

Kültür Levrek (*D. labrax*) Balıklarından İzole Edilen *Vibrio anguillarum* İzolatlarının Karakterizasyonu

Tülay AKAYLI*, Mehmet DURNA

İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İSTANBUL

*Corresponding author e-mail: takayli@istanbul.edu.tr

ÖZ

Bu çalışmada kültür levrek balıklarında (*D. labrax*) Vibriosis'e neden olan *Vibrio anguillarum*'un bakteriyolojik, moleküler ve serolojik karakterizasyonu yanısıra biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 150-200 gr ağırlığında, hastalık belirtileri gösteren 5 adet levrek balığından örneklem yapılmıştır. Hasta balık örneklerinin iç organlarından farklı besiyerlerine bakteriyolojik ekimler yapılmıştır. Bakteri izolatları biyokimyasal özelliklerine göre *V. anguillarum* olarak adlandırılmıştır. İzolatlar, bu türe özgü olan *rpoN* PCR analizi sonucunda 519 bp'lik tek bant oluşturmuştur. *V. anguillarum* O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen lam aglütinasyon ve Dot-blot testleri sonucunda; çalışmadaki hasta kültür levrek balığı örneklerinden izole edilen *V. anguillarum* izolatlarından elde edilen O-antijen ekstraktları yalnızca türün O1 serotipine karşı geliştirilen antikorla reaksiyona girmiştir. Referans bakteriler ile bu çalışmadan izole edilen 5 adet *V. anguillarum* izolatının ELISA plağında biyofilm oluşturma yetenekleri incelenmiştir. Sonuç olarak; bu çalışma ile *V. anguillarum*'un ülkemizde ilk kez Dot-blot metodu ile serotiplendirmesi yapılmıştır.

Anahtar Kelime: Dot-blot, Levrek, *rpoN* PCR, *Vibrio anguillarum*.

Characterization of *Vibrio anguillarum* Isolates Recovered From Diseased Cultured European Sea Bass (*D. Labrax*)

ABSTRACT

The aim of this study is the bacteriological, molecular and serological characterization and determination of the biofilm formation of *Vibrio anguillarum* isolates that induced vibriosis in cultured sea bass (*D. labrax*). In this study, sampling studies were made on 5 fish samples weighing between 150-200 g, showing some disease signs supplied from fish farm. As a result of the bacteriological inoculations on the different media made from the internal organs of the diseased fish samples such as liver, kidney and spleen. Bacterial isolates were identified as *V. anguillarum* according to their biochemical properties. Isolates that were identified as *V. anguillarum* formed a single band of 519 bp in the *rpoN* PCR analysis. In the slide agglutination and Dot-blot tests that were performed by using antibodies raised against *V. anguillarum* serotypes O1, O2 and O3, O-antigen extracts obtained from *V. anguillarum* recovered from diseased cultured sea bass in this study, only reacted with the antibody raised against serotype O1. As a result, with this study, serotyping of *V. anguillarum* by Dot-blot method was examined for the first time in Turkey with this study.

Key Words: Dot-blot, sea bass, *rpoN* PCR, *Vibrio anguillarum*.

To cite this article: Akaylı T, Durna M. Kültür Levrek (*D. labrax*) Balıklarından İzole Edilen *Vibrio Anguillarum* İzolatlarının Karakterizasyonu *Kocatepe Vet J. (2017) 10(3): 134-141*.

GİRİŞ

Doğal ortamı Akdeniz kıyıları olan levrek (*Dicentrarchus labrax*) balığı yurdumuzda yetiştiriciliği yapılan en önemli deniz balığı türüdür (Çelikkale ve ark 1999, Alpbaz 2005, Memiş 2010). Kültür balığı yetiştiriciliğinde bakteriyel balık hastalıklarından kaynaklanan ekonomik kayıpları azaltmak için bu hastalıkların hızlı teşhis yöntemleri kullanılarak en kısa sürede tespit edilmesi ve etkili koruyucu (aşı, prebiyotik, probiyotik) önlemlerin alınması yanı sıra tedavi yöntemlerinin hızla uygulanması gerekmektedir (Timur ve Timur 2003, Buller 2004, Austin ve Austin 2012).

Deniz ve acı sularda yaşayan diğer balık türlerinde olduğu gibi levrek balıklarının da en önemli bakteriyel hastalığı vibriosisdir. Hastalığa neden olan başlıca *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) olmak üzere pek çok *Vibrio* türü bakteri mevcuttur (Buller 2004, Noga 2010, Austin ve Austin, 2012). Günümüzde vibriosis'e karşı tedavi ve aşılama çalışmaları devam etmesine rağmen, kullanılan antibakteriyel maddelere karşı duyarlılığın azalması ve aşısı üretilen bakterinin uygun serotipinin belirlenememesinden kaynaklanan aşılama başarısızlıklar söz konusudur (Knappskog ve ark 1993, Austin ve Austin 2012).

Araştırmacılar *V. anguillarum*'un 23 farklı serotipi olduğunu rapor ederken (Sorensen ve Larsen 1986, Pedersen ve ark 1999) kültürü yapılan ve doğadaki balıklarda daha çok O1 ve O2 serotipleri (Sorensen ve Larsen, 1986) izole edilmekte ve O3 ve O4 serotiplerinin de balıklarda ciddi ölümlere neden olduğu bildirilmektedir (Santos ve ark 1996, Austin ve Austin 2012). Santos ve ark (1996) Fransa'da ki kültür levrek balıklarından O3 serotipini izole ederken yurdumuzdaki bu balık türünde ise O1 serotipinin hastalığa neden olduğu rapor edilmektedir (Tanrıkul ve ark 2004).

V. anguillarum'un bakteriyolojik (Çağırğan ve Yürekli Türk 1996, Korun 2004, Kimberley ve Macnair 2004) ve moleküler düzeyde teşhisi yapıldıktan (Hirono ve ark. 1996, Gonzales ve ark. 2003, Demircan 2004, Güralp 2012) sonra aglütinasyon (Sorensen ve Larsen 1986), Enzim-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Knappskog ve ark 1993) ve Dot-blot gibi farklı serolojik yöntemlerle kullanılarak serotipinin belirlenmesi aşı üretiminin başarısı oldukça önemlidir (Cipriano ve ark 1985, Santos ve ark 1996; A Silva-Rubio ve ark 2008).

Biyofilm; mikroorganizmaların doğada varlığını sürdürmek için kullandıkları bir yaşam tarzıdır (O'toole ve ark 2000, Allison 2003). Akutik patojen bakteriler; biyofilm oluşturma özelliğine bağlı olarak gelişmiş bir enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahiptirler. Farklı bilim insanları yaptıkları çalışmalarda biofilmlerin *V. anguillarum*'un hayatta

kalma, virülans ve stres direncinde önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir (Nagata ve Eguchi 2003, Wang ve ark 2003, Defoirdt ve ark 2005, You ve ark 2007, Nurcan ve ark 2016).

Bu çalışma ile hasta levrek balıklarından izole edilen *V. anguillarum*'un bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerden olan PCR yöntemiyle teşhisinin yapılması, lam aglütinasyon ve Dot-blot yöntemlerini kullanarak bakterinin serotiplendirilmesinin yanısıra biyofilm oluşumunun tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hasta Balık Örneklerinin Temini ve Bakteriyolojik Ekimler

Bu çalışmada kullanılan ve ağırlıkları 150-200 gr. arasında değişen 5 adet hasta levrek balığı 2011 yılında Ege Bölgesi'nde bulunan bir deniz balığı işletmesinden temin edilmiştir. 2-phenoxyethanol (0,4 ml/litre) ile bayıltılan (Noga, 2010) balıkların öncelikle iç ve dış bakıdaki klinik bulguları kaydedilmiştir. Daha sonra bu balıkların karaciğer, dalak ve böbrek gibi iç organlardan %1.5 NaCl içeren Triptik Soy Agar (TSA) besiyerine bakteriyolojik ekimler yapılmış ve petripler 22 °C'de 3-4 gün süresinde etüvde inkübe edilmiştir.

Hasta Balıklardan *V. anguillarum*'un İzolasyonu ve Teşhisi

İnkübasyon sonunda üreyen bakterilerin koloni morfolojileri incelenerek tür düzeyinde teşhisinin yapılabilmesi için rutin bakteriyolojik yöntemler ve biyokimyasal testlere geçilmiştir (Actis ve ark 1999, Austin ve Austin 2012). Referans bakteri olarak İspanya'da ki kültür kalkan (*Psetta maximus*) balıklarından izole edilen *V. anguillarum*'un O1 serotipine ait 1 adet suş ve yurdumuzdaki kültür çipura balıklarından elde edilen 3 adet *V. anguillarum* izolatu kullanılmıştır.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

İzole edilen bakterilere ait DNA örneklerinin hazırlanması için ticari olarak satılan InstaGene™ Matrix (BIO-RAD) kiti tercih edilmiştir. *Vibrio anguillarum*'un *rpoN* genine ait 519 baz çiftini çoğaltmaya yarayan *rpoN-ang5'* isimli 5'-GTTT-ATAGCATCAATGAGGAG-3' ileri ve *rpoN-ang3'* isimli 5'-GAGCAGACAATATGTTGGATG-3' geri primerleri kullanılmıştır. Bu amaçla Termal-döngü cihazına yerleştirilen örnekler için ilk denatürasyon basamağı için 95 °C'de 3 dakika ve ardından 95 °C için 1 dakika, primerlerin bağlanması için 62 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 40 saniye ve final

basamağı olan ürünlerin son uzaması için 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde 30 döngüye ayarlanmıştır. Oluşan PCR ürünleri % 1'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez ile yürütülmüş ve 519 bp rpoN gen parçasının çoğaltıp çoğalmadığı incelenmiştir (Gonzalez ve ark 2003).

V. *anguillarum* İzolatlarının Serolojik Yöntemlerle Serotiplendirilmesi

Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen bakterilerin serotiplendirilmesinde lam aglütinasyon ve Dot-blot teknikleri kullanılmıştır.

Lam aglütinasyon testi için kendi izolatlarımız ve referans bakterilerimizden antijen örnekleri hazırlanmıştır. Bu antijenler ile İspanya'daki Santiago De Compostela Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü İhtiyopatoloji grubundan temin edilen *V. anguillarum* O1, O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilmiş antiserum örnekleri eşit hacimlerde temiz bir lam üzerine damlatılmış ve oluşan çökeltme reaksiyon sonuçları 2-3 dakika içerisinde değerlendirilmiştir (Sorensen ve Larsen 1986, Toranzo ve ark 1987).

V. anguillarum'un izolatlarının serotipinin belirlenmesinde Cipriano ve ark (1985'nin) kullanmış oldukları Dot-blot yöntemi tercih edilmiştir. Öncelikle nitroselüloz membrana 1µl hacminde antijen örnekleri yüklenmiştir. Daha sonra membran %3 oranında jelatin içeren Triptik Soy Broth (TSB) karışımında 1 saat çalkalamalı etüvde bekletilerek blotlama işlemi yapılmış ve 3 kez yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra nitroselüloz membrana Bio-Rad firmasından ticari olarak satın alınan keçide üretilmiş Goat Anti-rabbit IgG (H-L)-AP konjugatı %1 jelatin içeren TSB ile 1/1000 oranında sulandırılarak eklenmiştir. Membran üzerinde mor renkli leke oluşumu (leke) pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

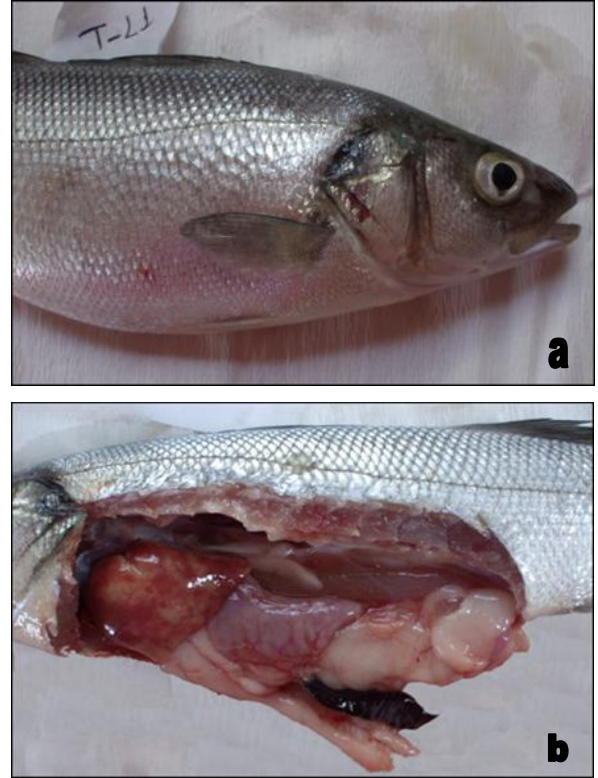
Biyofilm Testi

İzolatların biyofilm oluşturma yetenekleri Woodward ve ark (2000)' nın önermiş oldukları metoda göre tespit edilmiştir. ELISA plaklarının her bir kuyucuğuna 100 µl hacimde bakteri solüsyonu ilave edilmiştir. Plakların 2, 3 ve 4 günlük inkübasyonu sonunda 595 nm' de başlangıç optik yoğunlukları ölçülmüştür. Daha sonra her bir kuyucuğa 130 µl'lik kristal viyole solüsyonu ilave edilmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kez steril distile su ile yıkanan kuyucuklara 130 µl etanol/aseton (7/3) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra optik yoğunluk tekrar ölçülerek her bir bakterinin etanol/aseton sıvısı içerisinde biyofilm oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir.

BULGULAR

Klinik Bulgular

Enfekte balık örneklerinin dış bakışında vücut üzerinde ve özellikle anal bölgede yaygın hemoraji gözlenirken iç bakıda ise karın içinde sıvı birikimi (Resim 1a), iç organlarda hemoraji ve hiperemi yanısıra visceral organlar arasında sıvı birikmesi ve yağlanma yanı sıra dalakta büyüme gibi hastalığa bağlı olarak gelişen klinik bulgular tespit edilmiştir (Resim 1b).



Resim 1. (a) Enfekte levrek balığında vücut üzerinde hemorajiler, (b) iç organlarda yaygın hemoraji ve dalakta büyüme

Figure 1.(a) Hemorrhages on the body in affected sea bass, (b) Common haemorrhage in internal organs and swollen spleen

Bakteriyolojik Bulgular

Bu çalışmadaki hasta levrek balıklarından 5 adet bakteri izolatı elde edilmiştir. Bu bakterilerin TSA besiyeri üzerinde krem renkli koloniler oluşturmaları, Gram-negatif, hareketli, fermentatif, sitokrom-oksidad ve katalaz testlerinde pozitif sonuç vermesi, O/129'a testine hassas olması, arjinin dihidrolaz pozitif, lizin ve ornitin dekarboksilaz negatif, indol, sitrat, jelatin, nitrat ve ONPG test sonuçlarının pozitif olması ve diğer fenotipik özellikleri nedeniyle daha önceki araştırmacıların bulguları ve referans bakterilerin sonuçları ile karşılaştırıldığında *V. anguillarum* olarak adlandırılmışlardır (Tablo 1). Bu bakteriler yanı sıra hasta balıklardan farklı *Vibrio* türleride izole edilmiştir.

Tablo 1: İzolatların fenotipik özellikleri
Table 1: Phenotypic characteristics of isolates

İzolat numarası	1	2	3	4	5	6
Gram	-	-	-	-	-	-
Morfoloji	b	b	b	b	b	b
Hareket	+	+	+	+	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F
O/129 -150µg	H	H	H	H	H	H
TCBS'de üreme	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Arjinin dihidroliz	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-
Ornitrin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-
Üre kullanımı	-	-	-	-	-	-
İndol	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	-
ONPG	+	+	+	+	+	+
Jelatinaz	+	+	+	+	+	+
Amilaz	+	+	+	+	+	+
Eskulin	-	-	-	-	-	-
Sitrat kullanımı	+	-	+	+	+	+
Nitrat	+	+	+	+	+	-
Arabinoz	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+
Mannoz	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
İnositol	-	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	-	-	Z
Amyglidalin	-	-	-	-	-	-
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-
Kanlı agarda hemoliz	β	β	β	β	β	-
4°C'de üreme	+	+	+	+	+	+
37°C'de üreme	+	+	+	Z	+	+
44°C'de üreme	-	-	-	-	-	-
% 0 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-
% 3 NaCl'de üreme	+	+	+	+	+	+
% 5 NaCl'de üreme	+	+	+	Z	+	Z
% 8 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-
% 10 NaCl'de üreme	-	-	-	-	-	-
Teşhis	V.	V.	V.	V.	V.	V.
	<i>anguillarum anguillarum anguillarum anguillarum anguillarum splendidus I</i>					

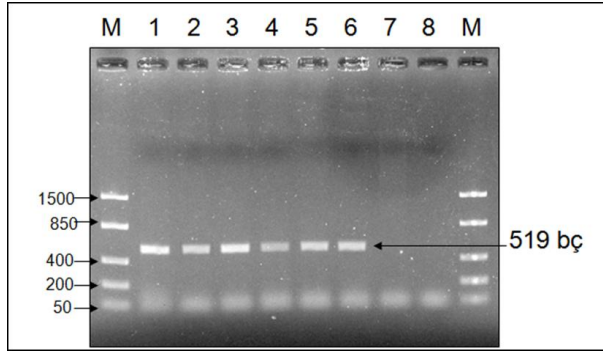
+: pozitif reaksiyon, -: negatif reaksiyon, F: fermentatif, b: basil, Z: zayıf, β: beta hemoliz, H: hassas
+:positive control, -:negative reaction, F: fermentative, b: bacil, Z: weak, β: beta hemolysis, H: sensitive

PCR Ürünlerinin Agarose Jel Elektroforez Bulguları

Biyokimyasal testler sonucu *V. anguillarum* olarak izole ve identifiye edilen 5 adet izolatın PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde analizi sonucu 519 bp rpoN gen parçasının çoğaltımını yaptığı (Resim 2) ve bundan dolayı *V. anguillarum* olduğu tespit edilmiştir.

Aglütinasyon Bulguları

V. anguillarum O1, O2 ve O3 serotiplerini içeren antiserumlar kullanılarak gerçekleştirilen lam aglütinasyon testi sonucunda bakterilerin *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş serumla reaksiyona girdiği ve çökme oluşumu gözlemlendi ancak *V. anguillarum* O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilmiş antiserumlarla herhangi bir reaksiyona girmedikleri görülmüştür.

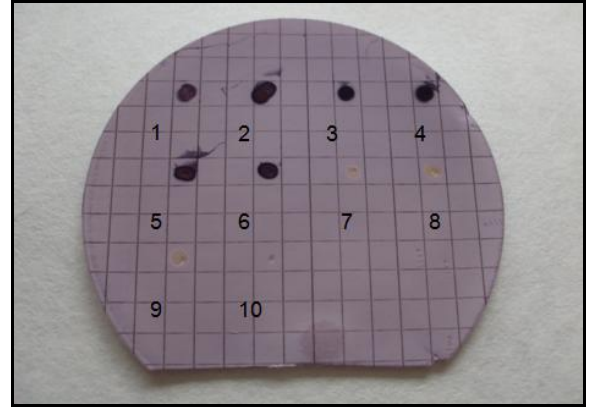


Resim 2: PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü (M: 50bp DNA Ladder plus; 1: Referans bakteri (pozitif kontrol); 2, 3, 4, 5 ve 6 izolatlar; 7, 8: *Vibrio* spp. izolatları (negatif kontrol))

Figure 2: Appearance of PCR products on agarose gel. (M: 50bp DNA Ladder plus, 1: Reference bacteria (positive control); 2, 3, 4, 5 ve 6 isolates; 7, 8: *Vibrio* spp. isolates (negative control))

Dot-blot Bulguları

Dot-blot testi sonucunda; incelenen tüm bakterilerin *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş poliklonal serumla reaksiyona girdiği ve pozitif reaksiyonun göstergesi olan nitroselüloz membranda nokta şeklinde mor renk oluşumu (leke) gözlemlenmiştir (Resim 3). Bu tekniğin kullanılması ile bakterilerin *V. anguillarum* serotip O1 oldukları tespit edilmiştir. Hasta balıklardan elde edilen farklı *Vibrio* sp. karşı ise negatif reaksiyona bağlı olarak mor renk oluşmamıştır (Resim 3).



Resim 3: Dot-blot testinde izolatlara ait mor renk oluşumu 1.Referans bakteri (pozitif kontrol); 2, 3, 4, 5 ve 6: izolatlar; 7, 8 ve 9: *Vibrio* spp.; 10: PBS (negatif kontrol)

Figure 3: Purple color formation of isolates in the dot-blot test 1.Reference bacteria (positive control); 2, 3, 4, 5 ve 6: isolates; 7, 8 ve 9: *Vibrio* spp.; 10: PBS (negative control)

Biyofilm Bulguları

Bu çalışmadaki hasta levrek balıklarından elde edilen izolatlar ve referans bakterinin biyofilm oluşturma yetenekleri için ELISA plağındaki 2., 3. ve 4. gün sonunda kristal viyoleye maruz bırakılarak yapılan ölçümler sonucunda biyofilm oluşumu $0.1 \leq OD_{595} < 1$ değerleri arasında yani pozitif olarak ölçülmüştür.

TARTIŞMA

Vibriozisin en önemli ve yaygın patojeni olan *V. anguillarum*; levrek balıklarında dahil olmak üzere dünyanın çeşitli bölgesindeki vibriosisle enfekte 48 farklı balık türünden de izole edilmiştir (Buller 2004, Noga 2010, Austin ve Austin 2012). Bu çalışma ile kültür levrek balıklarından izole edilen *V.anguillarum* izolatlarının bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisi yapılmış, aglütinasyon ve Dot-blot teknikleri ile serotipi O1 olarak belirlenmiş ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Hasta levrek balıklarında dış bakıda vücut üzerinde hemorajiler, deri renginde koyulaşma, baş ve operkulumda görülen küçük hemorajik lezyonların yanısıra iç bakıda karın içinde sıvı birikimi, karaciğerde yaygın hemoraji ve hiperemi, dalakta büyüme ve iç organlar arasında yağlanma diğer araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir (Actis ve ark 1999, Demircan 2004, Austin ve Austin 2012).

Balık sağlığı ile ilgilenen bilim insanları moleküler bir teknik olan PCR yöntemini *Vibrio anguillarum*'un genetik tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır (Hirono ve ark 1996, Gonzales ve ark 2003). Bu çalışmada hasta levrek balıklarından izole edilen izolatların; moleküler teşhisi için türe özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR yöntemi sonrası

519 bazlık rpoN genini çoğalttıkları tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre yurdumuzdaki levrek balıklarında ki *V. anguillarum*'un genetik tanısında kullandığımız PCR tekniğinin farklı araştırmacıların belirttiği gibi güvenilir ve hızlı bir teknik olduğu bir kez daha kanıtlanmıştır (Demircan 2004, Güralp 2012).

Aglütinasyon ve Dot-blot tekniği; düşük miktarda antiserum ile çok miktarda örnekle çalışılabilmesi, hızlı ve tekrar edilebilirliğinden dolayı bakteriyel balık hastalıklarının teşhisinde ve bakteriyel patojenlerin serotiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılan serolojik yöntemlerdir (Cipriano ve ark 1985, Toranzo ve ark 2005, Silva-Rubio ve ark 2008). Bu çalışmadaki bakteriyel izolatların lam aglütinasyon testinde *V. anguillarum* O1 serotipine karşı geliştirilmiş olan antiserumla reaksiyona girerek çökme reaksiyonu oluşturduğu gözlenirken, aynı izolatlar *V. anguillarum* O2 ve O3 serotiplerine karşı geliştirilen antiserum örnekleri ile herhangi bir reaksiyona girmemiştir. Bu test sonuçlarına göre *V. anguillarum* serotip O1'in sadece salmonid ve kalkan balıklarının (Sorensen ve Larsen 1986, Pedersen ve ark 1999, Knappskog ve ark 1993) patojeni değil aynı zamanda bir deniz balığı türü olan levrek balıklarında da patojen olduğu bir kez daha ortaya çıkarılmıştır (Çağırğan ve Yürekli Türk 1996). Bu çalışmadaki nitroselüloz membran üzerinde poliklonal antikor kullanılarak gerçekleştirilen Dot-blot testinde; izolatların *V. anguillarum* O1 serotipini içeren poliklonal serumla reaksiyona girmesi sonucu bu membran üzerinde mor renk oluşumu (leke) gözlenmiş ve sonuç olarak bu izolatların serotip O1 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler göstermiştir ki Dot-blot tekniği yurdumuzdaki kültür balıklarından elde edilen *V. anguillarum* izolatlarının serotiplerinin belirlenmesinde, benzerlik gösteren suşların ayırt edilmesinde kullanılan hassas bir metottur (Cipriano ve ark 1985, Sorensen ve Larsen 1986, Bolinches ve ark 1990, Santos ve ark 1996, Silva-Rubio ve ark 2008).

Biofilm oluşturma yeteneğine sahip Gram-negatif bakteriler besin yokluğu, pH değişiklikleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (Defoirdt ve ark 2005, Pearson ve ark 1995). Diğer araştırmacıların (Nagata ve Eguchi 2003, Wang ve ark 2003, Defoirdt ve ark 2005, You ve ark 2007) da belirttiği gibi çalışmamızdaki balıklardan izole ve identifiye edilen *V. anguillarum*'un biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Dünyada bu etkenden kaynaklanan hastalığın tedavisinde özellikle oksitetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinin sebebinin bakterinin biyofilm özelliğinden kaynaklanan ekstrakromozomal DNA ve direnç plazmidlerinin değişimine bağlı olarak genetik yapısının değişmesinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Lindell 2012).

SONUÇ

Bu çalışmadaki hasta levrek balıklarında *V. anguillarum*'un bakteriyolojik ve moleküler teşhisinin yapılmış, bu bakterinin serolojik testlerden olan lam aglütinasyon ve Dot-blot tekniğine göre serotipinin O1 olduğu belirlenirken bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğinin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Dot-blot tekniği kullanılarak ilk kez bu çalışma ile adı geçen bakterinin serotiplendirilmesinin yapılması mümkün olmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir. Çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 10072 ve 43910 numaralı projeleri ile desteklenmiştir. İspanya'da ki Santiago de Compostela Üniversitesi, Biyoloji Fakültesi'nde çalışan Prof. Dr. Juan L. Barja ve Prof. Dr. Alicia Estevez Toranzo'ya çalışmada kullandığımız referans bakteri ve antiserum örnekleri için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Actis LA, Tolmasky ME, Crosa JH.** Vibriosis, In: *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3, Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. (eds). CAB Intern. Publ., UK. 1999, pp. 523-558.
- Allison DG.** 2003, The biofilm matrix. *Biofouling*. 1996; 19: 139-150.
- Alpbaz A.** *Su Ürünleri Yetiştiriciliği*, Alp Yayınevi, İzmir. 2005.
- Austin B, Austin DA.** Vibrionaceae Representatives, In: *Bacterial Fish Pathogens*, Eds; Austin B, Austin DA., 5th Ed., Springer Dordrecht Heidelberg, London, UK. 2012; pp.369-389.
- Bolinches J, Lemos ML, Fouz B, Cambra M, Larsen JL, Toranzo AE.** Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. *J Aquat Anim Health*.1990; 2 (1): 21-29.
- Buller N.** Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: a Practical Identification Manual, Ed: NB Buller, CABI Publishing, Oxford, İngiltere. 2004, 261 pp.
- Çağırğan H, Yürekli Türk O.** Kültürü yapılan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavisi üzerine bir araştırma. *Bornova Vet. Kontrol ve Araş. Ens. Müd. Der.* 1996; 21: 113-122.
- Çelikkale MS, Düzgüneş E, Okumuş D.** Türkiye Su Ürünleri Sektörü Potansiyeli, Mevcut Durumu,

- Sorunları ve Çözüm Önerileri, Eds; Çelikkale MS, Düzgüneş E, Okumuş D., İstanbul Ticaret Odası, İstanbul, Türkiye.1999.
- Cipriano RC, Pyle JB, Starliper CE, Pyle SW.** Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by dot blot assay. J Wildl Dis. 1985; 21: 211-218.
- Defoirdt T, Bossier P, Sorgeloos P, Verstraete W.** The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. Environ. Microbiol. 2005;7(8): 1239–1247.
- Demircan MD.** Deniz balıklarında Vibriozis'e neden olan *Vibrio anguillarum*'un PCR yöntemi ile tanısı. Yüksek Lisans Tezi, 2004, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Demircan D, Candan A.** Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* gene) associated with vibriosis in marine fish in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2006; 30: 305-310.
- Gonzalez SF, Osorio CR, Santos Y.** Development of a PCRbased Method for The Detection of *Listonella anguillarum* in Fish Tissues and Blood Samples. Dis. Aquat. Org. 2003; 55: 109-115.
- Güralp H.** Deniz kültür balıklarında görülen bakteriyel patojenlerin teşhisi ve antibakteriyel maddelere duyarlılıklarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2012.
- Hirono I, Masuda T, Aoki T.** Cloning and Detection of the Hemolysin Gene of *Vibrio anguillarum*. Microb Pathog. 1996; 21: 173-182.
- Kimberley AW, Macnair NG.** Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures. Eds: Kimberley AW, Macnair NG, Iowa State Press, Iowa, USA, 2004.
- Knappskog DH, Rodseth OM, Slinde E, Endersen C.** Immunochemical analyses of *Vibrio anguillarum* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., suffering from Vibriosis. J. Fish Dis.1993; 16: 327-338.
- Korun J.** Kültür Levrek Balıklarında (*Dicentrarchus labrax*, L.) Vibriosis ve Pasteurellosis'in Bazı Diagnostik Kitler ve Laboratuar Yöntemleri ile Teşhisi Üzerine Bir Çalışma. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2004,143 pp.
- Lindell K.** Cell-to-Cell communication and virulence in *Vibrio anguillarum*. Department of Molecular Biology, Umea Center for Microbial Research UCMR, Umea, Sweden, 2012.
- Memiş D.** Deniz Balıkları Yetiştiriciliği, Filiz Kitabevi Basım Yayın Dağıtım, 2010, İstanbul, Türkiye.
- Nagata EF, Eguchi M.** Survival of *Vibrio anguillarum*, a Fish Pathogen, in Freshwater by Forming Biofilms. Microbes Environ. 2003; 18(4): 196-202.
- Noga EJ.** Fish Disease: Diagnosis and Treatment, Second Edition, Ed: Noga EJ, Iowa State University Press, Iowa, 2010.
- Nurcan N, Kubilay A, Boşgelmez-Tınaz G.** *Vibrio anguillarum* suşlarında çevreyi algılama sistemi ve virülens faktörlerinin incelenmesi. Eğirdir Su Ür. Fak. Der. 2016; 12(1):49-57.
- O'toole G, Kaplan H, Kolter R.** Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000; 54, 49-79.
- Pearson PJ, Passadori L, Iglewski BH, Greenberg EP.** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995, 92: 1490-1494.
- Pedersen K, Grisez L, Van Houdt R, Tiainen T, Ollevier F, Larsen JL.** Extended Serotyping Scheme for *Vibrio anguillarum* with the Definition and Characterization of Seven Provisional O-Serogroups. Curr Microbiol. 1999; 38: 183-189.
- Sorensen UBS, Larsen JL.** Serotyping of *Vibrio anguillarum*. Appl. Environ. Microbiol.1986; 51(3): 593-597.
- Timur G, Timur M.** Balık Hastalıkları. Eds; Timur G, Timur M, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayını, İstanbul. 2003.
- Toranzo AE, Baya AM, Roberson BS, Barja JL, Grimes DJ, Hetrick FM.** Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. Aquaculture.1987; 61, 81-97.
- Santos Y, Pazos F, Toranzo AE.** Biochemical and serological analysis of *Vibrio anguillarum* related organisms. Dis Aquat Org.1996; 26: 67-73.

- Silva-Rubio A, Avendaño-Herrera R, Jaureguiberry B, Toranzo AE, Magariños B.** First description of serotype O3 in *Vibrio anguillarum* strains isolated from salmonids in Chile. *J Fish Dis.* 2008; 31(3): 235–239.
- Wang YS, Lauritz J, Jass J, Milton DL.** Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation. *Microbiology.* 2003; 149: 1061–1071.
- Woodward MJ, Marcjanna S, Siprings AK, Humphrey TJ.** The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* to inanimate surfaces. *J Med Microbiol.* 2000; 49: 481-487.
- You JL, Xue XL, Cao LX, Lu X, Wang J, Zhang LX, Zhou SN.** Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 76:1137–1144 .