



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association
e-ISSN 2667-8381, 11 (3): 168-178, 2020
DOI: 10.38137/vetfarmatoksbulen.834364

AKUAKÜLTÜRDE ANTİBİYOTİK DİRENCİ VE BİYOFİLMİN ROLÜ

Sultan Nurhan AYIKOL^{1a}, Furkan KUTLU^{1b}, Onur Mücahit DİNCER^{1c}, Farah Gönül AYDIN^{2d*}

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara

²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara

ORCID^a: 0000-0002-0512-2918, ORCID^b: 0000-0003-0310-2590,
ORCID^c: 0000-0002-3055-1458, ORCID^d: 0000-0002-0068-2078

*Sorumlu Yazar: Farah Gönül AYDIN
E-Posta: fgaydin@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi: 01.12.2020
Kabul Tarihi: 30.12.2020

ÖZET

Gelişmekte olan su ürünleri endüstrisi hayvansal protein üretiminin önemli bir miktarını karşılamaktadır. Ancak nüfusun giderek artması, iklim değişikliği, çevresel bozulmalar ve özellikle hastalıklar üretimi etkilemekte, bu durum ise ülke ekonomisini makro düzeyde etkilemektedir. En sık karşılaşılan hastalık etmenleri *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*'dir. Dünya genelinde ve Türkiye'de balık hastalıklarını kontrol altına almak veya tedavi etmek amacıyla pek çok yöntem bulunmaktadır. Aşı uygulamaları büyük ölçüde kullanılırken aşılamanın yetersiz ve/veya yapılamadığı durumlarda antibiyotik kullanımı tedavide önemli bir rol oynamaktadır. Türkiye'de balık hastalıklarında kullanılmak üzere ruhsatlandırılmış antibiyotiklerden 15'ini florfenikol, 12'sini oksitetrasiklin, 9'unu sülfadiazin+trimetoprim, 2'sini enrofloksasin, ve 2'sini amoksisiklin oluşturmaktadır. Bu antibiyotik ilaçların akuakültürde uygun olmayan dozda, sürede, antibiyogram testi yapılmadan doğru olmayan kombinasyonların yapılması gibi çeşitli nedenlerden dolayı bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve etkili antibiyotik sayısının yetersiz kalmasına yol açmaktadır. Bu durum ulusal ve uluslararası boyutta değerlendirildiğinde antibiyotik ilaçların etkisi oluşan direnç ile azalmakta, mortalite ve tedavi maliyetini arttırmakta, bu hem veteriner hem de beşeri sağlık alanında giderek artan küresel problemlere neden olmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin oral ilaçlı yem premiks şeklinde uygulanması kalıntıların farklı yerlere dağılmasına, çevreye ve diğer canlılara ulaşmasına yol açmakta ve bu da beraberinde antibiyotik direncinin yayılmasına sebep olmaktadır. Planktonik bakteriler önlemede kullanılan antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) biyofilmleri önlemek, inhibe etmek, azaltmak veya ortadan kaldırmak için gereken değerlerle örtüşmemektedir. Bu durum biyofilm formundaki bakterilerin ilaca çok daha dirençli olması sebebiyle başarısızlığa neden olmaktadır. Yapılan bu derleme ile bakterilerin biyofilm formlarının artan antibiyotik direnci konusundaki rolü ve buna neden olan mekanizmaları özellikle Türkiye'de gelişmekte olan akuakültür açısından değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akuakültür, antibiyotik, biyofilm, direnç.

ANTIBIOTIC RESISTANCE IN AQUACULTURE AND THE ROLE OF BIOFILMS

ABSTRACT

Aquaculture industry is a rising industry, fills important amounts of animal protein production. However, climate change, ecological disruption, population increase and especially diseases are affecting the national economy on a macro scale. Most commonly encountered disease agents are: *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. There are many methods to control and treat for aquatic diseases in the World and Turkey. While vaccination programs are used regularly, in case it can't be applied appropriately or not at all, antibiotics still plays an important role in treatment. In Turkey, antibiotics are licenced for finfish: 15 of florfenicol, 12 oxytetracycline, 9 sulfadiazine + trimethoprim, 2 enrofloxacin and 2 amoxicillin. Due to usage of those antibiotics with the wrong dosage, time of use, without an antibiogram test and usage of the wrong combination of drugs leads to bacterial antimicrobial resistance and the insufficient number of effective drugs to be used. While considering this situation on a national and international scale; with increased antimicrobial resistance, effects of antibiotics are reduced, increase of mortality and cost of treatment creates increasing global problems not just animal but also human health. Use of antibiotics as oral and premixes, increases residues in various places, making it easier to reach the aquatic environment and other animals thus increasing antimicrobial resistance even further. Minimum inhibitor concentration (MIC) of antibiotics used against planktonic bacteria does not match the value to prevent, inhibit, reduce or eradicate biofilm produced by them In this review, role of biofilm bacteria in increased antimicrobial resistance and mechanisms affecting that are evaluated considering growing aquaculture industry, especially in Turkey.

Keywords: Aquaculture, antibiotic, biofilm, resistance.

GİRİŞ

Sağlıklı bir yaşam için gerekli olan temel besin gruplarından proteinin yeterli tüketimi, günümüz dünyasında toplumsal bir refah faktörü olarak sayılmakla birlikte; geçtiğimiz yüzyılda dünya nüfusun hızlı artışı, her çeşit protein kaynağına olan talebi arttırmıştır. Bu bağlamda esansiyel yağ asitleri bakımından zengin olan hayvansal ürünlerin talebi de artmıştır. Dünyada su ürünleri endüstrisi son 20-30 yılda yükselişe geçen gıda üretim sektörüdür ve insanların hayvansal protein gereksinimini karşılayan önemli bir üretim alanı durumundadır. 2017 yılında tüketilen balık küresel olarak toplam hayvansal proteinlerin %17'sini, tüm proteinlerin %7'sini oluşturmaktadır. Kişi başına düşen ortalama hayvansal protein alımının ise neredeyse yüzde 20'si ile 3,3 milyar insanın protein kaynağı olmuştur. 2018 yılında su ürünleri üretimi 179 milyon tonluk bir rakama ulaşmış olup, su ürünleri yetiştiriciliğinin toplam içerisindeki payı %46 ve gıda dışı kullanım

(balık yemi ve balık yağı kullanımı da dâhil olmak üzere) çıkarıldığında ise %52'lik bir orana ulaştığı görülmektedir. Tüketimdeki artış üretimdeki artışa bağlı olduğu kadar gelişen teknolojiye, dünya çapında artan gelire, israfta ve kayıptaki azalmalara ve balığın insan sağlığına açısından öneminin artması ile balık sağlığı alanındaki gelişimlere bağlı olarak günümüzde su ürünleri üretiminin ekonomik değeri 263,6 milyon dolara ulaşmıştır (FAO, 2020).

Türkiye'nin çevresinde bulunan bütün denizler Akdeniz sular sisteminin bir parçasıdır. Fakat bu denizler ekolojik, coğrafik, jeomorfolojik, meteorolojik özellikleri bakımından birbirinden farklılık göstermektedir. Karadeniz ve Akdeniz arasındaki farklılık daha belirgindir. Bu durum balıkçılık açısından değerlendirildiğinde tür çeşitliliğine ve bolluğuna yansımaktadır (TAGEM, 2019). Türkiye'de ise Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; su ürünleri üretimi 2019 yılının bir önceki yılına göre yüzde 33,1 artış ile 836

bin ton gerçekleştirilmiştir. Üretimdeki yetiştiriciliğin payı ise 373 bin ton ile yüzde 18,7 seviyelerine yükselmiştir. Yetiştiriciliğin üretim yeri bakımından yüzde 68,8'i deniz balıkları, yüzde 31,2'si iç su balıkları oluşturmaktadır. En çok yetiştiriciliği yapılan balıklar sırasıyla 137 bin tonla levrek, 123 bin tonla alabalık ve 99 bin tonla çipuradır. Sektörün ekonomik değeri 7,6 milyar TL ile 2018 yılına göre %40 artış göstermiştir. Türkiye levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*) ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) üretiminde Avrupa Birliği ülkeleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Türkiye su ürünleri açısından hem ithal eden hem de ihraç eden bir ülke konumunda olup, su ürünlerinde pozitif bir dış ticaret dengesi mevcuttur. Sektörde son 10 yılda artan ihracatın, 2019 yılında 200 bin ton miktarında ve 5 milyar TL değerinde olduğu görülmektedir (FEAP, 2018; TÜİK, 2020).

Sazan (*Cyprinus carpio*), alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) gibi iç su balıklarının haricinde levrek (*Dicentrarchus labrax*), çipura (*Sparus aurata*) başta olmak üzere, sariağız-granyöz (*Argyrosomus regius*), dil balığı (*Solea solea*), sinarit (*Dentex dentex*) ve minekop (*Umbrina cirrosa*) gibi ekonomik değeri yüksek balık türlerinin yetiştiriciliği de yapılmaktadır (Tezel, 2015; BSGM, 2020).

Türkiye'de yetiştiricilik yapılan bölgedeki işletmelerin dağılımları ve üretim miktarlarına bakıldığında su ürünleri yetiştiriciliği önemli bir gelir kaynağıdır. Ancak bunu nüfusun giderek artması ve büyüyen su ürünleri endüstrisi ile birlikte ticaretin gelişmesi, iklim değişikliği ve çevresel bozulmalar su ürünlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle birçok hastalığın çıkışında rol oynayan bu etmenler; ekonomik kayıplara yol açmakta ve bununla beraber zoonotik hastalıklara sebep olmaktadır. Makro düzeyde ise ülke

ekonomisini yakından etkilemektedir (Arunkumar ve ark., 2020).

Balık hastalıklarının çıkışında çevre, patojen ve konakçı önemli rol oynamaktadır. Ancak, hastalıkların ortaya çıkmasında en önemli etken balığın bağışıklık sistemini baskılayan stres faktörleridir. Bununla beraber, balık stoklama yoğunluğunun artması, aşırı kalabalık ortam, çiftlikler arası hijyen eksikliği gibi nedenlerle hastalıklar hızla yayılmaktadır. Hastalık yayılımına bakıldığında genelde kültürü yapılan balıklarda hastalık oranı, doğal ortamdakilerinene göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir (Naylor ve ark., 2000; Naylor ve Burke, 2005; Cabello, 2006). Türkiye'de su ürünleri yetiştiriciliğinde en sık karşılaşılan bakteriyel hastalık etkenleri; *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*'dir. Bunlar haricinde de *Flavobacterium psychrophilum*, *Tenacibaculum maritimum*, *Edwardsiella tarda* gibi patojenler sıklıkla hastalığa neden olmaktadır (Kirov ve Sanderson, 1996; Barnett ve ark., 1997; Lewbart, 2001; Sörum, 2006; Silver ve Graf, 2009; Nawaz ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2016).

Hastalık antibiyotikler ile tedavi edilmemesi durumunda kümülatif ölüm oranı %60-80'lere kadar çıkabilmekte ve bu durum etkilenen bölgelerdeki üretimde büyük kayıplara neden olabilmektedir (Zrnecic, 2020; Zdanowicz ve ark., 2020). Bu bağlamda Çin'de 1990'lı yılların başında başta *A. hydrophilia* olmak üzere *Vibrio spp.* ve *Yersina spp.* etkenlerinin sekonder olarak seyrettiği salgında ekonomik kaybın 120 milyon dolar; 2009-2010 yılları arasında Amerika'da bir eyalette sadece *A. hydrophilia*'nın tahmini kaybın 3 milyon dolar olduğu bildirilmiştir (Subasinghe, 2005; Pridgeon ve Klesius, 2011). Dünya genelinde ve Türkiye'de balık hastalıklarını kontrol altına almak veya tedavi etmek amacıyla pek çok yöntem bulunmaktadır. Hastalığı önlemede aşı uygulamaları bakteriyel patojenleri

kontrol altına almada antibiyotiklerin yerini büyük ölçüde almıştır. Bu bağlamda günümüzde 40'tan fazla bakteriyel ve viral etkene karşı aşı bulunurken, farklı balık türleri ve etkenlere karşı yeni aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Ancak bakteriyel etkenlerin alt türleri arasındaki yüksek genetik heterogenesize bağlı olarak hastalıkların kontrolleri açısından bu patojenlere karşı koruyucu aşı ve probiyotik uygulamalarında zorluk yaşanmaktadır (Poobalane ve ark., 2010). Aşılamaların yetersiz kaldığı veya yapılamadığı durumlarda antibiyotik kullanımı tedavide önemli bir rol oynamaktadır (Yalınkılınç ve Kum, 2016; Shefat, 2018).

Dünyada en fazla su ürünleri üreticisi konumunda olan ülkelerde %73 oranında oksitetrasiklin, florfenikol ve sülfadiazin etkin madde içeren preparatlar tercih edilirken, %55 oranında ise enrofloksasin, amoksisilin, sülfadimetoksin tedavide kullanılmaktadır (Baydan ve ark., 2012; Lulijwa ve ark., 2020). Türkiye'de balıklarda ruhsatlı antibiyotiklerden 15'ini florfenikol, 12'sini oksitetrasiklin, 9'unu sülfadiazin+trimetoprim, 2'sini enrofloksasin, ve 2'sini amoksisiklin oluşturmaktadır (GKGM, 2020).

Antibiyotik ilaçların kullanımının nihayetinde su ürünleri verimliliğini arttırmasına rağmen antibiyotiklerin; (I) uygun olmayan dozlarda (II) süreye dikkat edilmeden (III) antibiyogram testi yapılmadan (IV) yasal olmayan veya etiket dışı kullanım (V) doğru olmayan kombinasyonların yapılması (VI) primer etkenlerin göz ardı edilerek tedavinin uygulanması gibi çeşitli nedenlerden dolayı bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve etkili antibiyotik sayısının yetersiz kalmasına ve sonuç olarak küresel anlamda sorunlara yol açmaktadır (Daş ve ark., 2016). Özetle bu bahsedilen nedenler ulusal ve uluslararası boyutta değerlendirildiğinde antibiyotik ilaçların etkisi,

oluşan direnç ile azalmakta, mortalite ve tedavi maliyetini arttırmakta olup, bu durum hem veteriner hem de beşeri sağlık alanında giderek artan küresel problemlere neden olmaktadır. Bununla ilişkili olarak 2014 yılında yapılan değerlendirmelere göre antibiyotik direncine nedeniyle tedavi edilemeyen enfeksiyonlar sonucunda yaklaşık 700 bin kişinin hayatını kaybettiği raporlanmış ve bununla birlikte bu sayının 2050 yılında 10 milyon olacağı tahmin edilmektedir (Allcock ve ark., 2017). Türkiye Ekonomi Politikaları Araştırma Vakfı (TEPAV)'ın 2017 yılında yaptığı çalışmaya göre, Türkiye hem antibiyotik kullanımının hem de antibiyotik direnç seviyesinin en yüksek olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Gelişmiş ülkeler değerlendirildiğinde her bir ton balık için bir yılda kullanılan antibiyotik miktarının Norveç'te 0,8 gr, İngiltere 11,7 gr iken gelişmekte olan Şili'de bu miktarın yaklaşık kullanımın 1,5 kg olduğu raporlanmıştır (Duman, 2017). Türkiye'de ise hayvan sağlığında kullanılan antibiyotik ilaç miktarlarının kaydına dair herhangi bir bilgiye ulaşılamamaktadır.

Su ürünlerinde kullanılan bu antibiyotikler genelde oral ve yem-ilaçlı premiks şeklinde uygulanmaktadır (Baydan ve ark., 2012). Antibiyotik ilaçların bu şekilde kullanılması kalıntıların farklı yerlere dağılmasına, çevreye ve diğer canlılara ulaşmasına yol açmakla bu da beraberinde antibiyotik direncinin yayılmasına sebep olmaktadır. Miranda ve Zemelman (2002) somon işletmesinde yürüttükleri bir çalışmada, havuzun giriş suyundan izole edilen bakterilerin %8-69'nun oksitetrasikline dirençli olduğu, çıkış suyundan izole edilen bakterilerin ise %0-16'sının oksitetrasikline dirençli olduğunu raporlayarak çalışma sonunda antibiyotik ilaçların çevreye olan etkisine değinmişlerdir. Benzer şekilde Jolivet ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada artan antibiyotik direncini direnç genlerinin horizontal gen transferi

ile aktarılması ile ilişkilendirmiştir. Seyfried ve ark. (2010), su ürünlerinde yaptığı çalışmada bir işletmedeki hastalık tedavilerinde tetrasiklin kullanılmamasına rağmen bu işletmeden izole edilen bakterilerde tetR direnç genine rastlamışlardır. Buna benzer olarak pek çok araştırmacı *Aeromonas spp.* gibi fırsatçı bakterilerin direnç genlerinin insanlardan izole edilen *E.coli* ve diğer hastalık yapan önemli bakterilere aktarabildiğini göstermiştir (Duman, 2017).

Değişen çevresel etmenler; sıcaklık, pH, ozmolarite, demir ve oksijen gereksinimi, besin bulunabilirliğinde değişiklik bakteriyel patojenlerin planktonik formdan biyofilm formuna geçmesin neden olmaktadır (Kostakioti ve ark., 2013). Biyofilm, konakçı üzerinde bakteriyel hücrelerin birbirleriyle kendi ürettikleri ekstrasellüler polisakaritler (EPS) ile ince bir tabaka oluşturması olarak ifade edilmektedir. Biyofilm içerisindeki EPS, hücrelerin fiziksel ve sosyal etkileşimlerinin oluşumunda, gen değişiminin (mutasyonun) artmasında ve antibiyotik duyarlılığında önemli bir rol oynamaktadır (Gebreyohannes ve ark., 2019). Biotik ya da abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilen bakteriler, hücreler arası iletişimi ve etkileşimi quorum algılama (QA) ile sağlamaktadır (Behlau ve Gilmore, 2008; Vu ve ark., 2009; Hoiby ve ark., 2010). Bakterilerdeki bu sistemin; toksinlerin, antibiyotiklerin, biyoluminesansın, bakteri konjugasyonu; virülens faktörlerinin salgılanması; biyofilm oluşumu ve farklılaşması, ekstrapolisakaritlerin üretimini gibi pek çok fizyolojik etkileşimleri düzenlediği bilinmektedir (Borges ve ark., 2019; Li ve ark., 2020).

Planktonik bakteriler kullanılarak antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) rutin olarak belirlenmekte ve kullanılan ilaç miktarı biyofilmleri önlemek, inhibe etmek, azaltmak veya ortadan kaldırmak için

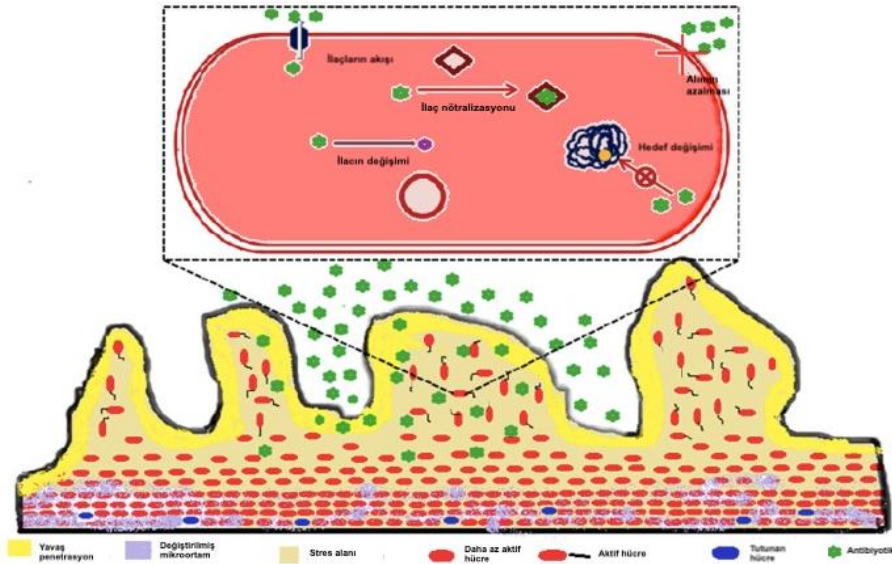
gereken değerlerle örtüşmemektedir (Thieme ve ark., 2019). Bu durum klinik tedavi açısından değerlendirildiğinde biyofilm formundaki bakterilerin ilaca daha çok dirençli olması sebebiyle başarısızlığa neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı antibiyotik ilaçlara karşı artan direnç nedeniyle birçok araştırmacının biyofilm oluşumuna odaklandığı görülmektedir (Hoiby ve ark., 2010). Bahsi geçen çalışmalar dikkatle incelendiğinde ise çoğunluğun biyofilm tamamen olgunlaşmadan önceki aşamaları inhibe etmeye yönelik olduğu görülmektedir (Husain ve ark., 2015; Patel ve ark., 2015; Singh ve ark., 2017). Diğer yandan bu çalışmalara paralel olarak araştırmacıların biyofilm formundaki bakterilere yönelik ayrı değerlendirme kriterleri oluşturulması çalışmalarına ağırlık verdiği görülmektedir (Macia ve ark., 2014). Antibiyotik direncinin belirlenmesinde ise besin dağılımı ve biyofilm oluşum modellerine göre kapalı sistemler ve açık sistem olmak üzere iki farklı metot kullanılmaktadır. Buna göre kapalı sistem, yüksek verimli analizde kolaylık ve uygulanabilirlik avantajına sahipken, açık modeller büyüme parametrelerinin ve dinamiklerinin daha iyi kontrolünü sağlamaktadır.

ANTİBİYOTİK DİRENCİNDE BİYOFİLMİN ROLÜ

Biyofilm formundaki bakterilerin hücre yoğunluğunun artışı antibiyotik ilaçlarının kullanımı, değişen horizontal gen değişimi ve mutasyon artışıyla beraber antibiyotik ilaçlara dirençli bakteri sayısını arttırmaktadır (Lazar ve Chifiriuc, 2010). Artan dirençle beraber biyofilm oluşumu antibiyotik ilaçların hedef hücrelere ulaşmasında bariyer görevi görerek bakteride öncelikli olarak kısa süreli koruyucu etki yaratmaktadır. Yapılan çalışmalarda aminoglikozid grubu ve polipeptitler gibi pozitif yüklü antibiyotik

ilaçlar, negatif yüklü biyofilm polimerlerine bağlandıklarında, bu ilaçların biyofilme penetrasyonunu geciktirdiği ve ilaca karşı dirence neden olduğu görülmüştür (Gougeon, 2014). Tedavide karşılaşılan başarısızlığın bir başka nedeni ise biyofilm formundaki bakterilerin planktonik bakterilere göre büyüme hızını büyük ölçüde yavaşlatması buna bağlı olarak ilacın hücreye girişinin azalması (Şekil 1) olarak ifade edilmiştir (Evans ve ark., 1990). Bu durum sonuç olarak büyüme evresindeki bakterilere göre biyofilm oluşturan hareketsiz, persist bakterilerin ilaca daha az duyarlı olmasına neden olmasına yol açmaktadır (DuGuid ve ark., 1992). Hengzhuang ve ark. (2013),

yaptığı sefazidim ve imipenemin etkinliğini araştırdığı çalışmasında *P. aeruginosa*'nın biyofilm formunda kullanılan antibiyotiklere cevap olarak daha fazla beta-laktamaz enzimi depoladığını tespit etmişlerdir. *E.coli* ve *Stap. aureus* gibi bakterilerde bazı metabolitlerin (glukoz, mannitol, fruktoz veya piruvat) varlığının aminoglikozid grubu bakteriyel ilaçların etkisini arttırdığı ortaya konulmuş olup, antibiyotik duyarlılığında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Allison, 2011). Ayrıca bakterinin proteaz enziminin kolonileşmeyi engellemede etkili olduğu yine yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Papa ve ark., 2013).



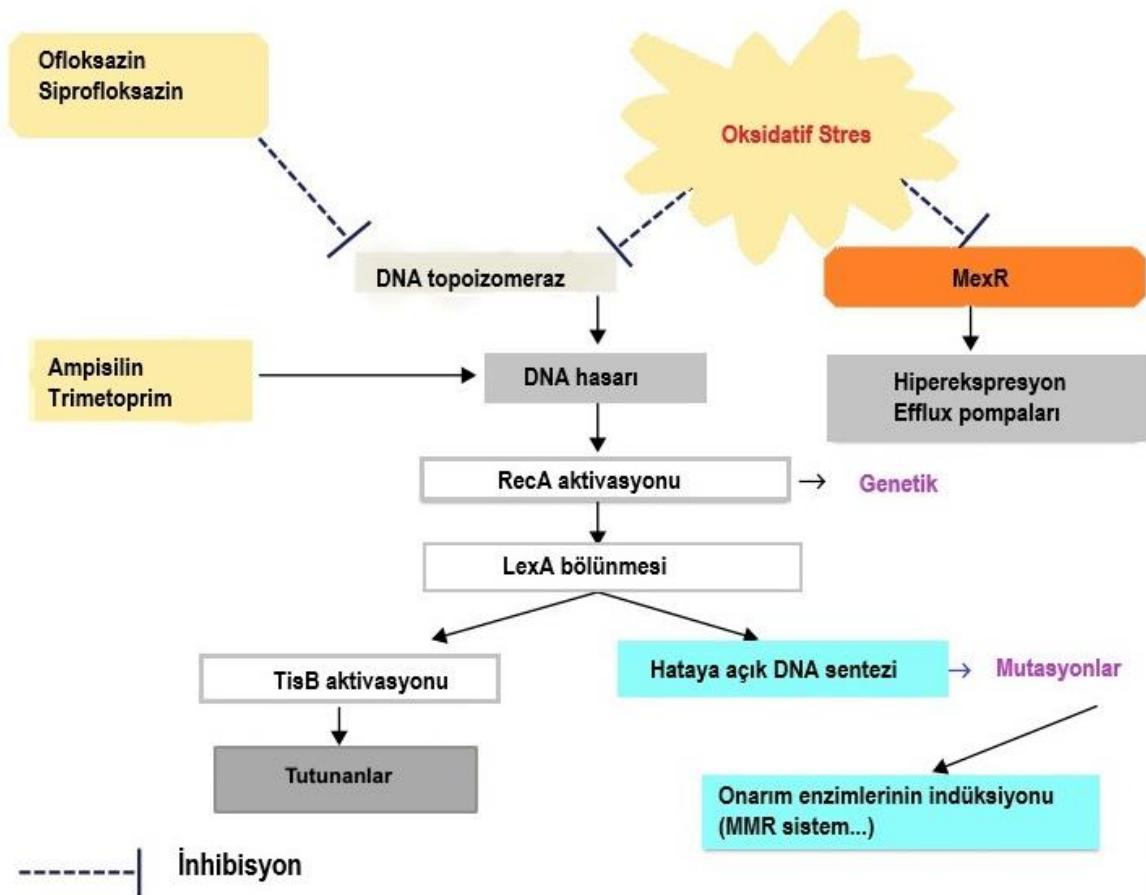
Şekil 1. Biyofilm formunda olası antibiyotik direnç mekanizması (Sharma ve ark., 2019).

Guyard-Nicode ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada biyofilm formundaki bakterilerin antibiyotik direncini arttıran stres yanıt genlerini aktive edebildiklerini ileri sürerek biyofilmlerdeki hiperosmolarite ve dış zar proteini (Omp) değişikliklerine yanıt olarak *Pseudomonas fluorescens*'in antibiyotiklere daha yüksek

duyarlılığa sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak bir başka çalışmada düşük oksijen seviyesinde *P. aeruginosa*'da atım pompalarının düzenlenmesine yol açtığı ve bu durumun aminoglikozid grubu antibiyotiklerin bakterisid etkisini azalttığı gözlenmiştir (Schaible ve ark., 2012).

Özellikle suboptimal antibiyotik konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu, mutagenesi ve antimikrobiyal direnci uyardığı yapılan çalışmalarda önemi vurgulanmıştır. Aminoglikozidler, metronidazol ve beta-laktamlar gibi antibiyotik ilaçların Slow growth or Starved (SOS) yanıtını dolaylı olarak arttırdığı (Şekil 2)

böylece DNA hasarına neden olan süperoksit veya hidroksil radikallerini ürettiği gözlenmiştir. Diğer yandan çeşitli mikroorganizmalarda özellikle indirekte etkili olan florokinolon grubu antibiyotikler başta olmak üzere ampisilin ve trimetoprimsub-MİK düzeyde SOS yanıtını direkt olarak arttırdığı saptanmıştır.



Şekil 2. Biyofilmde oksidatif strese bağlı oluşan SOS yanıtı (Jolivet-Gougeon ve Mallet, 2014).

Bununla beraber biyofilm oluşumunun antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonu değiştirdiğini ve ayrıca moleküler olarak kontrol edilen antibiyotik sub-MİK değerlerinin mutagenesi

sonucu başka antibiyotikleri de (diğer kinolonlara, aminoglikozidler ve beta-laktamlar) dirençli kazanabileceği gözlenmiştir (Da ve ark., 2012; Elliott ve ark., 2010).

AKUAKÜLTÜRDE BİYOFİLM KAYNAKLI DİRENÇ

Aynı zamanda insanlarda da enfeksiyona neden olan *Aeromonas spp.* ve *Vibrio spp.* kültür balıkçılığı ortamlarında ve yaşam koşullarına uygun olmayan yüzeylerde biyofilm oluşturduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda akuatik bakterilerin cam yüzeyler, galvanizli çelik yüzeyler ve mikroplate kuyucukları gibi geniş bir alanda biyofilm oluşturabildiğini göstermektedir (Azad ve ark., 1999; Merino ve ark., 2001; Nayak ve ark., 2004; Asha ve ark., 2004; Gavin ve ark., 2003; Dogruoz ve ark., 2009; Li ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2020). Nitekim bu durum bakterilerin konakçı dışında da uzun süre hayatta kalabilmelerine, ilaca karşı direncin gelişmesine (Basson ve ark., 2008) ve oluşan biyofilm formunun tedavide başarısızlıklarda artışa neden olduğu bildirilmektedir. Arankumar ve ark. (2020)'nin çalışmasında biyofilm formundaki bakterilerin antibiyotik tedavisinde planktonik formdakilere göre 100-1000 kat daha dirençli olduğunu ve bu nedenle antibiyotik kullanıma karşı dirençli olan biyofilmlerin tedavisinin daha zor olduğunu bildirmişlerdir.

Moori Bakhtiari ve ark. (2019)'nin yaptığı çalışmada 19 adet *A. hydrophila* suşlarının biyofilm oluşturabildiği ve biyofilm oluşturan suşların %79'unun orta dereceli %21'nin güçlü biyofilm yapma kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca suşların %90'nın kilindamisin ve vankomisin'e dirençli olduğu ve tüm suşların siprofloksasin ve trimetoprim-sulfametoksazol'e duyarlı olduğu bildirilmiştir. Desbois ve ark. (2020)'nin çalışmasında mikroplate testini kullanarak 28 adet *A. salmonicida* izolatlarında florfenikol ve oksitetrasiklinin varlığında biyofilm oluşumu üzerine araştırma yapmışlardır. Yapılan bu

çalışmada 28 izolattan 19'u oksitetrasiklinin submik konsantrasyonunun biyofilm oluşumunu arttırdığı gözlenirken, 17 sinin florfenikolün submik konsantrasyonunun biyofilm oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir. Dias ve ark. (2017), siprofloksasine dirençli ve hidrofilik yüzeye sahip olan tüm *Aeromonas spp.* suşlarının biyofilm oluşturduğu ve oluşan biyofilmin siprofloksasinin MİK değerini (MİK 6–60 mg/mL) 10 kat daha arttırdığını yaptıkları çalışmada gözlemlemişlerdir.

Vibrio spp. kaynaklı enfeksiyonların sağaltımında son yıllarda daha çok ilaç direnci ve bunun önlenmesine yönelik çalışmaların ön plana çıktığı görülmektedir. İklim değişikliği ve buna bağlı artan su sıcaklığı ile oluşan biyofilm form bakterilerin oluşan dirençte etkili olduğu görülmektedir. Bununla beraber yapılan çalışmalar göz önüne alındığında özellikle *Vibrio spp.* de biyofilm oluşumunda etkili olan quorum algılama sistemini inhibe etmeye yönelik bitki özleri, akuatik bakteriler, bakterilerin ekzopolisakaritleri, siyanobakteriler ve mikroalg kullanıldığı çalışmaların yer aldığı görülmektedir (Wang ve ark., 2003; Arankumar ve ark., 2020; Deng ve ark., 2020).

Bu belirtilenlerin dışında ise özellikle *Vibrio* kaynaklı enfeksiyonların engellenmesinde faj kullanımı günümüzde araştırmacılar tarafından en sık yapılan çalışma arasındadır. Bu bağlamda özellikle *V. anguillarum*'un iki farklı suşunun mikrokolonilerinde biyofilm formunda ve planktonik hücrelerinin büyüme sırasında (BA35 ve PF430-3) in vitro faj-konak etkileşimleri araştırılarak biyofilm gelişimi üzerinde tamamen farklı etkilere sahip olduğu ve BA35 suşuna faj H20'nin eklenmesi, biyofilm oluşumunun ve planktonik hücre yoğunluğunun kontrol altına almada etkili olduğu belirtilmiştir (Tan ve ark., 2015 ve 2020; Deng ve ark., 2020).

SONUÇ VE GELECEKTEKİ YAKLAŞIMLAR

Biyofilm, kronik enfeksiyonların ortaya çıkmasına yol açan, sağlık ve endüstri alanında mücadele edilmediği sürece halk sağlığını tehdit eden, endüstri açısından ekonomik kayıplara neden olarak günümüzde giderek artan bir sorun olduğu görülmektedir.

Planktonik formdaki bakterilerinin yanı sıra biyofilm formundaki bakteriler antibiyotik ilaçlara karşı daha fazla dirence sahip olmasıyla tedavide zorluklara, hastalıkların ortaya çıkmasına ve yayılmasına yol açmaktadır. Küresel boyutta bakıldığında akuakültürde dahil olmak üzere çoklu ilaç direnci ve yaygın ilaç dirençli bakteri enfeksiyonlarının çıkışı mevcut durumu daha da kötüleştirmektedir.

Bu bağlamda bakıldığında günümüzde araştırmacıların özellikle biyofilmin antibiyotik direnç mekanizması üzerine etkileri ve alternatif tedavi yöntemlerine yönelik çalışmalara ağırlık verdikleri görülmektedir.

Yapılan araştırmalar incelendiğinde nanoteknoloji kullanılarak üretilen yeni ilaç formülasyonları, CRISPR gibi yeni gen düzenleme teknolojileri ve fotodinamik terapi fitoterapi terapi gibi yaklaşımların kullanıldığı alternatif yaklaşımlar dirençli suşların sebep olduğu enfeksiyonların tedavi edilmesinde gelecekte önemli bir yere sahip olacağı görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Allcock, S., Young, E. H., Holmes, M., Gurdasani, D., Dougan, G., Sandhu, M. S., Török, M. E. (2017). Antimicrobial resistance in human populations: challenges and opportunities. *Global Health, Epidemiology and Genomics*, 2:1-7.
- Allison, K. R., Brynildsen, M. P., Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473(7346), 216-220.
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio* sp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*. 94: 213-223.
- Asha, A., D.K. Nayak, K.M. Shankar, and C.V. Mohan. 2004. Antigenic expression in biofilm cells of *Aeromonas hydrophila* employed in oral vaccination of fish. *Fish, Shellfish Immunology* 16:429-436.
- Azad, I.S., K.M. Shankar, C.V. Mohan, and B. Kalita. 1999. Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* – standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. *Fish Shellfish Immunology* 9:519-528.
- Barnett, T. C., Kirov, S. M., Strom, M. S., Sanderson, K. (1997). *Aeromonas* spp. possess at least two distinct type IV pilus families. *Microbial pathogenesis*, 23(4), 241-247.
- Basson, A., Flemming, L. A., Chenia, H. Y. (2008). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microbial ecology*, 55(1), 1-14.
- Baydan, E., Yurdakök, B., Aydın, F. G. (2012). Balıklarda antibiyotik kullanımı. *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri Dergisi*, 3(3), 45-52.
- Behlau, I., Gilmore, M. S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, 126(11), 1572-1581.
- Borges, A., Simões, M. (2019). Quorum sensing inhibition by marine bacteria. *Marine drugs*, 17(7), 427.
- BSGM, (2020) T.C Tarım ve Orman Bakanlığı. Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü İstatistik ve Bilgi Genel Daire Başkanlığı. Erişim adresi: [https://www.tarimorman.gov.tr/BSGM] Erişim tarihi:[25.07.2020].
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8(7), 1137-1144.
- Da, S. R., Ploy, M. C. (2012). Resistance acquisition via the bacterial SOS response: the inductive role of antibiotics. *Medecine sciences: M/S*, 28(2), 179-184.
- Das, P, Horton, R. (2016). Antibiotics: achieving the balance between access and excess. *The Lancet*, 387(10014), 102-104.
- Deng, Y., Xu, L., Chen, H., Liu, S., Guo, Z., Cheng, C., & Feng, J. (2020). Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China. *Scientific reports*, 10(1), 1-8.
- Desbois, A. P., Cook, K. J., Buba, E. (2020). Antibiotics modulate biofilm formation in fish pathogenic isolates of atypical *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases*, 43(11), 1373-1379.
- Dogruoz, N., D. Goksay, E. Ilhan-Sungun, and A. Cotuk. 2009. Pioneer colonizer microorganisms in biofilm formation on galvanized steel in a stimulated recirculating cooling- water system. *Journal of Basic Microbiology* 49: S5-S12.
- Duman, M (2017). Gökkuşluğu alabalıklarında görülen Motil *aeromonas* (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), *Yersinia ruckeri* ve *Lactococcus garvieae* bakterilerinin antimikrobiyal duyarlılıkları ve duyarlılıkta rol

- oyunayan genlerin tespiti. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı
- Elliott, D., Burns, J. L., Hoffman, L. R. (2010). Exploratory study of the prevalence and clinical significance of tobramycin-mediated biofilm induction in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(7), 3024-3026.
- Evans, D. J., Allison, D. G., Brown, M. R. W., Gilbert, P. (1990). Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to cefrimide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 26(4), 473-478.
- FAO, (2020). Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State Of World
- FEAP, (2017). Federation of European Aquaculture Producers Annual Report. Erişim adresi: [https://issuu.com/feapsec/docs/feap_ar2017] Erişim tarihi: 15.08.2020
- Fisheries And Aquaculture. Erişim adresi: [http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf] Erişim tarihi: 12.08.2020.
- Gavin, R., S. Merino, M. Altarriba, R. Canals, J.G. Shaw, and J.M Tomas. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiology Letters* 224: 77-83.
- GKGM, (2020). T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Erişim adresi: [https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM]. Erişim tarihi: 12.07.2020.
- Guyard-Nicodème, M., Bazire, A., Hémyery, G., Meylheuc, T., Mollé, D., Orange, N., Chevalier, S. (2008). Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. *Journal of proteome research*, 7(3), 1218-1225.
- Hengzhuang, W., Ciofu, O., Yang, L., Wu, H., Song, Z., Oliver, A., Høiby, N. (2013). High β -lactamase levels change the pharmacodynamics of β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 196-204.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Ahmad, E., Tahseen, Q., Khan, M. S., Alshabib, N. A. (2015). Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 420.
- Jolivet-Gougeon, A., Bonnaure-Mallet, M. (2014). Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 49-56.
- Kirov, S.M., Sanderson, K. (1996). Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* *Microb. Pathog.*, 21(1): 23-34.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010306.
- Lazăr, V., Chifiriuc, M. C. (2010). Architecture and physiology of microbial biofilms. *Roum Arch Microbiol Immunol*, 69(2), 95-107.
- Lewbart, G. A. (2001, January). Bacteria and ornamental fish. In *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* (Vol. 10, No. 1, pp. 48-56). WB Saunders.
- Li, T., Sun, X., Chen, H., He, B., Mei, Y., Wang, D., Li, J. (2020). Methyl anthranilate: a novel quorum sensing inhibitor and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*. *Food microbiology*, 86, 103356.
- Lulijwa, R., Rupia, E. J., Alfaro, A. C. (2020). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 640-663.
- Macia, M. D., Rojo-Molinero, E., Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), 981-990.
- Merino, S., R. Gavin, M. Altarriba, L. Izquierdo, M.E. Maguire, and J.M. Tomas. 2001. The MgtE Mg²⁺ transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence. *FEMS Microbiology Letters* 198: 189195.
- Miranda, C. D., Zemelman, R. (2002). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, 212(1-4), 31-47.
- Moori Bakhtiari, N., Tulabi, Z., Alishahi, M. (2019). Biofilm-Producing Ability and Antibiotic Resistance Pattern of Pathogenic Strains of *Aeromonas hydrophila*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 12(12).
- Nawaz, M., Khan, S. A., Khan, A. A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., Steele, R. (2010). Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food microbiology*, 27(3), 327-331.
- Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405(6790), 1017-1024.
- Naylor, R., Burke, M. (2005). Aquaculture and ocean resources: raising tigers of the sea. *Annual Review of Environment and Resources*, 30.
- Papa, R., Artini, M., Cellini, A., Tilotta, M., Galano, E., Pucci, P., Selan, L. (2013). A new anti-infective strategy to reduce the spreading of antibiotic resistance by the action on adhesion-mediated virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, 63, 44-53.
- Patel, T. S., Nagel, J. L. (2015). Clinical outcomes of Enterobacteriaceae infections stratified by carbapenem MICs. *Journal of clinical microbiology*, 53(1), 201-205.
- Poobalan, S., Thompson, K. D., Ardó, L., Verjan, N., Han, H. J., Jeney, G., Adams, A. (2010). Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine*, 28(20), 3540-3547.

- Pridgeon, J. W., Klesius, P. H. (2011). Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009. *Diseases of aquatic organisms*, 94(3), 249-253.
- Schaible, B., Taylor, C. T., Schaffer, K. (2012). Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 2114-2118.
- Seyfried, E. E., Newton, R. J., Rubert, K. F., Pedersen, J. A., McMahon, K. D. (2010). Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. *Microbial ecology*, 59(4), 799-807.
- Sharma, D., Misba, L., Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), 1-10.
- Silver, A.C, Graf, J. (2009). Prevalence of genes encoding the type three secretion system and the effectors AexT and AexU in the *Aeromonas veronii* group. *DNA and cell biology*, 28(8), 383-388.
- Singh, B. R., Shoeb, M., Sharma, S., Naqvi, A. H., Gupta, V. K., Singh, B. N. (2017). Scaffold of selenium nanovectors and honey phytochemicals for inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 93.
- Sorum, H. (2005). Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*, 213-238.
- Subasinghe, R. P. (2005). Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive veterinary medicine*, 67(2-3), 117-124.
- TAGEM, (2019). T.C Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü. Su Ürünleri Sektör Politika Belgesi 2019-2023. Erişim adresi: [https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Su%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Sekt%C3%B6r%20Politika%20Belgesi%202019-2023.pdf]. Erişim tarihi: 12.08.2020.
- Tan, D., Svenningsen, S. L., Middelboe, M. (2015). Quorum sensing determines the choice of antiphage defense strategy in *Vibrio anguillarum*. *mBio* 6(3):e00627-15
- Tan, D., Hansen, M. F., de Carvalho, L. N., Røder, H. L., Burmølle, M., Middelboe, M., Svenningsen, S. L. (2020). High cell densities favor lysogeny: induction of an H20 prophage is repressed by quorum sensing and enhances biofilm formation in *Vibrio anguillarum*. *The ISME Journal*, 1-12.
- TEPAV, (2017) Türkiye'de Antimikrobiyal direnç: Ekonomik Değerlendirme ve Öneriler. Erişim adresi: [https://www.tepav.org.tr/tr/haberler/s/4251] Erişim tarihi: 15.07.2020
- Tezel, R. (2015). Mılas Bölgesindeki Toprak Havuz İşletmelerinin Mevcut Durum Analizinin Yapılması ve Sürdürülebilirlikleri İçin Çözüm Önerilerinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla.
- Thieme, L., Hartung, A., Tramm, K., Klinger-Strobel, M., Jandt, K. D., Makarewicz, O., Pletz, M. W. (2019). MBEC Versus MBIC: The Lack of Differentiation between Biofilm Reducing and Inhibitory Effects as a Current Problem in Biofilm Methodology. *Biological procedures online*, 21(1), 18.
- TÜİK. (2020). Su ürünleri istatistikleri. TÜİK. Erişim adresi: [https://www.tarimorman.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf]. Erişim tarihi: 12.08.2020.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Yalınkılınç, HS, Kum, C (2016). Balık Hastalıklarında Aşı Kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2(1), 38-46.
- Zdanowicz, M., Mudryk, Z. J., Perliński, P. (2020). Abundance and antibiotic resistance of *Aeromonas* isolated from the water of three carp ponds. *Veterinary Research Communications*, 44(1), 9-18.
- Zhu, W., Zhou, S., Chu, W. (2020). Comparative proteomic analysis of sensitive and multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103930.