

Balıktan İzole Edilen Hareketli *Aeromonas* Türlerinin Bazı Ekstrasellüler Enzimlerinin Belirlenmesi

Fatma Özdemir* , Seza Arslan 

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 14030, Bolu, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Balıklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin bazı ekstrasellüler enzimleri incelenmiştir.
- Hareketli *Aeromonas* izolatlarında ekstrasellüler enzimleri kodlayan genlerin varlığı PZR tekniği ile tespit edilmiştir.
- A. hydrophila* izolatlarının tamamının (%100) *eprCAI*, *ser* ve *lip* enzim genlerini taşıdığı ortaya çıkarılmıştır.
- Hareketli *Aeromonas* izolatları en az bir veya daha fazla ekstrasellüler enzim geni için pozitif bulunmuştur.

Makale Bilgileri

Geliş: 01.03.2021
Kabul: 31.03.2021

Anahtar Kelimeler

Hareketli *Aeromonas* spp.,
Ekstrasellüler enzimler,
Balık

Özet

Aeromonas türleri yaygın olarak çevrede özellikle deniz ve taze su kaynaklarında bulunmakta, balık ve deniz ürünlerini sıklıkla kontamine etmektedir. Bu türler insanlarda ve balıklarda enfeksiyon etkeni olan fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda gastrointestinal, ekstraintestinal ve yara enfeksiyonlarına neden olur. Bu çalışmada, açık halk pazarı ve marketlerden temin edilen balık örneklerinden elde edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde bazı ekstrasellüler enzim genlerinin varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 8 *A. hydrophila*, 19 *A. caviae* ve 9 *A. veronii biovar sobria* olmak üzere toplam 36 hareketli *Aeromonas* izolatında sıcaklık-duyarlı proteaz (*eprCAI*), serin proteaz (*ser*), elastaz (*ela*) ve lipaz (*lip*) genlerinin varlığı PZR tekniği ile araştırılmıştır. İzolatların 8'i (%22,2) *eprCAI*, 32'si (%88,9) *ser*, 23'ü (%63,9) *ela* ve 17'si (%47,2) *lip* geni için pozitif bulunmuştur. *A. hydrophila* izolatlarının hepsinde (%100) *eprCAI*, *ser* ve *lip* enzim genlerinin taşındığı saptanmıştır. *A. veronii biovar sobria* izolatlarının tamamında *ser* gen bölgesi pozitif bulunmuştur. Ancak bu izolatların hiçbirinin *eprCAI* ve *lip* enzim genlerini taşımadığı belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları, balık örneklerinden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde en az bir veya daha fazla ekstrasellüler enzim kodlayan genlerin varlığını göstermiştir. Virulans ve gıdanın bozulması ile ilişkili ekstrasellüler enzimleri salgılayan hareketli *Aeromonas* izolatlarının gıdada varlığı, gıda hijyeni ve güvenliği açısından sorun oluşturabilir.

Detection of Some Extracellular Enzymes of Motile *Aeromonas* Species Isolated from Fish

Highlights

- Some extracellular enzymes of motile *Aeromonas* species isolated from fish were examined.
- Presence of genes encoding extracellular enzymes in motile *Aeromonas* isolates was detected by the PCR technique.
- It was found that all *A. hydrophila* isolates (100%) harbored *eprCAI*, *ser* and *lip* enzyme genes.
- Motile *Aeromonas* isolates were found to be positive for at least one or more extracellular enzyme genes.

Article Info

Received: 01.03.2021
Accepted: 31.03.2021

Keywords

Motile *Aeromonas* spp.,
Extracellular enzymes,
Fish

Abstract

Aeromonas species are found in the environment, especially in marine and fresh water sources, and frequently contaminate fish and sea products. These species are opportunistic pathogens that are infectious agents in humans and fishes. They cause gastrointestinal, extraintestinal and wound infections in humans. The aim of this study was to detect the presence of some extracellular enzyme genes in motile *Aeromonas* species which were isolated from fish obtained from open public bazaars and supermarkets. Presence of the temperature-sensitive protease (*eprCAI*), serine protease (*ser*) and lipase (*lip*) genes in the 36 motile *Aeromonas* isolates (8 *A. hydrophila*, 19 *A. caviae* and 9 *A. veronii biovar sobria*) was investigated using PCR in this study. Eight (22.2%) of the isolates were positive for *eprCAI*, 32 (88.9%) for *ser*, 23 (63.9%) for *ela* and 17 (47.2%) for the *lip* gene. All *A. hydrophila* isolates carried the *eprCAI*, *ser* and *lip* genes. All *A. veronii biovar sobria* isolates were positive for the *ser* gene. However, none of these isolates carried the *eprCAI* and *lip*. The results of this study showed that motile *Aeromonas* species from fish had at least one or more genes encoding extracellular enzymes. The presence of motile *Aeromonas* isolates producing extracellular enzymes associated with virulence and food spoilage in food may pose a problem in terms of food hygiene and safety.



1. GİRİŞ

Aeromonas cinsi bakteriler Gram negatif, oksidaz ve katalaz pozitif fakültatif aerobtur. *Aeromonas* türleri 0- 42°C gibi çok geniş bir sıcaklık aralığında ve pH 4,5- 9 arasında üreyebilmektedir [1, 2]. *Aeromonas* türleri doğada özellikle deniz, tatlı su ve sucul organizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca *Aeromonas*, atık sularda, toprak ve gıdada da bulunabilir [2]. *Aeromonas*'ın et, balık, kabuklu deniz ürünleri, süt ürünleri, taze sebze ve meyve gibi çeşitli gıdalardan izole edildiği bildirilmiştir [3-9]. Bununla birlikte, *Aeromonas* türleri ile ilgili birkaç gıda kaynaklı salgın bildirilmiştir [10-14]. Gıdalarda *Aeromonas*'ın gelişmesinde sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi faktörler etkilidir [15]. Çiğ balık ve et ürünleri gibi gıdalarda tuz (sodyum klorür) yaygın koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ancak *Aeromonas* %4'e kadar tuz konsantrasyonu içerisinde büyüebilmektedir [16, 17]. Buzdolabı sıcaklığında üreyebilme yeteneğine sahip olan hareketli *Aeromonas* türlerinin soğukta muhafaza edilen balık ve et ürünlerinde canlı kalarak çoğalabilmesi gıdaların bozulması ve gıda kaynaklı hastalıklar açısından önemli risk oluşturmaktadır [16-18].

Aeromonas türleri arasında *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* ve *Aeromonas sobria* hareketlidir. Bu türler en iyi 35-37°C'de gelişen mezofilik bakteriler olduklarından insanlar, balıklar ve diğer çeşitli hayvanlar için fırsatçı patojenlerdir [2, 15]. *Aeromonas*'ın insanlarda başlıca iki tip gastroenterite yol açtığı bilinmektedir. Birincisi, kolera tipinde olup diyare ve hafif ateş tablosu eşlik eder. İkincisi ise dizanteri tipi olarak bilinen kanlı ve mukuslu ishal ile seyreden bir bağırsak enfeksiyonudur [2, 19]. *Aeromonas* suşlarının hem ishali hem de ishali olmayan bireylerin dışkılarından izole edildiği bildirilmiştir [20]. *Aeromonas* kökenli gastroenterit her yaşta görülebilmekle beraber, özellikle 2 yaşın altındaki küçük çocuklarda ve 50 yaşın üzerindeki kişilerde daha sık karşılaşılan bir hastalıktır [19, 21]. *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* insanlarda gastrointestinal enfeksiyonlarının yanı sıra yumuşak doku enfeksiyonları, hemolitik üremik sendrom, septisemi, endokardit, menenjit, pnemoni, artrit, peritonit, göz enfeksiyonları ve osteomyelit gibi çeşitli hastalıklara neden olurlar [2, 18].

Su ürünleri yetiştiriciliğinde balıklarda oldukça sık rastlanılan patojenler arasında en çok izole edilen türler *Aeromonas* cinsine ait olanlardır. Hareketli *Aeromonas* türleri arasında yer alan *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. caviae* önemli balık patojenleri olarak kabul edilmekte olup, hareketli *Aeromonas* septisemisi olarak bilinen hemorajik septisemiye neden olurlar. Enfekte olmuş balıkların yüzgeç diplerinde, karın altında, ağız bölgesinde, alt çenede, anüs etrafında kızarıklık ve hemorajik alanlar görülür. Vücutta çeşitli derinlikte ülseratif lezyonlar ortaya çıkabilir. Yüksek ölüm oranları ile sonuçlanan çeşitli enfeksiyonlara yol açarlar [22, 23]. Hareketli *Aeromonas* türlerinin balıklara bulaşması su ve temas yoluyla olup, kültür balıklarında enfeksiyonların yayılma riski daha fazladır. Bu enfeksiyonlar sonucunda balıkçılık ve su ürünleri yetiştiriciliği sektöründe önemli ekonomik kayıplar oluşmaktadır [17, 21].

Aeromonas'ın konakta hastalık yapma yetenekleri çok karmaşıktır ve birçok faktör bu mikroorganizmanın konak hücrelerin içine girmesini sağlayarak hastalık oluşturabilmesinde rol alır [2, 24]. *Aeromonas*, ekstrasellüler enzimler, sitotoksinler ve biyolojik olarak aktif moleküller gibi çok sayıda virulans faktörü üretir [2, 25-27]. Proteaz, lipaz, elastaz, amilaz, deoksiribonükleaz, lesitinaz, kitinaz, nükleaz ve jelatinaz dahil olmak üzere çeşitli ekstrasellüler enzimler *Aeromonas* tarafından üretilir. Bu enzimler *Aeromonas*'ın ekolojisi, hayatta kalma ve patojenitesi açısından önemlidir [2, 28-30]. *Aeromonas*'ın virulansı türden türe ve suştan suşa varyasyonlar göstermektedir [2]. *Aeromonas* türleri üç değişik proteaz enzimi salgılamaktadır. Bunlardan biri ısıya dayanıksız serin proteaz ve diğer ikisi ise metallo proteaz enzimleridir. Metallo proteazlardan biri ısıya dayanıklı etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) duyarlı diğeri ise ısıya dayanıklı EDTA kararlıdır [31]. *Aeromonas* türleri, molekül kütlesi 68 kDa ve 38 kDa olan ısıya dayanıksız ve ısıya dayanıklı proteaz enzimi üretir [32-34]. Ayrıca, *A. hydrophila* ve *A. caviae* türlerinde ağırlığı yaklaşık 19 kDa olan bir metallo proteaz tespit edilmiştir [34-36]. Bazı çalışmalar, *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. caviae*'nin hücre dışı serin proteazları ve metallo proteazları salgıladığını bildirmiştir [37-41]. *Aeromonas* tarafından üretilen proteazlar, doğuştan gelen konukçu savunmalarını ve hücre büyümesi üzerindeki besin tedarikini önleyerek enfeksiyonun istilasında ve yerleşmesinde kritik bir rol oynar [25, 33, 34, 37]. Ayrıca proteazlar, *Aeromonas*'ın birçok farklı ortama uyum sağlamasına izin veren ve diğer organizmalarla ekolojik etkileşimleri destekleyen çok yönlü metabolik kapasiteye katkıda bulunur [29, 34,

42]. Elastaz, *Aeromonas*'ın patogeneğinde önemli bir virulans faktör olan bir çinko metallo proteazdır [25]. Bu metallo-elastaz ditiyotreitöl tarafından inhibe edildiğinde optimum aktivitenin görüldüğü pH değeri 8 olarak bulunmuştur [33]. Lipaz, *Aeromonas* türlerinin bir diğeri önemli virulans faktörü olarak kabul edilir. Konağın sitoplazmik zarının yapısının değiştirilmesinde ve böylece etkenin patojenitesinin güçlenmesinde etkili olur [43]. Konağı dokuyu kolonize etmelerine ve dokunun nekrozuna yardımcı olur [25]. Literatürde birçok çalışma hareketli *Aeromonas* türlerinde sıcaklık-duyarlı proteaz (*eprCAI*), serin proteaz (*ser*), elastaz (*ela*) ve lipaz (*lip*) dahil olmak üzere çeşitli ekstrasellüler enzim genlerinin varlığını bildirmiştir [7, 24, 44-47].

Balık protein açısından oldukça zengin bir gıda olup, genellikle sağlıklı ve dengeli beslenmede ayrı bir öneme sahiptir. Tüm dünyada insanlar tarafından tüketilmek üzere yaygın olarak tercih edilmektedir. Patojenlerle, özellikle *Aeromonas* türleri ile kontamine olmuş balık ve su ürünlerinin tüketimi, insanda gastrointestinal enfeksiyonlar gibi çeşitli enfeksiyonların nedeni olabilir. *Aeromonas* ayrıca en önemli balık patojeni olarak kabul edilmektedir. *Aeromonas* tarafından salgılanan proteaz ve lipaz gibi ekstrasellüler enzimler, *Aeromonas*'ın patogeneğinde ve balıkların bozulmasında önemli bir rol oynayabilir [10, 16, 18]. Bu nedenle, bu çalışma tatlı su balığı olan alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) örneklerinden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde sıcaklık-duyarlı proteaz (*eprCAI*), serin proteaz (*ser*), elastaz (*ela*) ve lipaz (*lip*) gibi virulans ve gıdaların bozulması ile ilişkili çeşitli ekstrasellüler enzimleri kodlayan genlerin varlığını araştırmayı amaçlamıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bakteri İzolatları

Bolu ilinde market ve açık halk pazarlarında satışa sunulan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) örneklerinden izole edilen toplam 36 hareketli *Aeromonas* izolatı [48] bu çalışma kapsamına alınmıştır. Bu izolatların 8'i *A. hydrophila*, 19'u *A. caviae* ve 9'u *A. veronii* bv. *sobria*'dır. Gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) broth içinde -80°C' de saklanan izolatlar yine aynı besiyeri ortamına aktifleştirilmek üzere ekim yapılmış ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası BHI broth kültürlerinden bir öze dolusu alınarak BHI agar besiyerine çizgi ekimleri yapılmış ve 37°C' de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

2.2. DNA İzolasyonu

Alabalık örneklerinden elde edilen hareketli *Aeromonas* izolatlarının genomik DNA'sı setil trimetil amonyum bromür (CTAB) ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir [49]. Geliştirilen saf bakteri kültüründen bir öze dolusu alınarak 5 mL BHI broth içeren tüplere inoküle edilmiştir. Bu bakteri süspansiyonlarını içeren sıvı besiyerleri 37°C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra bu bakteri süspansiyonları 1.5 mL'lik steril ependorf tüplerine alınarak santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 567 µL TE tamponunda (10 mM Tris, 1 mM EDTA) süspanse hale getirilmiştir. Daha sonra 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10) ve 3 µL proteinaz K (20 mg / mL) eklenerek 37°C' de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma 100 µL NaCl (5M) ilave edildikten sonra, 80 µL setil trimetil amonyum bromür ilave edilmiştir. 65°C' de 10 dakika inkübe edilmiştir. Tüplere eşit hacimde kloroform/izoamil alkol (24:1) çözeltisi eklenmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve 25:24:1 oranında hazırlanmış fenol/kloroform/izoamilalkol eşit miktarda eklenmiştir. Santrifüj işleminden sonra DNA, izopropanol ile çöktürülmüş ve %70'lik etanol ile yıkanmıştır. Son olarak, pelet DNA 100 µL TE tamponu içerisinde çözündürülmüştür.

2.3. Ekstrasellüler Enzimleri Kodlayan Genlerin Belirlenmesi

Bu çalışmada, *Aeromonas* izolatlarında ekstrasellüler enzimleri kodlayan genlerin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile tespit edilmiştir. Hareketli *Aeromonas* izolatlarının bazı ekstrasellüler enzim genlerinin varlığını araştırmak için daha önce tanımlanan primer çiftleri kullanılmıştır [41, 44, 50]. Çizelge

1’de ekstrasellüler enzim gen amplikasyonu için kullanılan ve daha önce tanımlanmış primer dizileri ile beklenen PZR ürünlerinin büyüklükleri belirtilmiştir.

Çizelge 1. Ekstrasellüler enzimleri kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler

Gen	Primer	Oligonükleotid dizileri (5'-3')	Ürün uzunluğu (baz çifti)	Kaynaklar
<i>eprCAI</i>	eprCAI F eprCAI R	GCTCGACGCCAGCTCACC GGCTCACCGCATTGGATTCC	387	[49]
<i>ser</i>	Ser-F Ser-R	ACGGAGTGC GTTCTTCCTACTCCAG CCGTTTCATCACACCGTTGTAGTCG	211	[41]
<i>ela</i>	Ela-F Ela-R	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	513	[44]
<i>lip</i>	Lip-F Lip-R	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	382	[44]

Bu çalışmada her bir enzim genine ilişkin PZR reaksiyon bileşenleri *Çizelge 2*'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Kullanılan PZR reaksiyon bileşen konsantrasyonu ve miktarı

PZR bileşenleri	Ekstrasellüler enzim genleri			
	<i>eprCAI</i> (Sıcaklık-duyarlı proteaz)	<i>ser</i> (Serin proteaz)	<i>ela</i> (Elastaz)	<i>lip</i> (Lipaz)
PZR tamponu	10X (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9,1, 0,1%, Triton X-100)			
MgCl ₂ (mM)	4	4	4	4
dNTP (mM)	0,2	0,2	0,2	0,2
Primers (pmol)	1,5 µM	1 µM	1 µM	1 µM
Taq DNA polimeraz (U)	1,5	1,5	1,5	1,5
Kalıp DNA (µL)	5	3	3	3
PZR grade su (µL)	31,7	34,7	34,7	34,7
Toplam (µL)	50	50	50	50

Sıcaklık-duyarlı proteaz (*eprCAI*) geninin amplikasyonu 94°C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonu takiben 30 döngü olmak üzere, 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 60°C’de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C’de 1 dakika uzama ve en son 72°C’de 10 dakika son uzama olacak şekilde yapılmıştır.

Serin proteaz (*ser*) geni için reaksiyon koşulları 94°C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonu takiben 30 döngü olmak üzere, denatürasyon 94°C’de 1 dakika, primer yapışması 64°C’de 30 saniye, uzama 72°C’de 30 saniye ve son uzama 72°C’de 5 dakika olacak şekilde yapılmıştır.

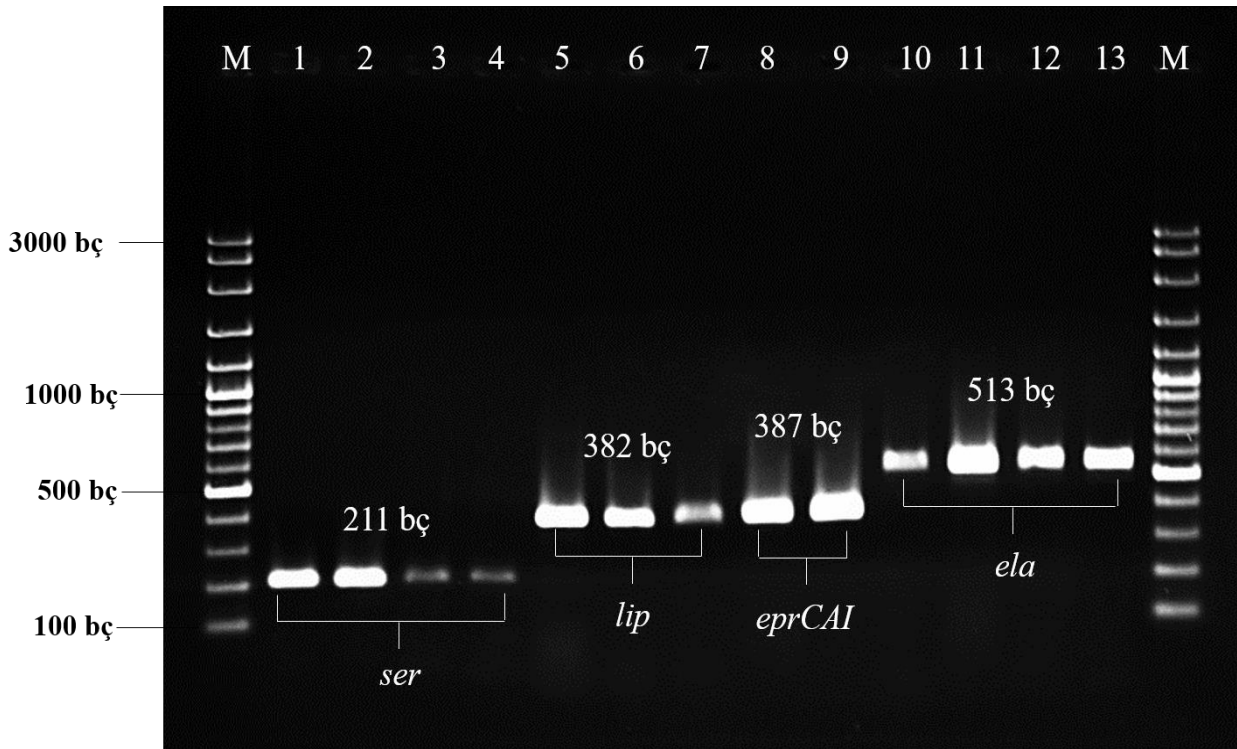
Elastaz (*ela*) ve lipaz (*lip*) genleri için reaksiyon koşulları 95°C’de 5 dakika ilk denatürasyonu takiben 25 döngü 95°C’de 25 saniye denatürasyon, 55°C’de 30 saniye primer yapışması, 72°C’de 1 dakika uzama ve 72°C’de 5 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

PZR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünler %1,5 agaroz jelde 80 volt’da 45 dakika boyunca elektroforez cihazında yürütüldükten sonra UV jel dökümantasyon sistemi (DNR Minilumi Bio-imaging

Systems, Jerusalem, Israel) kullanılarak görüntülenmiştir. Moleküler büyüklük belirteci olarak 100 bç DNA ladder (Vivantis) kullanılmıştır. Bu çalışmada, *A. hydrophila* ATCC 7966 suşu ekstrasellüler enzim genlerinin saptanması için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, hareketli *Aeromonas* türlerinde sıcaklık-duyarlı proteaz (*eprCAI*), serin proteaz (*ser*), elastaz (*ela*) ve lipaz (*lip*) gibi ekstrasellüler enzimleri kodlayan genlerin varlığı tespit edilmiştir. Ekstrasellüler enzimlere ait gen bölgeleri PZR ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonu sonrası ekstrasellüler enzimleri kodlayan genleri taşıyan *Aeromonas* türleri arasından temsilen seçilen izolatların jel resmi Şekil 1’de gösterilmiştir.



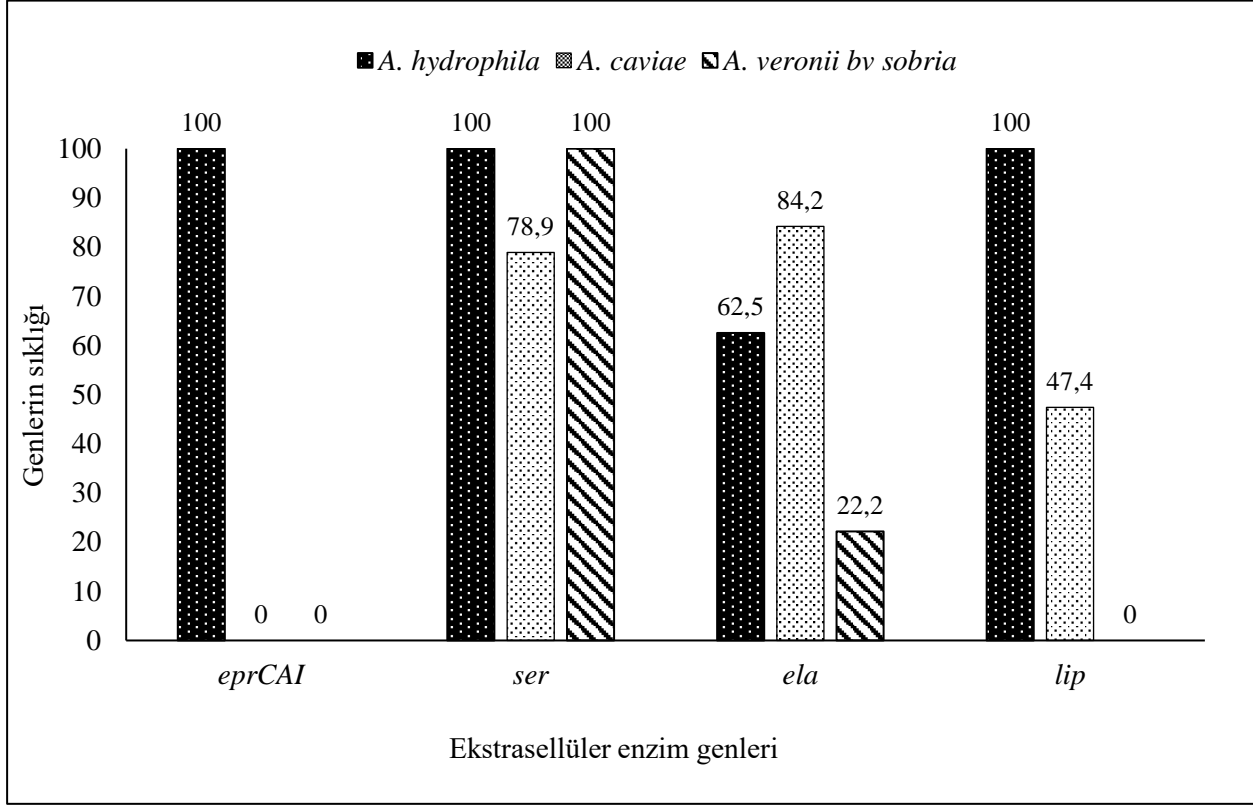
Şekil 1. Ekstrasellüler enzim geni taşıyan *Aeromonas* izolatlarına ait agaroz jel görüntüsü. Hat M; Moleküler ağırlık standardı (100 bç, Vivantis), Hat 1, 5, 8, 10; Pozitif kontrol (*A. hydrophila* ATCC 7966), Hat 2, 3, 4; *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. veronii* *bv sobria*, Hat 6, 7; *A. hydrophila* ve *A. caviae*, Hat 9; *A. hydrophila*, Hat 11, 12, 13; *A. hydrophila*, *A. caviae*, ve *A. veronii* *bv sobria* izolatları

Bu çalışma sonucunda, 36 hareketli *Aeromonas* izolatı arasında *eprCAI*, *ser*, *ela* ve *lip* ekstrasellüler enzim gen varlığının dağılımı Çizelge 3’te gösterilmiştir.

Çizelge 3. Alabalık örneklerinden tanımlanan 36 hareketli *Aeromonas* izolatında ekstrasellüler enzim genlerinin varlığı

Genler	Pozitif izolat sayısı	Gen sıklığı (%)
Sıcaklık-duyarlı proteaz (<i>eprCAI</i>)	8	22,2
Serin proteaz (<i>ser</i>)	32	88,9
Elastaz (<i>ela</i>)	23	63,9
Lipaz (<i>lip</i>)	17	47,2

Aeromonas izolatlarının en fazla *ser* genine (%88,9), en az ise *eprCAI* genine sahip olduğu (%22,2) bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda, hareketli *Aeromonas* türlerinde tespit edilen *eprCAI*, *ser*, *ela* ve *lip* ekstrasellüler enzim genlerinin dağılımı Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. Alabalıktan izole edilen hareketli *Aeromonas* türleri arasında ekstrasellüler enzim genlerinin dağılımı

Alabalık örneklerinden elde edilen 8 *A. hydrophila* izolatın hepsinde (%100) *eprCAI*, *ser* ve *lip* genlerin varlığı saptanmıştır. Ancak 5 *A. hydrophila* izolatı (%62,5) *ela* geni için pozitif bulunmuştur. *A. caviae* izolatlarında %78,9, %84,2 ve %47,4 oranında sırasıyla *ser*, *ela* ve *lip* genleri belirlenmiştir. Toplam 9 *A. veronii bv sobria* izolatının hepsi (%100) *ser* genini taşıdığı belirlenmiştir. Ancak *A. veronii bv sobria* izolatların hiçbirinin *eprCAI* ve *lip* genlerini taşımadığı saptanmıştır. Bu çalışmada, hareketli *Aeromonas* türlerinin hepsi en az bir veya daha fazla virulans ile ilişkili olduğu bilinen ekstrasellüler enzim genleri için pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen enzim gen profillerinin *Aeromonas* türleri arasında dağılımı Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 4. Alabalıktan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde ekstrasellüler enzim gen profilleri

Hareketli <i>Aeromonas</i> türleri	Gen kombinasyonu	Profil tipi	Pozitif izolat sayısı (%)
<i>A. hydrophila</i> (n=8)	<i>eprCAI, ser, ela, lip</i>	I	5 (13,9)
	<i>eprCAI, ser, lip</i>	II	3 (8,3)
<i>A. caviae</i> (n=19)	<i>ser, ela, lip</i>	III	6 (16,7)
	<i>ser, ela</i>	IV	6 (16,7)
	<i>ela, lip</i>	V	3 (8,3)
	<i>ser</i>	VI	3 (8,3)
	<i>ela</i>	VII	1 (2,8)
<i>A. veronii</i> bv <i>sobria</i> (n=9)	<i>ser, ela</i>	IV	2 (5,6)
	<i>ser</i>	VI	7 (19,4)
Toplam			36 (100)

Hareketli *Aeromonas* türleri arasında 7 farklı enzim gen profili tespit edilmiştir. Bu türler arasında 5 farklı enzim profili taşıyan *A. caviae* izolatları en fazla gen kombinasyonuna sahip bulunmuştur. *A. hydrophila* izolatlarının %62,5'i profil I tipinde olup, tüm ekstrasellüler enzim genleri için pozitif bulunmuştur. *A. caviae* izolatlarının %21,1'i (profil VI ve profil VII) tek bir geni taşımıştır. Bunun yanı sıra, *A. veronii* bv *sobria* izolatlarının %77,8'inde (profil VI) tek bir enzim geni bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Aeromonas cinsi bakteriler en çok deniz ve tatlı su ortamlarında bulunurlar. Bundan dolayı balıkların ve diğer hayvanların bu cinsin üyeleri ile temas etmesi kaçınılmaz olmaktadır [2, 7]. *Aeromonas* cinsi bakterilerin virulansını etkileyen birçok faktör vardır. Enzim ve sitokinlerden oluşan ekstrasellüler proteinler bakterinin patojenitesi ile ilişkili olup, hastalık oluşturma sürecinde farklı rol oynarlar [17, 47]. *Aeromonas* türleri tarafından üretilen proteaz ve lipaz gibi ısıya dayanıklı ekstrasellüler enzimler gıdaların bozulmasını ve enfeksiyonların oluşumunu kolaylaştırmaktadır [16, 47].

Bu çalışmada, alabalık örneklerinden elde edilen *A. hydrophila* izolatlarının hepsinin sıcaklık-duyarlı proteaz (*eprCAI*) genine sahip olduğu, *A. caviae* ve *A. veronii* bv *sobria* izolatlarının ise bu gene sahip olmadığı saptanmıştır. Bizim sonuçlarımızın aksine Mısır'da yapılan bir çalışma, balık çiftliklerindeki *A. hydrophila* izolatlarının *eprCAI* genini taşımadığını bildirmiştir [51]. Nil tilapia balıklarında hareketli *Aeromonas* türleri üzerine yapılan bir çalışmada, *A. hydrophila* izolatlarının %46'sı ve *A. veronii* bv *sobria* izolatlarının ise %75'i *eprCAI* geni için pozitif bulunmuştur [52]. Çin'de hasta ve sağlıklı balıklar ile su ortamından izole edilen *Aeromonas* izolatlarında sıcaklığa duyarlı proteaz (*eprCAI*) ve serin proteaz (*ahp*) genlerinin varlığı araştırılmış, sağlıklı balıklardan elde edilen *A. hydrophila* ve *A. veronii* suşlarında her iki proteaz geni bulunmuştur [7]. İsrail sazani olarak bilinen *Carassius gibelio* türünden elde edilen iki *A. veronii* suşundan biri *eprCAI* geni pozitif olarak saptanmıştır [53].

Serin proteazlar, sitotoksik özellikler sergileyen termostabil enzimlerdir [30]. Khor ve arkadaşları [54] tarafından yapılan bir çalışmada hareketli *Aeromonas* izolatlarının %90,7'sinde serin proteaz (*ser*) geni saptanmış olup, bizim sonuçlarımızla uyumludur (%88,9). Benzer olarak, Chacon ve arkadaşları [55] klinik ve çevre örneklerinden elde edilen tüm beta hemolitik *Aeromonas* suşlarında *ser* geninin varlığını bildirmiştir. Bununla birlikte, farklı balık türlerinden elde edilen hareketli *Aeromonas* izolatlarında *ser* geninin varlığının %45,8-55 arasında değiştiği tespit edilmiştir [46, 47, 52, 56]. *A. hydrophila* izolatlarında %100 oranında *ser* geninin varlığı ile ilgili birçok çalışma bildirilmiştir [54, 57], bu sonuçlar bizim

bulgularımızla da uyumludur. Li ve arkadaşları [58], *A. hydrophila* izolatlarının %76,9’unda serin proteaz genini saptamıştır. *A. veronii* izolatlarımızın hepsi (%100) *ser* geni için pozitif bulunmuş olup, Nawaz ve arkadaşlarının [43] yaptığı çalışmada *A. veronii* izolatlarının %82’sinde *ser* geni saptanmıştır. Abu-Elala ve arkadaşları [52] tarafından yapılan bir çalışmada, Nil tilapia balıklarından izole edilmiş *A. veronii* bv *sobria* izolatlarında *ser* geni tespit edilmemiştir. Benzer şekilde, kabuklu deniz ürünlerinden elde edilen *A. veronii* suşlarının hiçbirinde *ser* geni saptanmamıştır [59].

Aeromonas’ın patogenezinde önemli bir virulans faktör olan elastaz, bir metallo proteazdır. Bu çalışmanın sonucunda, *A. hydrophila* izolatlarının %62,5’unda elastaz geni saptanmıştır. Mzula ve arkadaşları [46] ve Oliveira ve arkadaşları [45] çalışmalarında elastaz geninin bulunma sıklığını sırasıyla %45,8 ve %46,5 olarak saptamışlardır. Bu sonuçlar bizim bulgularımızdan daha düşüktür. Ancak, Ruhil Hayati ve arkadaşlarının [57] yaptığı bir çalışmada, hastalık taşıyan tatlı su balıklarından izole edilen hiçbir *A. hydrophila* izolatının *ela* genini taşımadığı rapor edilmiştir. Malezya’da Khor ve arkadaşları [54] tarafından yapılan bir çalışmada, tatlı su göllerinden elde edilen hareketli *Aeromonas* türlerine (*A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. veronii*) ait izolatların %38,9’unun elastaz (*ela*) gen bölgesine sahip olduğu ve bu sonucun bizim bulgularımızdan (%63,9) daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *A. veronii* izolatlarının %22,2’si *ela* geni taşıyorken başka bir çalışmada kedi balığından (catfish) izole edilen *A. veronii* izolatlarının hiçbirinde *ela* geni tespit edilmemiştir [43]. Zhou ve arkadaşları [60], *A. veronii* izolatlarının %16,7 oranında *ela* gen bölgesi için pozitif bulunduğunu bildirmiştir. Xu ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı bir çalışmada [59], kabuklu deniz ürünlerinden elde edilen *A. veronii* suşlarında elastaz geninin varlığı %12,7 olarak bildirilmiştir. Sonuçlarımızın aksine, Mzula ve arkadaşlarının [46] çalışmasında balıklardan izole edilmiş olan *A. veronii* izolatlarında elastaz geni daha yüksek oranda (%87,1) saptanmıştır.

Lipaz üreten mikroorganizmalar doğada çok geniş bir yayılım gösterir [2, 16, 30]. Lipaz aktivitesi hem klinik hem çevre kökenli *Aeromonas* suşlarında bildirilmiş olup [4, 44, 43, 47, 55, 60, 61], tüm *A. hydrophila* izolatlarının lipaz (*lip*) genini taşıdığını gösteren çalışma sonuçlarının [57, 60-62] bizim bulgularımızla benzerlik gösterdiği görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda *A. caviae* izolatlarının tamamında (%100) lipaz geni bulunduğu bildirilmiştir [47, 54, 60]. Bu sonuçların aksine, çalışmamızda *A. caviae* izolatlarında lipaz geni daha düşük oranda (%47,4) bulunmuştur. Ayrıca, çalışmamız *A. veronii* bv *sobria* izolatlarının hiçbirinin *lip* geni taşımadığını ortaya koymuştur. Daha önce yapılan çalışma sonuçları *A. veronii* izolatlarında *lip* geninin varlığının %8,3 ile %85 arasında değiştiğini rapor etmiştir [43, 47, 59, 60].

Ülkemizde, balık ve et ürünlerinde [63], deniz ve tatlı su balıklarında [64] ve deniz ürünlerinde [65] hareketli *Aeromonas* varlığı üzerine birçok çalışma rapor edilmiştir. Ancak, balık kökenli *Aeromonas* izolatlarında ekstrasellüler enzimleri kodlayan virulans genleri ile ilgili sınırlı çalışma vardır. Onuk ve arkadaşları [66] yaptıkları bir çalışmada, kıyı bölgelerindeki (Karadeniz, Ege ve Akdeniz) gökkuşağı alabalık ve balık çiftliğindeki su örneklerinden *Aeromonas* türlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu *Aeromonas* türleri arasında *A. hydrophila* izolatlarının %71,4’ü ve %85,7’si sırasıyla *ser* ve *lip* genleri için pozitif bulunmuş olup, bizim bulgularımızdan daha düşüktür. Bununla birlikte, Onuk ve arkadaşlarının çalışmasında [66], *A. veronii* izolatlarında %16,7 oranında *ser* geni bulunmuş ancak hiçbir izolatta *lip* geni tanımlanmamıştır. Bu sonuçlar, lipaz geni sonuçlarımıza benzerlik göstermektedir, ancak serin proteaz sonuçlarımızdan oldukça düşüktür (%100).

Yukarıda bahsedildiği gibi dünyada ve ülkemizde *Aeromonas* türlerinde ekstrasellüler enzim genlerinin varlığı üzerine yapılan çalışmalarda genlerin saptanma oranlarında farklılıklar olduğu görülmüştür. Coğrafik farklılıklar, bakterilerin türü, büyüme şartları, bakterilerin davranış biçimleri ve izolasyon kaynağı bu farklılıkların sebebi olarak gösterilebilir [23, 47, 48, 59, 66].

Sonuç olarak, bu çalışmada alabalık örneklerinden elde edilen hareketli *Aeromonas* türlerine ait izolatların patojenitesinde ve balıkların bozulmasında önemli rol oynayan proteaz ve lipaz gibi ekstrasellüler enzimlerin varlığı araştırılmıştır. Hareketli *Aeromonas* türleri arasında yer alan *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. veronii* bv *sobria* insanlarda ve balıklarda hastalık yapan fırsatçı patojenlerdir. Genel olarak, *Aeromonas* izolatları en az bir veya daha fazla ekstrasellüler enzim genleri için pozitif bulunmuştur. Bu nedenle,

hareketli *Aeromonas* türleri ile balıkların kontaminasyonu ve bu kontamine olmuş balıkların tüketilmesi gıda kalitesi, gıda güvenliği ve tüketici sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturabilmektedir. Bu muhtemel riski önlemek için balığın satın alım, taşıma, saklama, hazırlık ve pişirme gibi tüm aşamalarında hijyen kurallarına dikkat edilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca, bu patojenlerin balıklarda sebep olacağı hastalıklar kalite ve ekonomik kayıplara neden olabilecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Krovacek, K. and Faris, A. (2003). *Aeromonas* species. In: Miliotis, M.D. and Bier J.W., editors. International Handbook of Foodborne Pathogens, Marcel Dekker, Inc. USA.
- [2] Farmer III, J.J., Arduinonii, M.J., and Hickman-Brenner, F.W. (2006). The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, and E. Stackebrandt, editors. The Prokaryotes. New York: Springer, 564–596.
- [3] Radu, S., Ahmad, N., Ling, F.H., and Reezal, A. (2003). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 261-266.
- [4] Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernández-Rendón, E., Aparicio, G.O., Guarro, J., and Chacon, M.R. (2003). Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human 439 consumption in Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 84(1), 41-49.
- [5] Da Silva, M., Matte, G., Germano, P., and Matte, M. (2010). Occurrence of pathogenic microorganisms in fish sold in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Food Safety*, 30, 94-110.
- [6] Sharma, I. and Kumar, A. (2011). Occurrence of enterotoxigenic *Aeromonas* species in foods of animal origin in North East India. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 883-887.
- [7] Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., Lu, C.P., and Liu, Y.J. (2012). Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 224-233.
- [8] Bhat, S.B., Khan, A.M., Bashir, S.M., and Roy, S.S. (2013). Isolation and antibiogram profile of *Aeromonas* species from common carp (fish) of Kashmir Valley. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7, 1165-1169.
- [9] Arslan, S. and Kütüksarı, R. (2015). Phenotypic and genotypic virulence factors and antimicrobial resistance of motile *Aeromonas* spp. from fish and ground beef. *Journal of Food Safety*, 35, 551-559.
- [10] Isonhood, J.H. and Drake, M. (2002). *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, 65, 575-582.
- [11] Kingombe, C.I., Huys, G., Howald, D., Luthi, E., Swings, J., and Jemmi, T. (2004). The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(2), 113-121.
- [12] Igbinosa, O.E., Odjardare, E.E., Akpor, O.B., Aiyegoro, O.A., and Ogunmwonyi, I.H. (2006). Incidence and prevalence of *Aeromonas* species from retail food: public health implications. *Science Focus*, 12 (2), 19-22.
- [13] Ottaviani, D., Parlani, C., Citterio, B., Masini, L., Leoni, F., Canonico, C., Sabatini, L., Bruscolini, F., and Pianetti, A. (2011). Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 538-545.
- [14] Zhang Q, Shi, G.Q., Tang, G.P., Zou, Z.T., Yao, G.H., and Zeng, G. (2012). A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. *Western Pacific Surveillance and Response*, 3(4).
- [15] Martin-Carnahan, A. and Joseph, S.W. (2005). Genus I. *Aeromonas*. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T., editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, New York, 557-578.
- [16] Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology*. 3rd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [17] Fernandez-Bravo A. and Figueras M.J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*, 8, 129.
- [18] Janda, J.M. and Abbott, S.L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 35-73.
- [19] Kirov, S.M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 224, 151-159.
- [20] Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1998). Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases* 27, 332-344.
- [21] İşleyici, Ö. ve Sancak, Y. C. (2009). Gıdalarda Hareketli *Aeromonas*'lardan Kaynaklanan Sağlık Riskleri. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 69-74.
- [22] Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstreet, W.G., Thune, R.L., and Hawke, J.P. (1998). *Aeromonas* Bacterial Infections-Motile Aeromonad Septicemia. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC), 478.

- [23] Şık, Z., Altındaş, Ö., ve Atıcı, E.G. (2020). Balıklardan izole edilen bakteriyel etkenler: Beş yıllık değerlendirme. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31(1), 29-33.
- [24] Singh, V., Rathore, G., Kapoor, D., Mishra, B.N., and Lakra, W.S. (2008). Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 453-458.
- [25] Cascon, A., Fregenda, J., Allen, M., Yugueros, J., Temprano, A., and Hernanz, C. (2000). Cloning, characterization and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 23, 49-59.
- [26] Rabaan, A.A., Gryllos, I., Tomas, J.M., and Shaw, J.G. (2001). Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 69, 4257-4267.
- [27] Merino, S., Aguilar, A., Noguerras, M.M., Regue, M., Swift, S., and Tomas, J.M. (1999). Cloning, sequencing, and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infection and Immunity*, 67, 4008-4013.
- [28] Pemberton, J.M., Kidd, S.P., and Schmidt, R. (1997). Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152, 1-10.
- [29] Thomas, J.M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. International Scholarly Research Network, 256261.
- [30] Rasmussen-Ivey, C., Figueras, M.J., McGarey, D., and Liles, M.R. (2016). Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1337.
- [31] Rivero, O., Anguita, J., Paniagua, C., and Naharro, G. (1990). Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 172, 3905-3908.
- [32] Leung, K.Y. and Stevenson, R.M. (1988). Characteristics and distribution of extracellular protease from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of General Microbiology*, 134, 151-160.
- [33] Esteve, C. and Birkbeck, T.H. (2004). Secretion of haemolysins and proteases by *Aeromonas hydrophila* EO63: separation and characterization of the serine protease (caseinase) and the metalloprotease (elastase). *Journal of Applied Microbiology*, 96, 994-1001.
- [34] Zacaria, J., Delamare, A.P.L., Costa, S.O.P., and Echeverrigaray, S. (2010). Diversity of extracellular proteases among *Aeromonas* determined by zymogram analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 212-219.
- [35] Loewy, A.G., Santer, U.V., Wieczorek, M., Blodgett, J.K., Jones, S.W., and Cheronis, J.C. (1993). Purification and characterization of a novel zinc-proteinase of *Aeromonas hydrophila*. *Journal Biological Chemistry*, 268, 9071-9078.
- [36] Nakasone, N., Toma, C., Song, T., and Iwanaga, M. (2004). Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 127-132.
- [37] Rivero, O., Anguita, J., Mateos, D., Paniagua, C., and Naharro, G. (1991). Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 81, 1-7.
- [38] Toma, C., Ichinose, Y., and Iwanaga, M. (1999). Purification and characterization of an *Aeromonas caviae* metalloprotease that is related to the *Vibrio cholera* hemagglutinin/protease. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 237-242.
- [39] Okamoto, K., Nomura, T., Hamada, M., Fukuda, T., Noguchi, Y., and Fujii, Y. (2000). Production of serine protease of *Aeromonas sobria* is controlled by the protein encoded by the gene lying adjacent to 3' end of the protease gene. *Microbiology and Immunology*, 9, 787-798.
- [40] Cho, S., Park, J., Park, S.J., Lim, J., Kim, E.H., Cho, Y., and Shin, K. (2003). Purification and characterization of extracellular temperature-stable serine protease from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Microbiology*, 41, 207-211.
- [41] Nam, I. and Joh, K. (2007). Rapid detection of virulence factors of *Aeromonas* isolated from a trout farm by hexaplex-PCR. *Journal of Microbiology*, 45, 297-304.
- [42] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 597-635.
- [43] Nawaz, M., Khan, S.A., Khan, A.A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., and Steele, R. (2010). Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology*, 27, 327-331.
- [44] Sen, K. and Rogers, M. (2004). Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1077-1086.
- [45] Oliveira, S.T.L., Veneroni-Gouveia, G., and Costa, M.M. (2012). Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32(8), 701-706.
- [46] Mzula, A., Wambura, P.N., Mdegela, R.H., and Shirima, G.M. (2020). Virulence pattern of circulating aeromonads isolated from farmed Nile tilapia in Tanzania and novel antibiotic free attenuation of *Aeromonas hydrophila* strain TZR7-2018. *Aquaculture Reports*, 17, 100300.

- [47] Pessoa, R.B.G., Marques, D.S.C., Lima, R.O.H.A. Oliveira, M.B.M., Lima, G.M.S., Maciel de Carvalho, E.V.M., and Coelho, L.C.B.B. (2020). Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). *Microbial Pathogenesis*, 147, 104273.
- [48] Arslan, S., ve Küçüksarı, R. (2015). Phenotypic and genotypic virulence factors and antimicrobial resistance of motile *Aeromonas* spp. from fish and ground beef. *Journal of Food Safety*, 35, 551-559.
- [49] Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J., Smith J.A., and Struhl, K. (1991). Current protocols in molecular biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- [50] Ren, Y., Lu, C.P., and Yao, H.C. (2006). Cloning, sequence analysis and detection of an extracellular temperature labile protease encoding gene (*eprJ*) from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fishery Sciences China*, 6, 924-927.
- [51] Mansour, A., Mahfouz, N.B., Husien, M.M., and El-Magd, M.A. (2019). Molecular identification of *Aeromonas hydrophila* strains recovered from Kafrelsheikh fish farms. *Slovenian Veterinary Research*, 22, 201-208.
- [52] Abu-Elala, N., Abdelsalam, M., Marouf, Sh., and Setta, A. (2015). Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and *gyrB*-based phylogeny of motile *Aeromonas* species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. *Letters in Applied Microbiology*, 61, 429-436.
- [53] Sun, J., Zhang, X., Gao, X., Jiang, Q., Wen, Y., and Lin, L. (2016). Characterization of Virulence Properties of *Aeromonas veronii* isolated from diseased Gibel Carp (*Carassius gibelio*). *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 496.
- [54] Khor, W.C., Puah, S.M., Tan, J.A.M.A., Puthuchery, S., and Chua, K.H. (2015). Phenotypic and Genetic Diversity of *Aeromonas* species isolated from freshwater lakes in Malaysia. *PLOS ONE*, 10 (12).
- [55] Chacon, M.R., Figuras M.J., Castro-Escarpull G., Soler L., and Guarro J. (2003). Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 269-278.
- [56] Fong, J.J., Cho, H.J., Park, M.S., and Lim, Y.W. (2016). Evaluating seasonality and pathogenicity of *Aeromonas* in Korea using environmental DNA. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences*, 18, 605-613.
- [57] Ruhil, Hayati H, Hassan, M.D., Ong, B.L., Abdelhadi, Y.M., Nur Hidayahanum, H., Sharifah, R.M., Nora Faten, A.M., Kuttichantran, S., and Alsaïd, M. (2015). Virulence genes detection of *Aeromonas hydrophila* originated from diseased freshwater fishes. *Advances in Environmental Biology*, 9 (22), 22-26.
- [58] Li, J., Ni, X.D., Liu, Y.J., and Lu, C.P. (2011). Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *Journal of Applied Microbiology*, 110, 823-830.
- [59] Xu, Y.X., Zhan, H.P., Xu, G.Y., Muhamamda, I., Dong, W.I., Wang, Y.M., Kong, L.C., Ma, H.X. (2021). Virulence and drug resistance of *Aeromonas veronii* isolated from shellfish. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 51(1), 21-27.
- [60] Zhou, Y., Yu, L., Nan, Z., Zhang, P., Kan, B., Yan, D., and Su, J. (2019). Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections. *BMC Infectious Diseases*, 19, 158.
- [61] Shuang, M., Lu, W.Y., Geng, L.C., Jing, Y., Min, Y., Ning, B.X., Dong, J., Rong, L.J., Gang, C.Z., and Juan L. (2020). Genetic Diversity, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Aeromonas* Isolates from Clinical Patients, Tap Water Systems, and Food. *Biomedical and Environmental Sciences*, 33(6), 385-395.
- [62] Swaminathan, T.R., Rathore, G., Abidi, A., and Kapoor, D. (2004). Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. *Indian Journal of Fisheries*, 51(2), 251-254.
- [63] Erdem, B., Karıptaş, E., Çil, E., ve Işık, K. (2011). Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from food samples in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 35, 463-472.
- [64] Yücel, N. ve Balcı, Ş. (2010). Prevalence of *Listeria*, *Aeromonas*, and *Vibrio* Species in Fish Used for Human Consumption in Turkey. *Journal of Food Protection*, 73 (2), 380-384.
- [65] Kahraman, B.B., Dumen, E., Issa, G., Kahraman, T., ve İkiz, S. (2017). Incidence of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* in Seafoods. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 1309-1312.
- [66] Onuk, E.E., Fındık, A., Turk, N., Altun, S., Korun, J., Ozer, S., Avsever, M.L., ve Çiftçi, A. (2013). Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions. *Revue de Medecine Veterinaire*, 164, 4, 200-206.