *furunkulozis* ve bakteriyel hemorajik septisemi) benzer semptomlar meydana getirdiğini vurgulamıştır. Aydın ve Soyutemiz (20) yaptıkları çalışmada; Bursa ilindeki satıcılardan topladıkları balık örneklerinde *V. parahaemolyticus* taraması yapmışlar ve hiçbir örnekte busuşa rastlamadıklarını bildirmişlerdir. İnal ve ark. (21); 299 deniz balığında *V. parahaemolyticus* taraması yapmışlar ve sadece bir örnekte tespit etmişlerdir. İnal ve ark. (22)'nin yaptıkları başka bir çalışmada ise Samsun-Sinop arasındaki kıyıda avlanan 53 balık örneğinde *V. parahaemolyticus* için 37 pozitif sonuç elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Manjusta ve ark. (23); farklı ortamlardan izole ettikleri *Vibrio* spp. izolatlarının 22 farklı antibiyotik ile çoklu antibiyotik dirençliliğini çalışmışlar ve 119 *Vibrio* izolatının %16,8'inin tüm antibiyotiklere duyarlı olduğunu, %30,3'ünün üç antibiyotiğe, %55,5'inin dört ile on antibiyotiğe, %14,14'ünün on antibiyotikten fazlasına dirençli olduğunu tüm izolatlardan %54'ünün çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini saptamışlardır. Rojas ve ark. (24); istiridye ve midye örneklerinden izole ettikleri 19 *V. parahaemolyticus* suşunun içerisinde altı suşun en az iki antibiyotiğe dirençli olduğunu, ayrıca tüm suşların imipenem, nalidiksik asit ve seftazidime duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Marhual ve ark. (25); deniz ürünlerinden izole ettikleri altı *Vibrio* spp. suşunun (üç adet *V. alginolyticus* ve üç adet *V. parahaemolyticus*),

birden fazla antibiyotiğe dirençli olduklarını ve bir ile üç arasında plazmid DNA içerdiklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmalara paralel olarak elde ettiğimiz çalışmamızın sonuçlarında da izole edilen 12 *Vibrio* spp. suşunun iki veya beş antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdikleri ve bir ile dört plazmid DNA'ya sahip oldukları görülmüştür. *Vibrio* spp. izolatlarının test edilen antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençli olduğu tespit edilmiş ve bu durumda antibiyotik ve bazı diğer ilaç kalıntıları ile bulaşı su kaynaklarından dolayı olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmamızda elde edilen 0,41 MARI değeri, bu durumu desteklemektedir.

Yoon ve ark. (26); 13 adet *Vibrio* türünün toplam hücre protein profiline göre tanımlanması üzerine yaptıkları çalışmada, türlerin kendi aralarında ayrımlarında %56 ve üzerinde benzerlik sağladığını böylece bu tekniğin *Vibrio* türlerini ayırmada tür altı düzeyde de hızlı, basit ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Benediktsdottir ve ark. (27); hastalıklı balık örneklerinden izole ettikleri 25 *V. viscosus* ve 23 *V. wodanis* suşlarının toplam hücre proteinlerinin benzerliklerine SDS-PAGE yöntemi ile incelemişler ve sırasıyla %92,8 ile %88,3 ve üzerinde benzerlik gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre 12 *Vibrio* spp. izolatının kendi aralarında %80 ve üzerinde benzerliğe sahip olduğu ve bu çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmüştür.

Çalışmamızda; *Vibrio* türlerinin diğer patojenik mikroorganizmalara nazaran tuzlu sularda ve bu sularda yetişen organizmalarda bulunması, bu ortamlara uyumlu olması ve ayrıca Sinop ilinde hem deniz suyunun rekreasyonel amaçlarla kullanılması hem de su mahsullerinin çok fazla tüketilmesi bu bakterinin oluşturabileceği olası enfeksiyonları arttırması sonucunu çıkarabiliriz. Ayrıca, deniz ürünlerini tüketmeden önce iyi derecede pişirilmesi gerektiğini söyleyebiliriz.

Balık örneklerinde *Vibrio* türlerinin tespitinde kullanılan SDS-PAGE yöntemi ile toplam hücre protein profillerinin tür düzeyinde ayırımında hızlı, güvenilir ve basit bir teknik olduğunu, buna rağmen tür altı ayırmada yetersiz kaldığı ve bunun için moleküler tekniklerin kullanılması gerektiğini önerebiliriz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre plazmid DNA profilleri ve çoklu antibiyotik dirençliliği arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Tek bir plazmid DNA'ya sahip izolatlarda (3 ve 10 numaralı izolatlar) ikiden fazla antibiyotiğe dirençlilik saptanmıştır. Ayrıca antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı sonucu, denize atık olarak bırakılmasının insan sağlığına etkilerini göz önünde bulundurarak bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin arttığını ve bu durumla mücadele amaçlı sadece uygun antibiyotiklerin kullanılması ile çevreye bilinçsizce bırakılan ilaç türevi maddelerin önüne geçilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemektedir.

KAYNAKLAR

1. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999.
2. Uchiyama H. Distribution of *Vibrio* species isolated from aquatic environments with TCBS agar. Environ Health Preven Med, 2000; 4 (4): 199-204.
3. Boe B, Gjerde J. Fatty acid patterns in the classification of some representatives of the families Enterobacteriaceae and Vibrionaceae. J Gen Microbiol, 1980; 116 (1): 41-9.
4. Han F, Walker RD, Janes ME, Prinyawiwatkul W, Ge B. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters. Appl Environ Microbiol, 2007; 73 (21): 7096-8.
5. Alavandi SV, Manoranjita V, Vijayan KK, Kalaimani N, Santiago TC. Phenotypic and molecular typing of *V. harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. Lett Appl Microbiol, 2006; 43 (5): 566-70.
6. Bej AK, Harold N, Vickery MCL, Brasher C, Jeffreys A, Jones DD, et al. Use of PCR to determine genomic diversity and distribution of siderophore-mediated iron acquisition genes in clinical and environmental isolates of *V. vulnificus*, abstr. 97th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology-Washington D.C., 1997.
7. Amorim A, Vasconcelos V. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon, 1999; 37 (7): 1041-52.
8. Farmer III JJ, Hickman Brener FW. The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd edn. New York: Springer, 2006: 508-64.
9. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J Clin Pathol, 1966; 45 (4): 493-6.
10. Anonymous. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M100-S20 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.
11. Sarter S, Nguyen HNK, Hung LT, Lazard J, Montet D. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. Food Control, 2007; 18 (11): 1391-6.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-5.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
14. Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. Appl Environ Microbiol, 2004; 70 (12): 7436-44.
15. Amos K. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. 3rd. edn. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1985.
16. Håstein T, Hjeltnes B, Lillehaug A, Skare JV, Berntssen M, Lundebye AK. Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fish industry. Rev Sci Tech off Int Epiz, 2006; 25: 607-25.
17. Morris JG. Cholera and other types of *Vibriosis*: a story of human pandemics and oysters on the half shell. Clin Infect Dis, 2003; 37 (2): 272-80.
18. Anonymous. *Vibrio cholerae* izolasyonu ve identifikasyonu standart laboratuvar prosedürleri. Ankara: THSK, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı, 2012.
19. Korun J. Kültürü yapılan çipuralarda (*Sparus aurata* L.) görülen *Listonella anguillarum* enfeksiyonu üzerine bir çalışma. Ege JFAS, 2006; 23 (Ek 1/2): 259-63.
20. Aydın A, Soyutemiz E. Bazı balık türlerinden ve kum midyelerinden (*Venus gallina*) *Vibrio parahaemolyticus* izolasyonu ve identifikasyonu. Turk J Vet Anim Sci, 2002; 26: 1249-53.
21. İnal T, Yurtyeri A, Ambarcı I. Untersuchungen über das Vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* im Jahre 1971 in der Türkei. Fleischwirtschaft, 1973; 53(9): 1299.

22. İnal T, Yurteri A, Ambarcı I, Tolgay Z, Tezcan I. Untersuchungen über das vorkommen von *Vibrio parahaemolyticus* an der Schwarzmeerküste der Türkei. *Alimenta*, 1977; 16: 129-33.
23. Manjusha S, Sarita GB, Elyas KK, Chandrasekaran M. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. *Am J Biochem Biotech*, 2005; 1(4): 201-6.
24. Rojas MVR, Matté MH, Dropa M, Silva ML, Matté GR. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters and nussels in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2011; 53 (4): 201-5.
25. Marhual NP, Das BK, Samal SK. Characterization of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from *Penaeus monodon*: antimicrobial resistance, plasmid profiles and random amplification of polymorphic DNA analysis. *Afr J Microbiol Res*, 2012; 6 (20): 4270-6.
26. Yoon LC, Ryu J, Oh SS, Hwang IG. Detection and identification of *Vibrio* species using whole-cell protein pattern analysis. *J Microbiol Biotech*, 2012; 22 (8): 1107-12.
27. Benediktsdóttir E, Verdonck L, Spröer C, Helgason S, Swings J. Characterization of *Vibrio viscosus* and *Vibrio wodanis* isolated at different geographical locations: a proposal for reclassification of *Vibrio viscosus* as *Moritella viscosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000; 50 (2): 479-88.