

Türkiye’de ihraç edilen *Bivalvia* türlerinden *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu*

Yavuz DEMİR

Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü, Gıda Kontrol Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 23.11.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 14.05.2012

Özet: Bu çalışmada, Ege ve Marmara denizi kıyılarında kültürü yapılan *Bivalvia* türlerinden kontaminasyon sonucu insanlarda enfeksiyona sebebiyet veren *Vibrio* türlerinin izolasyon ve identifikasyonu yapılmıştır. Marmara ve Ege bölgesinde bulunan üretim istasyonlarından alınan 6 farklı türdeki 958 *Bivalvia* bakteriyolojik yönden incelendi. Örneklerden fenotipik testlerle izole edilen 35 *Vibrio* türünün çoğunluğu *V.parahaemolyticus* ve *V.alginolyticus* olarak tanımlandı. Marmara ve Ege sahil şeridinde bu bakterilerin yoğun olduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: *Bivalve* spp., identifikasyon, *Vibrio* spp.

Isolation and identification of *Vibrio* spp. from *Bivalvia* spp. which are exported by Turkey

Summary: In this research, *Vibrio* spp., causing infections in humans as a result of contamination, were isolated and identified from the costs of Aegean and Marmara Seas in which *Bivalvia* species have been cultured. The material of this research was a total of 958 *Bivalvia* spp., chosen from 6 *Bivalvia* species which have been produced in regions of Aegean and Marmara Seas were investigated by bacteriologically. Totally 35 *Vibrio* spp. were identified by phenotypic tests, with a majority, *V.parahaemolyticus* and *V.alginolyticus* were isolated from samples. These microorganisms, detected in this project, were densely determined in the costs of Aegean and Marmara Seas lines.

Keywords: *Bivalve* spp., identification, *Vibrio* spp.

Giriş

Bivalvia türleri, deniz suyundaki partikülleri süzerek beslenirler. Gıdaları, deniz suyunda yaşayan mikroorganizmaların karışımı ve inorganik partiküllerden oluşmaktadır. *V.parahaemolyticus* gibi bazı heterotropik mikroorganizmaların, *Bivalvia* türlerinin sindirim sürecine girerek dokularına yerleştiği bildirilmektedir (8). Çoğu *V.parahaemolyticus* serotipleri insanlar için patojen olduğundan, su ürünleri ve insan gıda tüketimi sağlığında daimi bir tehlike oluşturmaktadır. *Bivalvia*’lar genellikle dünya çapında yüksek sağlık riski taşıyan gıda grubu olarak kabul edilmektedir (8).

Wright ve ark., (32) ve Charles ve ark., (9) yaptıkları çalışmalara göre, midyelerin 1-2 µm boyutundaki partikülleri tutma özelliklerine sahip olduğu bildirilmektedir. Fakat *Bivalvia*’ların sudan direkt bakteri tutma kapasiteleri hala tartışılmaktadır. *Bivalvia*’ların bakterileri direk kendileri mi yoksa trofik linkleri ile mi süzdükleri hala tartışma konusudur (9, 12, 21, 25). Her ne şekilde olursa olsun,

deniz ortamında yaygın olarak bulunan *Vibrio* spp. türü bakterilerin *Bivalvia*’larda bulunabildikleri bildirilmiştir (6).

Cook (11)’un *Bivalvia*’lar üzerine yaptığı çalışmalarda, bu canlıların deniz suyunu filtre ederek beslenen canlılar olduğu için, solungaç siliolarından deniz suyunu transfer ederek partikülleri solungaç filamentlerine gönderdiklerini ve mukus salgılayan filamentleri ile birçok organizmayı ve inorganik partikülü yakaladıklarını belirtmiştir. Partiküller mideye ulaştığı zaman kristalin tarzı enzimleriyle sindirimlerinin başladığı ifade edilmektedir. Paster ve ark., (26) yaptıkları araştırmalarda bazı mikroorganizmaların digestiv aşamaya direndikleri belirtilmiştir. Capello ve ark., (8) *V.parahaemolyticus* gibi bazı heterotropik mikroorganizmaların *Bivalvia* sindirim sürecine girerek dokularına yerleştiğini söylemektedir. Çoğu *V.parahaemolyticus* serotipleri insanlar için patojen olduğundan, su ürünleri ve insan gıda tüketim sağlığında daimi bir tehlike oluşturmaktadır. *Bivalvia*’lar genellikle dünya çapında yüksek sağlık riski taşıyan gıda grubu olarak

kabul edilmektedir. *V.parahaemolyticus*' un, Şili'de pişmemiş kabuklu tüketimi ile ilgili çıkan gastroenteritis salgınlarının etiyolojik ajanı olduğu raporlanmıştır (11).

Wright ve ark., (33), Daniels ve ark., (12), Volety ve ark., (29) *Bivalvia*'ların çok sayıdaki sulu ortam bakteri türleri için habitat teşkil ettiğini ifade etmektedirler. Bunların bazıları, insan gıdası olarak tüketimi sonucu şiddetli gastroenteritis vakalarına sebep olmaktadır (8). *Bivalvia*'ların bakteriyel ekolojisini daha iyi anlamak, çiftliklerin daha yüksek üretimini sağlamak ve insan gıdası tüketimi olarak kullanımlarında güvenliklerini arttırmak açısından önemlidir. Bu vertabrasızların mikrofloraları hakkında çok fazla veri bulunmamaktadır. *Bivalvia*'lar ile yapılan çalışmalarda, Colwell ve Listin (10), Kueh ve Tamplin (20), Prieur (27), Olafsen ve ark., (25) *Vibrio* spp.lerin koloni sayımlarının 30'a varan oranlarda izole edildiklerini açıklamışlardır. Walne (31), Tubiash ve ark., (28), Dungan ve Elston (14), Nicolas ve ark., (23) *Bivalvia* üretim çiftliklerinde üretimi yapılan *Bivalvia*'larda görülen bir çok hastalık problemlerini gram negatif mikroorganizmalara atfetmektedir.

Vibrio türleri doğal ortamda ve deniz suyunda bol miktarda bulunurlar ve bu yüzden etiyolojik ajan olarak *Vibrio* türlerinin eradikasyonunun imkânsız olduğu bildirilmektedir (2). *Vibrio* enfeksiyonları pestisit, ağır metal, toksik fitoplankton, petrol ürünü toksikantlarının etkilediği su kalitesine ve kötü üretim koşulları ile doğrudan bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir. Austin ve ark., (3) *Vibrio* türlerinin, üretimi yapılan *Bivalvia* alanlarındaki üretim metabolitlerinin ya da alg kültürlerinden kaynaklanan çözünmüş organik substratların üretim sisteminde artmasıyla oluşan uygun ortam sonucu tespit edilebileceğini belirtmişlerdir.

Bu cinsin üyeleri, doğal ortamda mevcut olan deniz ve denize açılan akarsu ağızlarında, havuz ve göl sularında, gastrointestinal kanalda, fekal kontamine atıklarda ve kontamine gıdalarda tüm dünyada bulunurlar (1, 6, 15, 17, 19, 22). *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* ve *V.mimicus* özellikle su ve gıda kaynaklı hastalık oluşturabilen önemli insan patojenleridir (30). *Vibrio* genusu, düz yada kıvrık çomak formu ile, 0.5-0.8 mikrometre genişlikte ve 1.4-2.6 mikrometre uzunlukta gram negatif, bir ya da daha fazla polar flagellası ile hareketli, fakültatif anaerobik, fermantatif ya da

oksidatif metabolizmayla şekerleri parçalayabilen, sitokrom oksidaz pozitif, 0/129 vibriostat ajanına duyarlı, deniz ve denize açılan suların habitatını oluşturduğu mikroorganizmalardır (7). *Vibrio* türlerinin çoğu insanlar için patojeniktir. Bu türe ait bazı üyelerin, ılık kıyı sularına sahip *Bivalvia* ve diğer deniz ürünlerinin tüketildiği ülkelerde insanların sindirim sistemi enfeksiyonu etkeni olduğu belirtilmiştir (1, 6, 7, 15, 17, 18, 19, 22).

Bu çalışmada, ülkemizin Ege ve Marmara sahillerinde üretimi yapılan *Bivalvia* türlerinden *Ostrea edulis* (İstiridye), *Tapes decussatus* (Akivades), *Mytilus galloprovincialis* (Kara midye), *Modiolus barbatus* (Kıllı midye), *Venus verrucosa* (Kidonya), *Donax trunculus* (Kum şırlanı) türleri kullanılarak, halk sağlığında ve ihracatta ciddi risk oluşturan *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* ve risk oluşturabilecek diğer *Vibrio* türlerinin tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada, *Vibrio* spp. izolasyonu amacıyla kullanılan toplam 958 adet *Bivalvia* numunesinden 304'ü Balıkesir ili Ayvalık yetiştirme bölgelerinden, 113'ü İzmir ili Merkez ve Çeşme bölgesi üretim bölgelerinden, 541'i Çanakkale ili merkez üretim bölgelerinden temin edildi. Örnekler türlerin aylara göre hasat zamanında Ocak ayından Temmuz ayına kadar düzenli sayıda alındı. Alınan örnekler soğuk zincir kuralına uyularak 24 saat içinde Food and Drug Administration (FDA) (15) metoduna göre, *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus* ve diğer *Vibrio* türlerinin izolasyonuna başlandı. Çalışmada 958 örnekten, 97 Kidonya (*V.verrucosa*), 570 Kum şırlanı (*D.trunculus*), 116 Akivades (*T.decussatus*), 67 Kara midye (*M.galloprovincialis*), 53 Kıllı midye (*M.barbatus*), 55 İstiridye (*O.edulis*) kullanıldı.

Standart *Vibrio cholerae* suşu: *V.cholerae* ogawa non O1 suşu, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı SHAM/Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu Laboratuvarı Birimi'nden liyofilize olarak temin edildi. Pandemi salgınlara neden olan kolera vakasının etiyolojik ajanı olan *V.cholerae* O1 ve O139 suşları ise, ülkemizde pandemik koleranın uzun yıllardır görülmemiş ve eradike edilmiş olmasından dolayı güvenlik gerekçesi nedeniyle suş talebi kabul edilmediği için çalışmada kullanılmadı.

Tablo 1. Üretim tesislerinden alınan *Bivalvia* türlerinin aylara göre dağılımı ve sayıları

Aylar	Analize Alınan Tür Sayısı					
	İstiridye (<i>O.edulis</i>)	Kum şırlanı (<i>D.trunculus</i>)	Akivades (<i>T.decussatus</i>)	Kara Midye (<i>M.galloprovincialis</i>)	Kıllı Midye (<i>M.barbatus</i>)	Kidonya (<i>V.verrucosa</i>)
Ocak	3	30	10	4	-	3
Şubat	6	90	35	4	8	6
Mart	6	90	45	4	-	6
Nisan	12	150	55	-	4	12
Mayıs	6	-	25	-	-	3
Haziran	3	60	35	16	12	3
Temmuz	-	150	35	16	8	3
Toplam	36	570	240	44	32	36
Genel Toplam						958

Standart *Vibrio parahaemolyticus* suşu: *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubu (Kod: M1623B), İngiltere Weymouth Cefas Community Reference Laboratory <http://www.crlcef.org> (Ulusal Referans Laboratuvarı)'dan canlı olarak temin edildi.

Deney hayvanları: Standart *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* suşlarından antiserum hazırlamak amacıyla, 17.11.2009 tarih ve 8447 sayılı Etik Kurulu Kararı ile her bir suş için 1'er adet olmak üzere 1.5-2 kg ağırlığındaki Yeni Zelanda tavşanlarından (*Oryctolagus cuniculus*) 3 adet kullanıldı.

İzolasyon prosedürü: Çalışmada kullanılacak örnekler, 2009 yılı ocak ile temmuz ayları arasında, soğuk zincir kuralına uygun şekilde alınarak laboratuvara getirildi (Tablo 1). Diğer gün analize alınacak örnekler +4°C'de muhafaza altına alındı. Örnekler steril eldiven, bıçak, havan ve steril pens, makas yardımı ile açılarak, örneklerden 25 gr tartıldı. Örnekler steril kum vasıtası ile ezilerek homojen hale getirildi. Yeterince homojenize edilemeyen durumlarda, homojenizatörden yararlandı.

Tartılan ve homojenize edilen örnekler, 225 ml. Alkali Peptonlu Su (APS)'ye 1/10 oranında inoküle edildi (25 gr) ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı (donmuş örnek kullanılırsa 2 kat kuvvetinde APS'ye inoküle edildi).

İnkübasyon sonunda APS' den bir öze dolusu alınarak Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose agara (TCBS) tek koloni düşürme metodu ile ekim yapıldı. Besiyeri 37°C'de bir gece inkübe edildi.

Üreyen *Vibrio* spp. şüpheli sarı veya yeşil kolonilerden öze ile alınarak %1,5 NaCl Tryptic Soy buyyona geçildi, 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonu Tryptic Soy buyyonundan tekrar TCBS agara geçilerek saf koloni elde edildi. Üreyen saf kolonilerden Tryptic Soy agara (TSA) alt kültürü yapılarak, identifikasyon için biyokimyasal test çalışmalarına geçildi (15).

Temel özellikler ve biyokimyasal testler: TSA'da üreyen saf koloniden; hareket muayenesi, Gram boyama, sitokrom oksidaz testi, katalaz testi, O/F, jelatin hidroliz testi, O/129 vibriostat ajana duyarlılık testleri yapıldı. Belirtilen özelliklere bakılan saf koloniden, biyokimyasal testlerle identifikasyona devam edildi. Bütün biyokimyasal testler tamamlanarak tür tespiti, Arda M. (1997), Austin B. (2002), Bekar M. (2003), FDA (2004), ISO/TS (2007)' de belirtilen araştırmacılara göre yapıldı (1, 4, 6, 15, 18).

Vitec II cihazı ile identifikasyon: Tüm testlerin uygulanmasından sonra, TSA'da üreyen saf kültürden Gram boyama yapılarak, Vitec II Compact cihazının (Biomerioux) gram negatif bakteri identifikasyonunda kullanılan identifikasyon kartları ile cihaza verildi, yaklaşık 12-24 saat cihazdaki inkübasyon periyodundan sonra sonuçlar okundu.

Standart suşlardan hiperimmün antiserum hazırlanması: Antiserum üretiminde kullanılan standart suşların, bildirilen bakteri olup olmadıklarının tespiti ve doğrulama için API 20E identifikasyon sistemi ID 32 (Bio Merieux) kullanıldı. TSA'da üre-

yen saf kültürden daha önceden fizyolojik tuzlu su (FTS) ile hazırlanan %0,3'lük formalin içine alındı. Bu süspansiyon önce 56°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Su banyosundan sonra +4°C'de 15 dakika 3000 rpm' de santrifüje edildi. Santrifüj sonunda tüpteki süpernatant alınarak FTS ile McFarland tüp: 4 değeri ile 1,2x 10⁸ cfu/ml hücreye eşdeğer olacak şekilde ayarlandı. Her iki standart kültür için ayrı ayrı hazırlanan bu süspansiyondan tavşanlara 4'er gün ara ile kulak venasından İV yolla sırası ile 0,2- 0,5- 1,0- 1,5 ve son olarak da 2 ml miktarında enjekte edildi. Son aşama olarak 1 hafta sonra formalin kullanılmadan aynı şekilde hazırlanan canlı kültür süspansiyonundan 0,5 ml SC yolla enjekte edildi. Enjeksiyon periyodu bitiminden 10 gün sonra tüm tavşanların kanları alınarak, kan serumları -20°C'de saklandı (16, 24).

Hiperimmün serumların titrasyonlarının belirlenmesi: Steril 10 adet tüpün birincisine 0,8 ml FTS, 0,2 ml titrasyonu belirlenecek serum konuldu. Diğer 9 tüpe 0,5 ml FTS konuldu. 1. tüpte serumun ¼ sulandırması yapıldıktan sonra 2 katlı sulandırma yapılarak, 1. tüpten sırası ile 0,5 ml steril pipet yardımı ile 2.- 3.- 4. ve en son tüpe kadar aktarıldı. Son tüpten 0,5 ml dışarı atıldı. Böylece tüplerdeki dilüsyon değerleri sırası ile 1. tüpte 1/8, 2. tüpte 1/16, 3. tüpte 1/32 ve sırası ile 1/64, 1/128, 1/256 ve en son

tüpte 1/2048 oldu (24). Eldeki hiperimmün serum ile McFarland:4 değeri ile 1,2x 10⁸ cfu/ml hücreye eşdeğer olacak şekilde standardizasyonu yapılan aynı türdeki antijen solüsyonundan 0,5 ml sırası ile 1. tüpten son tüpe kadar ayrı pipet ucu kullanılarak eklendi. 1. tüpten 6. tüpe kadar aglutinasyon reaksiyonları gözlemlendi, 7. tüpte bu reaksiyon gözlemlenmedi. Böylece hiperimmün antiserumun titrasyonu; aglutinasyon gözlenen en son tüpten bir sonraki tüp olan 7. tüpte 1/512 olarak tespit edildi.

Aglütinasyon tekniği ile saha suşlarının serotiplendirilmesi: Lam üzerine 1 damla FTS damlatıldı. Üzerine serotiplendirilmesi amaçlanan tek bir koloni alındı ve bir damla titrasyonu belirlenmiş antiserum ilave edilerek iğne uçlu öze ile karıştırıldı. 30 sn. sonunda verdiği aglutinasyon sonucu lam üzerinde oluşan presipitasyona göre değerlendirildi (24).

Bulgular

Mikrobiyolojik muayene: Ayvalık bölgesinden alınan 113 örneğin 20 (%17.6)' sinden, Çanakkale bölgesi yetiştirme istasyonlarından alınan 541 örneğin 14 (%2.5)' ünden, İzmir merkez ve Çeşme ilçesi üretim yerlerinden alınan 113 örneğin 1 (%0.8)' inden *Vibrio* spp. izole edildi.

Tablo 2. Araştırmada kullanılan *Bivalvia* spp. örneklerinden izole edilen *Vibrio* türlerinin aylara ve *Bivalvia* türlerine göre dağılımı

Aylar	Analiz Edilen Türler					
	İstiridyeye (<i>O.edulis</i>)	Kum şırlanı (<i>D.trunculus</i>)	Akivades (<i>T.decussatus</i>)	Kara Midye (<i>M.galloprovincialis</i>)	Kıllı Midye (<i>M.barbatus</i>)	Kidonya (<i>V.verrucosa</i>)
Ocak	-	-	<i>V.alginolyticus</i>	-	-	<i>V.alginolyticus</i>
Şubat	-	-	-	-	-	-
Mart	<i>V.furnissii</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.mimicus</i> <i>V.parahaemolyticus</i>	-	-	<i>V.hollisae</i> <i>V.furnissii</i>
Nisan	-	<i>V.metschnikovii</i>	<i>V.alginolyticus</i>	-	-	-
Mayıs	<i>V.parahaemolyticus</i>		<i>V.alginolyticus</i> <i>V.parahaemolyticus</i>			<i>V.parahaemolyticus</i>
Haziran	-	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i> <i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.alginolyticus</i>
Temmuz	-	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i> <i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	-	<i>V.alginolyticus</i>

Otomatize sistemle *Vibrio* spp. identifikasyonu: Klasik yöntemler ile izole ve identifiye edilen 18 *V.parahaemolyticus*, 11 *V.alginolyticus* ve 1

V.vulnificus, otomatize identifikasyon sistemiyle de aynı sonucu verdi. Ancak klasik yöntemlerle tespit

edilen 3 *V.furnissii*, 1 *V.mimicus*, 1 *V.metschnikovii* otomatize sistemle tespit edilemedi.

İzole edilen *Vibrio parahaemolyticus* suşlarının serolojik muayenesi: Standart *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* suşlarından belirtilen metotla hiperimmün serumları elde edildi. Elde edilen hiperimmün serumların titrasyonlarının tespitinde kullanılan metot ile yapılan analiz sonucunda 1. tüpten 6. tüpe kadar aglutinasyon reaksiyonları gözlemlendi, 7. tüpte bu reaksiyon gözlenmedi. Böylece hiperimmün antiserumun titrasyonu; aglutinasyon gözlenen en son tüpten bir sonraki tüp olan 7. tüpte 1/512 olarak tespit edildi.

Yapılan serolojik muayene sonucu, katı agarda saf olarak üretilen standart *V.cholerae* ogawa non-O1 ve standart *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 kolonisi ile yapılan test kontrolü sonunda, lam üzerinde aglutinasyon sonucu oluşan presipitasyon görüldüğü halde, izole edilen hiçbir saha şusu *V.cholerae* ogawa non-O1' den hazırlanan hiperimmün serumla aglutinasyon vermedi. *V.parahaemolyticus* O:3 K:6'dan hazırlanan hiperimmün serumla yapılan incelemede 18 *V.parahaemolyticus*'un hiçbirinde aglutinasyon saptanmadı.

İdentifiye edilen saha suşları: Bu çalışmada yapılan identifikasyon sonucu, ocak ve Temmuz ayları arasında düzenli olarak alınan örneklerden, *V.alginolyticus*, *V.furnissii*, *V.mimicus*, *V.parahaemolyticus*, *V.hollisae*, *V.metschnikovii*, *V.vulnificus* türleri izole ve identifiye edilmiştir (Tablo 2).

Sahadan identifiye edilen *Vibrio* türleri ve sayıları:

Tablo 3. Araştırmada kullanılan *Bivalvia* örneklerinden izole edilen *Vibrio* izolatlarının dağılımı ve sayısı

İzole edilen türler	Sayı
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
<i>Vibrio alginolyticus</i>	11
<i>Vibrio vulnificus</i>	1
<i>Vibrio furnissii</i>	3
<i>Vibrio mimicus</i>	1
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1
<i>Vibrio spp. (identifikasyon yapılamadı)</i>	1
Toplam	36

Tablo 4. Sahadan izole edilen *Vibrio* türlerinin identifikasyon özellikleri

Fenotipik Özellikler	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>	<i>V.furnissii</i>	<i>V.mimicus</i>	<i>V.metschnikovii</i>	<i>Vibrio spp. (identifikasyon yapılamadı)</i>
TCBS Agarda Koloni Rengi	S	Y	Y	S	Y	S	S
Gram Boyama	-	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+	+	+	+	-	+
Hareket	+	+	+	+	+	+	+
TSA' da yayılma	+	+	+	-	-	+	-
Jelatin Hidroliz	+	+	+	+	+	+	-
22°C de üreme	-	+	+	+	+	+	+
37°C de üreme	+	+	+	+	+	+	+
42°C de üreme	+	+	+	-	+	+	+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	+	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Oksidasyon/Fermentasyon	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
ONPG	-	-	-	-	+	+	-
Ürease	-	-	-	-	-	-	-
İndol	+	-	-	+	+	+	+
Hemoliz (KA) da	+	+	+	-	+	-	-/-
H ₂ S/Gaz	-	-	-	+	-	-	-
MR/VP	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-
%0 NaCl üreme	-	-	-	-	+	-	+
%3 NaCl üreme	+	+	+	+	+	+	+
%8 NaCl üreme	+	+	+	+	-	ÜA	+
%10 NaCl üreme	+	-	-	-	-	-	-
LDC	+	-	+	-	+	+	-
ADH	-	+	-	+	-	+	-
ODC	+	+	+	-	+	-	-
10µg O/129	D	D	d	D	d	d	D
150 µg O/129	d	d	d	d	d	d	d

S= Sarı, Y= Yeşil, ÜA=Üreme yok/ az, D= Dirençli, d= Duyarlı

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada kullanılan örnekler kış, ilkbahar ve yaz başlangıcında alınarak analizleri tamamlanmıştır. Sonbahar ayları, *Bivalvia* üretim istasyonlarındaki üretimi yapılan türlerin çoğunun ihracata kapalı olmasından dolayı bu çalışmaya dahil edilememiştir. Analize alınan bölgelerden Çanakkale ili, Balıkesir ili Ayvalık ilçesi, İzmir ili Merkez ve Çeşme ilçesinden toplanan örneklerin aylara göre dağılımı ve sayıları tablo 1’de verildi. Toplam 958 *Bivalve* spp. örneğinden *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V.vulnificus*, *V.furnissii*, *V.mimicus* ve *V.metschnikovii* identifiye edildi. 1 *Vibrio* suşu da yapılan biyokimyasal testlerle tanımlanamadı. İdentifiye edilen *Vibrio* türlerinin fenotipik özellikleri tablo 4’ de verildi.

Biyokimyasal testlerle identifiye edilen 18 *V.parahaemolyticus* suşunun standart *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubuna ait olup olmadığının tespiti amacı ile, Yeni Zelanda tavşanı (*O.cuniculus*) kullanılarak bu serogrup için elde edilen hiperimmün serumun titrasyonları belirlenerek serotiplendirmede lam aglütinasyon tekniği kullanıldı. Ancak incelenen 18 *V.parahaemolyticus* suşunun hiçbirisinde lam aglütinasyon sonu presipitasyon gözlenmedi ve sahadan elde edilen *V.parahaemolyticus* suşlarının *V.parahaemolyticus* O:3 K:6 serogrubuna ait olmadığı tespit edildi. Bu durum, Marmara ve Ege sahillerimizde üretimi yapılan *Bivalvia*’ların, gastroenteritislerin önemli etkenlerinden birisi sayılan bu serogrubla kontamine olmadığı anlaşıldı. Tablo 2 ve 3’ de izole edilen *Vibrio* türlerinin aylara göre dağılımları ve sayıları verildi.

Mevcut çalışmada *V.alginolyticus* suşları identifiye edilerek, suşlar arasında İndol testi, ornithin dekarboksilaz (ODC) testi ve 22°C üreme testlerinde farklılık gösterdikleri anlaşıldı. Austin (2), *V.alginolyticus* için indol testi değerini pozitif olarak verdiği halde Bekar (6) çalışmalarında bu değeri negatif olarak belirtmiştir. Aynı şekilde bu tür için ODC ve 22°C’ de üreme testlerinin sırasıyla bu çalışmada pozitif ve negatif oldukları görüldü. FDA (15), *V.alginolyticus* için ODC değerini pozitif olarak belirtmiştir. Austin (2) *Vibrio* türleri için bu değeri belirtmemiştir. Bekar (6) bu tür için ODC testinin çalışmalarında pozitif olduğunu belirtmiştir. 22°C üreme testi, bu tür için Austin (2) ve FDA

(15)’ da belirtilmediği halde Bekar (6) çalışmalarında negatif olarak belirtmiştir.

V.vulnificus bu çalışmada, belirtilen identifikasyon tablolarında verilen değerlerden 2 biyokimyasal değeri ile farklılık gösterdi. Bunlardan ONPG testi ve %8 NaCl sıvı buyyonda üreme testinde Austin (2) ve FDA (15)’ nın bu tür için çalışmalarında bu değerler verilmemiştir, Bekar (6) yaptığı çalışmalarda bu değerleri sırası ile pozitif ve negatif verdiği halde, bu çalışmada sırası ile negatif ve pozitif olarak tespit edildi. Çalışmada tespit edilen *V.furnissii*, identifikasyon tabloları ile sadece ONPG testinde farklılık gösterdi. FDA (15) ve Bekar (6)’ da verilen tanımlama tablolarında bu test *V.furnissii* için pozitif olduğu halde, yapılan çalışmada negatif olduğu görüldü. Yapılan identifikasyonda biyokimyasal testler sonucu 1 *V.metschnikovii* izole edildi, fakat bu *Vibrio* türü bakteri, verilen tanımlama tablolarından, Voges-Proskauer (VP) testi, 42°C’de ve ODC testi ile farklılık gösterdi. Yapılan bu çalışmada, *V.metschnikovii* için bu değerler sırası ile negatif, pozitif ve negatif olduğu tespit edildi. FDA (15)’da bu değerler sırası ile pozitif, değişken ve negatif verilmiştir. Bekar (6) yaptığı çalışmalarda, bu tür için sırası ile bu değerleri pozitif, değişken ve pozitif olarak belirtmiştir. Farklılık gösteren testler, *Vibrio* türlerinin temel özellikleri dışındaki biyokimyasal değerlerinin %100 oranında aynı olmadığını ve tanımlama tablolarında verilen biyokimyasal değerlerin bazılarının %10-20 oranında farklı değer verebileceğini gösterdi.

Dileep ve ark., (13), *Bivalve* spp. örnekleriyle yaptıkları çalışmada, 86 örnekten konvansiyonel analizler ve *V.parahaemolyticus*’un toxR geninin tespitini amaçlayan moleküler çalışmalar yapmışlardır. Konvansiyonel yöntemle 28 adet, moleküler yöntemle 53 adet *V.parahaemolyticus* tespit edilmiş ve 1 örnekte tdh ve trh genleri pozitif sonuç vermiştir. Moleküler yöntemle bu mikroorganizmanın tespitindeki sayı farklılıklarının, bakterinin Bacterological Analytical Manual of US (FDA)’da açıklanan biyokimyasal özelliklerinin, izolatların biyokimyasal testlerinde görülen bir ya da iki adet farklılıktan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu çalışmada 18 adet *V.parahaemolyticus* izole ve identifiye edilip, biyokimyasal testlerin bu tür için verilen tanımlama tablolarına uyduğu tespit edildi.

Aydın ve Soytemiz (5), çalışmalarında üretim sahalarından alınan toplam 70 kum midyesi

(*V.gallina*) ile çalışmış ve bu örneklerin 10' unda (%14,3) *V.parahaemolyticus* izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir. Aydın ve Soytemiz (5)'in yaptığı çalışmada *Bivalvia* örneklerinin bu çalışmada örnek alınan bölgeleri kapsadığı düşünülmektedir. Bahsedilen çalışmada yaklaşık %15'e varan *V.parahaemolyticus* izole ve identifiye edilmiştir. Örneklerin Kasım- Ocak- Şubat ve Eylül dönemlerinde alındığı belirtilmiştir. Bu çalışmada Ocak ve Şubat ayında alınan hiçbir *Bivalvia* örneğinde *V.parahaemolyticus*'a rastlanmadı. Ancak Mart ve diğer aylarda alınan örneklerden *V.parahaemolyticus* izole edilmeye başlandı. Bu çalışmada kullanılan 958 örnekten sadece 18 (yaklaşık %1,9) *V.parahaemolyticus* izole edildi. Bulunan bu oran, bu çalışmada tespit edilen *V.parahaemolyticus* oranından düşük olduğu görüldü.

Yılmaz ve ark., (34), Marmara denizinden (Gelibolu bölgesi) kum midyesi (*V.gallina*) ve kara midyelerin (*M.galloprouncialis*) mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmalarda 60 örnekten 35 kara midye (*M.galloprouncialis*) ve 25 kum midyesi (*V.gallina*) kullanmışlardır. İzole edilen suşlar, konvansiyonel yöntemler ve API 20E identifikasyon sistemi ID 32 (Bio Merieux) kullanılarak identifikasyon yapılmıştır. Marmara, Gelibolu bölgesinden alınan örneklerden *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* suşları izole ve identifiye edilememiştir. Bu sonuç, çalışmamızdaki *V.cholerae* analizleri ile örtüşmektedir. Çalışmamızda 958 adet *Bivalvia* örneğinin hiçbirisinden *V.cholerae* izole edilememiş bununla birlikte, 18 adet *V.parahaemolyticus* izole edilmiştir.

Mevcut çalışma ile Yılmaz ve ark., (34)'nın çalışmasında da alınan örneklerden *V.cholerae* izole edilmemesinin, Marmara ve Ege sahil bölgelerimize kanalizasyon ve atık sularının karışmadığından dolayı olduğunu düşündürmektedir.

Sahadan alınan örnekler klasik yöntemlerle analize alınıp, elde edilen izolatların biyokimyasal testler ve Vitec II Compact (Biomerieux) cihazı kullanılarak tanımlanması yapılmıştır. Ayrıca *V.cholerae* ve *V.parahaemolyticus* standart suşları ile serum elde edilip, izole edilen suşların serolojik yönden analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, Ege ve Marmara sahillerimizde kolera tehdidinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada *V.parahaemolyticus* izolasyonları yapılsa da, bu izolatların O:3 K:6 serotipi olmadığı se-

rolojik analizlerle tespit edilmiştir. Bu sayede bahsedilen sahil kıyılarımızda ve bu bölgelerde üretilip tüketime sunulan *Bivalvia* türlerinde O:3 K:6 serotipi yönünden ciddi gıda riski oluşturacak bir durum olmamasına rağmen, hijyen kurallarına uyulması ve gıda olarak tüketime sunulan *Bivalvia* ürünlerinin mutlaka pastörizasyona tabii tutulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma süresince gerekli örneklerin sağlanmasında kolaylık gösteren İzmir İl Kontrol Laboratuvarı çalışanlarına, kurumumda tez çalışmam için gerekli imkanı ve desteği sağlayan Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Necdet AKKOCA ve Müdür Yardımcısı Hasan AKTAR'a ve özellikle görev yaptığım Gıda Kontrol Bölümündeki çalışma arkadaşlarım Dr.Vet.Hekim Özhan TÜRKYILMAZ, Uzm.Vet. Hekim Bülent KAFA, Laborant Şahin SAVA ve görüşlerinden yararlandığım Prof.Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN ve Prof. Dr. Halil İbrahim ATABAY'a şükranlarımı sunarım.

Kaynaklar

1. Arda M, (1997). *Temel Mikrobiyoloji*. Dördüncü baskı. Ankara: Medisan yayınları, p. 294-315.
2. Austin B, Austin DA, (1987). *Bacterial Fish Patogens*. First edition. England: Ellis Harwood Limited, p. 263- 324.
3. Austin B, Bucke D, Feist SW, Helm M, (1988). *Disease problems among cultured bivalve larva. Internal report*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fisheries Research. Lowestoft. 16, 1-22.
4. Austin B, Austin DA, (2002). *Bacterial Fish Patogens*. Third edition. England: Ellis Harwood Limited, p. 282.
5. Aydın A, Soytemiz E, (2002). *Balık türlerinden ve kum midyelerinden (Venus gallina) Vibrio parahaemolyticus izolasyonu ve identifikasyonu*. Turk J Vet Anim Sci. 26, 1249-1253.
6. Bekar M, (2003). *Gram negatif mikroorganizmalar, genel karakterleri ve tanı yöntemleri*. Etlik Vet Mikrobiol Derg. 14, 31-429.
7. Bergey DH, John GH, (1984). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. First edition. Baltimore: Willams and Wilkins, p. 4320.
8. Capello AE, Romilio T, Romero EJ, (2003). *Tracing Vibrio parahaemolyticus in oysters (Tostrea chilensis) using a green fluorescent protein tag*. J Exp Mar Biol Ecol. 327, 157-166.
9. Charles F, Amouroux JM, Gremare A, Cahet G, (1992). *Filtration of the enteric bacteria Escherichia coli by two filter-feeding bivalves, Venus verrucosa and Mytilus galloprovincialis*. Mar Biol. 113, 125-131.

10. Colwell R, Listin J, (1960). *Bacteriological study of natural flora of pacific oyster (Crassostrea gigas)*. Appl Microbiol. 8, 104-109.
11. Cook DV, (1991). *Microbiology of bivalve molluscan shellfish*. Ward DR, Hackney CR. eds. Microbiology of Marine Food Products. The Microbiological Safety and Quality of Food. Aspen Publishers Inc, New York. p. 19-40.
12. Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM, Slutsker L, (2000). *Vibrio parahaemolyticus infections in the United States*. J Infect Dis. 181, 1661-1666.
13. Dileep V, Kumar HS, Kumar Y, Nishibuchi M, Karunasagar I, (2003). *Application of polymerase chain reaction for detection of Vibrio parahaemolyticus associated with tropical seafoods and coastal environment*. Lett Appl Microbiol. 36, 423- 427.
14. Dungan CF, Elston RA, (1988). *Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of hinge ligaments of cultured juvenile pacific oyster Crassostrea gigas*. Aquaculture. 72, 1-14.
15. FDA BAM, (2004). U.S. Food and Drug Administration, *Bacteriological Analytical Manual Online chapter: 9*. Erişim adresi: www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9html, Erişim tarihi: 23.11.2007.
16. Gürgün V, Halkman K, (1990). *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri*. İkinci baskı. Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği, p. 1-6.
17. Hayashi S, Okura M, Osawa R, (2006). *Soft agar coated filter metod for early detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH)- or TDH- related hemolysin producing Vibrio parahaemolyticus in seafood*. Appl Environ Microbiol. 72, 4576- 4582.
18. ISO/TS 21872-1:2007(E), (2007). *First edition, Interpretation of biochemical tests, Microbiology of food and animal feeding stuffs , Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic Vibrio spp. Part 1: Detection of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio cholerae*. Erişim adresi: www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=38279-11, Erişim tarihi: 23.11.2007.
19. Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abbott SL, (1988). *Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant Vibrio spp*. Clin Microbiol Rev. 1, 245-267.
20. Kueh CW, Tamplin M, (1985). *Bacteria in bivalve shellfish with special reference to oysters*. Appl Bacteriol. 59, 41-47.
21. Le Gall S, Hassen MB, Le Gall P, (1997). *Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster Crassostrea gigas: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders*. Mar Ecol Prog Ser. 152, 301- 306.
22. Marano NN, Daniels NA, Easton AN, McShan A, Ray B, Wells JG, Griffin PM, Angulo FJ, (2000). *A survey of stool culturing practices for Vibrio species at clinical laboratories in gulf coast states*. J Clin Microbiology. 38, 2267- 2270.
23. Nicholas JL, Ansquer D, Cochard DS, (1992). *Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to Manila clam Tapes philippinarum larvae*. Dis Aqua Organisms. 14, 153-159.
24. OIE, (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Erişim adresi: www.oie.int/eng/normes/mmanal/a_00063.htm, Erişim tarihi: 13.11.2009.
25. Olafsen JA, Mikkelsen HV, Giaever H, Hanse GH, (1993). *Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures*. Appl Environ Microbiol. 59, 1848- 1854.
26. Paster B, Pelletier DA, Dewhurst FE, Weistburg WG, Fussing V, Poulsen LK, Dannenberg S, Schroeder I, (1996). *Phylogenetic position of spirochetal genus Cristispira*. Appl Environ Mic. 62, 942-946.
27. Prieur D, (1987). *A review of the relationships between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment*. Symbiosis. 4, 37-50.
28. Tubiash HS, Chanley PE, Leifson E, (1965). *Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile mollusks*. J Bacteriology. 90, 1036-1044.
29. Volety A, McCharty SA, Tall BD, Curtis SK, Fsiher WS, Genthner FJ, (2001). *Responses of oyster Crassostrea virginica hemocytes to environmental and clinical isolates of Vibrio parahaemolyticus*. Aquat Microb Ecol. 25, 11-20.
30. Vora GJ, Meador CE, Bird MM, Bopp CA, Andreadis JD, Stenger DA, (2005). *Microarray- based detection of genetic heterogeneity antimicrobial resistance and the viable but nonculturable state in human pathogenic Vibrio spp*. Proc Natl Acad Sci. 102, 19109- 19114.
31. Walne PR, (1958). *The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of Ostrea edulis*. J Marine Biol Ass. 37, 415-425.
32. Wright RT, Coffin RB, Persing C, Pearson D, (1982). *Field and lab. measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton*. Limnol Oceanogr. 27, 91-98.
33. Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman MC, Colwell RR, Morris JR, (1996). *Distribution of Vibrio vulnificus in the Chesapeake Bay*. Appl Environ Microbiol. 62, 717- 724.
34. Yılmaz İ, Bilgin, Öktem B, (2003). *Occurrence of Vibrio and other pathogenic bacteria in Mytilus galloprovincialis and Venus gallina harvested from the Marmara sea*. Turk J Vet. Anim Sci. 29, 409-415.