

Farklı Kaynaklardan İzole Edilen *Salmonella* Suşlarının Bazı Virülans Faktörlerinin Belirlenmesi

Zaven AĞAY¹, Ayten KİMİRAN^{*2}

¹İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 34134, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34134, İstanbul

(Alınış / Received: 29.09.2016, Kabul / Accepted: 06.03.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 19.04.2017)

Anahtar Kelimeler

Salmonella,
Virulans,
Serum direnci,
Antibiyotik direnci,
Siderofor

Özet: Enterobacteriaceae üyesi olan *Salmonella* cinsi bakteriler, insanlarda gastroenterit, bakteriyemi ve enterik ateş gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Salmonella* bakterilerinin patojenitesinin belirlenmesi için bu bakterilerin virülans özelliklerinin araştırılması gereklidir. Klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin virülans faktörlerini belirlemeye yönelik birçok çalışma olmasına rağmen, hem gıda ve çevresel örneklerden izole edilen bakterilerin patojenitesinin bir arada araştırıldığı hem de standart bakterilerle kıyaslandığı kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda kıyma, deniz suyu ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin ve standart bakterilerin (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028; *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076) virülans faktörleri incelenerek patojenitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında, bakterilerin serumun antimikrobiyal etkisine karşı direnci, antibiyotik direnci, hemolizin aktiviteleri, hemagglütinasyon yetenekleri, fimbriya tipleri, biyofilm oluşturma kapasitesi ve bakterinin dış ortamdan demir alımını sağlayan siderofor moleküllerinin üretim özellikleri incelenmiştir. Ortalama toplam virülans oranları (%29) değerlendirildiğinde, kıyma örneklerinden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin diğer kaynaklardan izole edilenlere göre daha patojen olduğu, en patojen bakterinin ise %38 virülans değeriyle ZS-4 izolatı olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin serum direnci, antibiyotik direnci, hemoliz oluşturma yetenekleri, hemagglütinasyon özellikleri, biyofilm oluşturma ve siderofor üretme kapasitelerinin izole edildikleri kaynağa göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Investigation of some Virulence Factors of *Salmonella* Strains Isolated from Different Sources

Keywords

Salmonella,
Virulence,
Serum resistance,
Antibiotic resistance,
Siderophore

Abstract: The genus *Salmonella*, which is a member of Enterobacteriaceae, causes infections such as bacteremia, typhoid fever and gastroenteritis. In order to determine the pathogenicity of *Salmonellae*, it is necessary to investigate the virulence properties of these bacteria. Although there are many studies to determine the virulence of *Salmonella* bacteria isolated from clinical specimens, any comprehensive study and comparison about the pathogenesis of *Salmonellae* among the isolates of both food samples, environmental sources and wild type strains has been found. Therefore, it is aimed to evaluate the pathogenicity of *Salmonellae* by investigating the virulence factors of standard strains (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028; *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076) and isolated *Salmonella* bacteria from minced meat, sea water and clinical samples. Within the scope of the study, bacterial resistance to the antimicrobial effect of serum, antibiotic resistance, hemolysine activities, haemagglutination abilities, fimbriae types, biofilm formation capacity and production characteristics of siderophore molecules which allow external iron uptake of bacteria from the environment were examined. When the mean total virulence rates (29%) were evaluated, it was determined that *Salmonella* bacteria isolated from minced meat samples were more pathogenic than those isolated from other sources, and the most pathogenic bacteria were ZS-4 isolates with a virulence value of 38%. As a conclusion, it has been determined that the serum and antibiotic resistance, hemolytic activity, haemagglutination properties, biofilm formation and siderophore production capacities demonstrate differences depending on their source of isolation.

1. Giriş

Salmonelloz etkeni [1] olan *Salmonella* cinsi bakterilerin virülansı, bakterinin konağa tutunabilmesi, konak içerisinde yaşamını devam ettirerek çoğalabilmesi ve bağırsak dışında enfeksiyon oluşturabilmesi gibi özelliklere bağlı olarak gelişmektedir. *Salmonella* cinsi bakterilerin virülans özelliklerini sekresyon sistemleri, fimbriya, flagella ve diğer dış zar yapıları, ortamdan bünyesine demir içeren bileşikler alabilme kapasitesi (sideroforlar), makrofaj içerisinde yaşam, yüzeylerde biyofilm oluşturabilme yeteneği ve antimikrobiyal maddelere karşı direnç mekanizmaları oluşturmaktadır [2].

Serumun bakterisidal etkisi, sistemik enfeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. *Salmonella* türlerinin serumun bakterisidal etkisine direnç göstermeleri enfeksiyon gelişiminde önemli rol oynamaktadır [3].

Son yıllarda bakteriyal enfeksiyonların önlenmesi amacıyla antibiyotiklerin bilinçsiz olarak kullanımı, antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin oluşmasına ve kullanımla doğru orantılı olarak direncin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca besi hayvanlarında tedavi ve büyümeyi teşvik etmek amacıyla antibiyotik katkılı yemlerin kullanımı sonucu bakterilerin direnç kazanımı bir yandan antibiyotiklerin yararlılığını azaltmakta, bir yandan da hayvandan hayvana veya hayvandan insana geçen hastalıkların artmasına yol açmaktadır [4].

Patojen mikroorganizmaların çoğu, ökaryot hücreleri yıkıma uğratan ve patojenitelerinde rol oynayan toksin veya hemolizinler üretirler. *Salmonella* bakterileri ürettiği türe özgü toksinleri olan hemolizinler sayesinde fagositoz aktivitelerinden kaçarak konakta hastalık yapabilme yeteneğinin artmasına yol açmaktadır [5].

Bakterilerin patojenite faktörleri arasında yer alan ve ancak elektron mikroskopuyla görünür kılınan fimbriyalar, bakterilerin konak organizmanın mukoza yüzeylerine yapışmalarından sorumlu organelleridir [6]. Bazı bakteriler, dış yüzeylerinde bulunan lipopolisakaritler sayesinde cansız veya canlı yüzeylere tutunabilme yeteneğine sahiptirler. Bakterilerin yüzeylerde oluşturdukları kalın film şeklindeki tabakaya biyofilm tabakası denilmektedir. *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gibi patojen bakteriler, fimbriyaları ve matriks içerikleri ile tutundukları yüzeylerde çok hücreli bir yaşam formu olan biyofilmleri oluşturmaktadırlar [7].

Birçok bakteri, buldukları demir açısından fakir ortamlardan demiri alabilmek için siderofor denilen protein yapıdaki molekülleri salgılayarak demir ihtiyaçlarını gidermeye çalışmaktadırlar [8]. *Escherichia coli* ve *S. enterica* gibi Enterobacteriaceae üyeleri genellikle katekolat tipte bir molekül olan ve

enterobaktin olarak da adlandırılan enterokelin [9] ve hidroksimat tipte (aerobaktin) sideroforlar üretmektedirler [10]. Bakterilerin konak organizmadan demir koparan siderofor moleküllerini üretmeleri bakterinin patojenitesini artıran bir virülans özelliği olarak bilinmektedir.

Bu çalışma kapsamında, kıyma, deniz suyu ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin ve standart test bakterilerin serum ve antibiyotik duyarlılıkları, hemolitik aktiviteleri, hemagglütinasyon özellikleri, biyofilm oluşturabilme ve siderofor üretme yetenekleri gibi bazı virülans faktörleri incelenerek patojenitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmamızda *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028; American Type Culture Collection, Rockville, MD) ve *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076; American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterileri ile İstanbul ilinde satışa sunulan kıyma örneklerinden daha önceden izole edilen [1] 18 izolat ve deniz suyu örneklerinden daha önceden izole edilen [11] 14 izolat, ayrıca İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Bölümü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen, dışkı örneklerinden izole edilmiş olan üç adet *Salmonella* spp. izolatı kullanılmıştır.

2.1. Serum direnci

Serum direnci mikropleyt yöntemi ile araştırılmıştır. Test edilecek suşların hazırlanan süspansiyonları (10^4 hücre/ml) ve önceden elde edilmiş aktif ve inaktif insan serumları mikropleyt kuyucuklarında eşit hacimlerde (50 µl) karıştırılarak 37°C' lik etüvde inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında (0., 60., 120. ve 180. dakika) Nutrient Agar (NA, Oxoid, UK) besiyerine ekimler yapılarak 37°C' de 24 saat inkübe edilmişlerdir.

Salmonella bakterilerinin serum direncinin saptanmasında Bengte (1988) tarafından kullanılan kriterler dikkate alınmıştır [12].

2.2. Antibiyotik duyarlılık testi

Antibiyotik duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartları doğrultusunda ampisilin (AM) (10 mcg), penisilin G (P) (10 U), amikasin (AN) (30 mcg), mezlosilin (MEZ) (75 mcg), tobramisin (NN) (10 mcg), sefotaksim (CTX) (30 mcg), sefalotin (CF) (30 mcg), sefoksitin (FOX) (30 mcg), seftazidim (CAZ) (30 mcg), sefoperazon (CFP) (75 mcg), gentamisin (GM) (10 mcg), tetrasiklin (TE) (30 mcg), kloramfenikol (C) (30 mcg), nitrofurantoin (F/M) (300 mcg), imipenem (IPM) (10 mcg) ve norfloksasin (NOR) (10 mcg) diskleri kullanılarak

Kirby-Bauer Antibiyotik Disk Difüzyon Yöntemi ile yapılmıştır [13].

2.3. Hemoliz testi

Bakterilerin hemolitik aktivitelerinin tespiti için % 5 koyun eritrositi ve % 5 insan eritrositi içeren Tryptone Soy Agar (TSA, Oxoid, UK) besiyerleri kullanılmıştır. Hemolitik aktivite, 37°C'de 24 - 48 saat inkübasyon sonrası bakteri kolonilerinin etrafında belirgin zonların gözlenmesi ile kaydedilmiştir [14].

2.4. Hemaglutinasyon testi

Hemaglutinasyon deneylerinde steril fizyolojik tuzlu suda ve ayrıca mannoza dirençli hemaglutinasyonu (MR-HA) saptamak amacıyla %2 mannoz içeren steril fizyolojik tuzlu suda hazırlanmış %3'lük kobay ve insan kanı süspansiyonları kullanılmıştır. Mannoza dirençli *Klebsiella* benzeri hemaglutinasyonu (MR/KHA) saptamak amacıyla % 0.003'lük tannik asitle kaplanmış öküz eritrositleri kullanılmıştır [6].

2.5. Biyofilm testi

Biyofilm oluşturma kapasitesi testi 96 kuyucuklu, düz tabanlı, steril, polistren (PVC), kapaklı mikropleyt kullanılarak yapılmış ve %1'lik kristal viyole ile 15 dakika boyanmadan sonra spektrofotometrik olarak kantitatif yöntemle değerlendirilmiştir. Negatif kontrollerin 540 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları ile standart hata değerlerinin toplanması sonucu elde edilen OD₅₄₀ değerine göre değerlendirmeler yapılmıştır [15].

2.6. Siderofor tayini

2.6.1. Siderofor varlığının kültür yöntemi ile incelenmesi

Siderofor üretimi "Chrome azurol S (CAS) agar plate" yöntemi ile araştırılmıştır. Bakterilerin -86°C' deki stok kültürlerinden azaltma yöntemi ile CAS Agar besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 24 - 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda petrielerde üreyen bakteri kolonilerinin etrafında gelişen portakal rengi halenin varlığı siderofor üretimi pozitif olarak kabul edilmiştir [16].

2.6.2. Siderofor varlığının ince tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi ile incelenmesi

2.6.2.1. Bakterilerin ve standart siderofor molekülünün ekstraksiyonu

Salmonella bakterilerinin katekolat tipi siderofor üretimi Arnow yöntemi modifiye edilerek yapılmıştır [17]. Siderofor bileşiklerini içeren ekstraktlar 12 N HCl asit ile muamele edilerek pH 2' ye ayarlanmıştır. Son olarak etil asetat karışımından buharlaştırılarak uzaklaştırılmış ve örnekler 1'er ml saf etil asetat

eklenerek, daha sonra kullanılıncaya kadar -86°C' de saklanmıştır.

Çalışmamızda standart olarak 2,3-dihidroksibenzoik asit (DHBA) molekülü (Aldrich, Germany) kullanılmıştır. Elde edilen standart siderofor molekül solüsyonlarının ekstraksiyonu, bakterilerin ekstraksiyonu ile aynı şekilde gerçekleştirilmiştir [18,19].

2.6.2.2. Siderofor ekstraktlarının ince tabaka kromatografisine (İTK) uygulanması

Silika jel kaplı F₂₅₄ tipinde 20x20 cm büyüklüğünde alüminyum İTK plaklara, standart 2,3-DHBA ekstraktı ve bakterilerden elde edilen siderofor ekstraktlarından uygulanmıştır. Plakalar, çift bölmeli cam İTK tankı içerisinde 20 ml benzen-asetat-su (125:72:3) karışımından oluşan çözücüde yaklaşık 1.5 saat yürütülmüş [19], plakalar çözücüden çıkartılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Plakalar kuruduktan sonra örnekler ultraviyole ışığı altında incelenerek ölçümler yapılmış ve örneklerin R_f değerleri hesaplanmıştır. Örneklerin R_f değerleri, standart 2,3-DHBA molekülünün R_f değerleri ile kıyaslanarak siderofor tipleri belirlenmiştir [15].

3. Bulgular

Kıyma, deniz suyu ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* bakterileri ile standart *Salmonella* suşlarının serum duyarlılıkları incelendiğinde, kıyma izolatlarının onbirinde (% 61.1), deniz suyu izolatlarının üçünde (% 21.4) ve bir standart bakteride (*S. Typhimurium* ATCC 14028) serum direnci görülmüştür (Tablo 1).

Çalışmamızda, kıyma örneklerinden izole edilen 18 bakterinin 12'sinde (% 66.7) P, TE ve F/M antibiyotiklerine karşı çoklu direnç görülürken, bu durum deniz suyundan izole edilen 14 bakteriden sadece birinde (% 7.1) görülmektedir. Ayrıca kıyma izolatlarının birinde (% 5.6) P, CF, FOX, TE ve F/M; birinde (% 5.6) P, CF, FOX ve TE'e; birinde (% 5.6) P, MEZ, TE ve F/M'e çoklu direnç olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, deniz suyundan izole edilen bakterilerin altısında (% 42.8) P ve GM antibiyotiklerine ikili direnç, dördünde (% 28.6) P, NN ve GM'e karşı üçlü direnç görülmekte, diğer deniz suyu izolatlarında ve klinik *Salmonella* bakterileriyle standart *S. Typhimurium* ATCC 14028 ve *S. Enteritidis* ATCC 13076 bakterilerinde P antibiyotiği dışında antibiyotik direnci izlenmemektedir (Tablo 2).

Salmonella bakterilerinin hemoliz oluşturma kapasiteleri incelendiğinde, incelenen bakterilerden sadece kıyma örneklerinden izole edilen üç bakteride (% 16.6) β-hemoliz görüldüğü, buna karşın 37 bakterinin tümünün (% 100) α-hemoliz oluşturma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı kaynaklardan izole edilen *Salmonella* bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının ve virülans faktörlerinin değerlendirilmesi

İzole Edildiği Kaynak	Suş No	Antibiyotikler														Hemoliz		HA			B	S	S D	T	%	Ort %		
		A M	P	MEZ	AN	NN	GM	CTX	CF	FOX	CAZ	CFP	TE	C	IPM	NOR	F/M	α	β	MS							MR	MR/K
Kıyım	ZD-1	-	+	/	-	-	-	-	/	-	/	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	7	29	29	
	ZD-2	-	+	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	7	29		
	ZD-3	/	+	/	-	-	-	-	/	-	-	+	-	-	-	/	+	+	-	-	+	-	+	/	7	29		
	ZD-4	-	+	/	-	-	-	/	/	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	7	29		
	ZD-5	-	+	/	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	7	29		
	ZD-6	-	+	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	8	33		
	ZD-7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	5	21		
	ZD-8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	4	17		
	ZD-10	-	+	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	6	25		
	ZD-11	-	+	/	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	7	29		
	ZD-12	-	+	/	-	-	-	/	/	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	7	29		
	ZD-13	-	+	/	-	-	-	/	/	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	7	29		
	ZD-14	-	+	/	-	-	-	/	/	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	8	33		
	ZD-15	/	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	/	8		33
	ZD-16	-	+	-	-	-	/	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	/	8		33
	ZD-17	-	+	+	-	/	-	/	/	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	8	33		
	ZD-18	/	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	7	29		
	ZD-19	-	+	/	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	/	6		25
	Deniz Suyu	ZS-1	-	+	-	-	-	/	-	-	-	/	/	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	5		21
ZS-2		-	+	/	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	8	33			
ZS-3		-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	5	21			
ZS-4		-	+	/	-	+	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	9	38			
ZS-6		-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	8	33			
ZS-8		-	+	/	-	+	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	7	29			
ZS-9		-	+	-	-	/	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	5	21			
ZS-10		-	+	-	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	5	21			
ZS-11		-	+	/	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	5	21			
ZS-12		-	+	-	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	6	25			
ZS-13		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	5	21			
ZS-14		-	+	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	4	17			
ZS-15		-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	7	29			
ZS-16		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	5	21			
Klinik		ZK-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	5	21	21	
		ZK-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	+	-	-	+	+	-	+	5	21		
	ZK-3	-	+	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	+	-	-	+	+	-	+	5	21			
Standart	ST	-	+	-	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-	/	+	-	-	+	+	-	+	+	6	25	21		
	SE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	4	17			

SD: serum direnci, AM: ampisilin, P: penisilin G, AN: amikasin, MEZ: mezlosilin, NN: tobramislin, CTX: sefotaksim, CF: sefalotin, FOX: sefoksitin, CAZ: seftazidim, CFP: sefoperazon GM: gentamisin, TE: tetrasiklin, C: kloramfenikol, F/M: nitrofurantoin, IPM: imipenem, NOR: norfloksasin, α: α-hemoliz, β: β-hemoliz, HA: hemaglutinasyon tipleri, MS: mannoza duyarlı hemaglutinasyon, MR: mannoza dirençli hemaglutinasyon, MR/K: mannoza dirençli Klebsiella benzeri hemaglutinasyon, B: biyofilm oluşturma kapasitesi, S: siderofor üretimi, *: katekolat tip siderofor, T: toplam virülans sayısı, %: toplam virülans yüzdesi, +: pozitif sonuç, -: negatif sonuç, /: orta derecede duyarlılık, Ort %: kaynağa göre ortalama virülans yüzdesi, ST: S. Typhimurium, SE: S. Enteritidis

Tablo 2. *Salmonella* bakterilerinin çoklu antibiyotik direnci

Çoklu Direnç Profilleri	İzole Edildikleri Kaynak			
	Kıyım	Deniz suyu	Klinik	Standart
P, TE, F/M	12	1	0	0
P, NN, GM	0	4	0	0
P, GM	0	6	0	0
P, CF, FOX, TE	1	0	0	0
P, CF, FOX, TE, F/M	1	0	0	0
P, MEZ, TE, F/M	1	0	0	0
P, CF, FOX	1	0	0	0
Çoklu direnç gösteren bakteri sayısı	16	11	0	0

P: penisilin G, MEZ: mezlosilin, NN:tobramisin, CF: sefalotin, FOX: sefoksitin, GM: gentamisin, TE: tetrasiklin, F/M: nitrofurantoin

Salmonella bakterilerinin tümünün insan ve koyun eritrosit süspansiyonları içerisinde MR-HA oluşturabildikleri, deniz suyundan izole edilen 13 bakterinin (% 92.8) ve klinik bakterilerle standart *Salmonella* bakterilerinin tümünün (% 100) ise MR/KHA oluşturma yeteneğinde oldukları belirlenmiştir (Tablo 1).

Kıyım, deniz suyu ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin genellikle zayıf ve orta kuvvette tutunma, standart *Salmonella* suşlarının ise

orta ve kuvvetli tutunma özellikleri sayesinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları görülmüştür.

Çalışmamızda kullanılan *Salmonella* bakterilerinin CAS Agar besiyerinde siderofor üretme yeteneklerine bakıldığında, kıyım ve klinik örneklerden izole edilen bakterilerin tamamının (% 100) pozitif sonuç verdiği, buna karşın deniz suyundan izole edilen sekiz bakterinin (% 57.1) ve standart bakterilerden sadece *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 bakterisinin siderofor ürettiği belirlenmiştir (Tablo 1).

Ayrıca İTK ile yapılan Rf değerlerinin ölçüm sonuçlarına göre, sadece altı bakterinin (% 16.2) katekolat tipte siderofor üretebildiği görülmüştür (Tablo 1).

4. Tartışma ve Sonuç

Serumun bakterisidal etkisi, sistemik enfeksiyonlara karşı konak savunmasında önemli bir rol oynamaktadır [3]. Çalışmamızda kıyım örneklerinden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin serum direncinin, deniz suyu örneklerinden izole

edilen bakterilere göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Benge (1988), farklı kaynaklardan izole edilen *Klebsiella* bakterilerinde serum direncine en fazla klinik izolatlarda rastlanıldığını, fekal kaynaklı ve çevresel izolatlarda ise serumun bakterisidal etkilerine daha az direnç olduğunu tespit etmiştir. Buna karşın çalışmamızda klinik *Salmonella* bakterilerinde serum direncinin daha az olduğu tespit edilmiştir [12].

Çalışmamızda, gıda ve deniz suyu kaynaklı *Salmonella* bakterilerinin antibiyotik dirençlilik oranının, klinik ve standart bakterilere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca gıda kaynaklı örneklerden izole edilen *Salmonella* bakterilerinde çoklu antibiyotik direncinin görülmesi, besi hayvanlarında kullanılan antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç kazandığını düşündürmektedir.

Gıda kaynaklı ve dışkı yoluyla çevreye yayılan bakterilerin daha önceden antibiyotik etkisine maruz kalarak direnç geliştirmesi söz konusudur. Nitekim Aksakal (2003) kümes hayvanlarının dışkılarından izole ettiği *Salmonella* bakterilerinde P antibiyotiklerine karşı direncin yüksek olduğunu (% 69.4) ve bu sıralamayı GM (% 32.7), TE (% 32.7), AM ve F/M (% 8.2) direncinin izlediğini tespit etmiştir [20]. Çalışmamızda kıyma örneklerinden izole edilen *Salmonella* bakterilerinde GM türevi antibiyotiklere karşı direnç görülmemesi, buna karşın P, TE ve F/M antibiyotiklerine karşı yüksek oranlarda (% 100, % 83.3 ve % 77.8) direnç görülmesi, Aksakal' ın (2003) bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Threlfall (2002) yaptığı derlemede, farklı kaynaklardan ve farklı yaşam alanlarından izole edilen *Salmonella* bakterilerinin antibiyotik direnç durumlarının farklı olduğunu ifade etmektedir [21]. Bu bağlamda çalışmamız, antibiyotik direnç profilinin çeşitliliği bakımından, sözü edilen çalışmanın sonuçları ile uyum göstermektedir.

Nelson ve Roantree (1967) tarafından yapılan bir çalışmada seruma dirençli olduğu belirlenen *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* bakterileri arasında penisilin grubu antibiyotiklere karşı da direnç olduğu tespit edilmiştir [22]. Çalışmamızda incelenen penisilin antibiyotiklerine dirençli standart *S. Enteritidis* ATCC 13076 ve farklı kaynaklardan izole edilmiş *Salmonella* spp. bakterilerinin seruma dirençli olmaması, bakterilerde penisilin türevi antibiyotiklere direnç ile serum direnci arasında bir ilişki olmadığını düşündürmektedir. Nitekim yapılan bu çalışmada, bazı bakterilerde serum direnci olmasına rağmen, penisilin türevi antibiyotiklere duyarlılık görülmüş, dolayısıyla penisilin ve serum direncinin birbirlerinden ayrı birer virülans faktörü olduğu sonucuna varılmıştır.

Bakterilerin ürettikleri ekzotoksinlerin bakterilerin önemli virülans faktörleri arasında olduğu, *Salmonella* bakterilerinin de, ürettikleri sitotoksinler sayesinde konak hücreleri yıkıma uğrattıkları bilinmektedir [5]. Yapılan çalışmalarda *Salmonella* cinsi bakterilerde salmolizin adı verilen hemolitik toksinler tanımlanmış [5], β -hemolitik toksin üretiminin bakterinin virülansında önemli bir etken olduğu belirtilmiştir [14].

Libby vd. (1994) yaptıkları çalışmada, kültür yöntemiyle çoğaltılan *Salmonella* bakterilerinin β -hemoliz yeteneğinin kaybolduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılar bu durumun, *Salmonella* bakterilerinde hemoliz özelliğini kodlayan genlerin, sadece *in vivo* koşullarda ve konak hücre içerisinde aktif hale gelmesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir [5]. Benzer olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, 37 bakterinin sadece üçünde β -hemoliz yeteneğinin görülmesi ve klinik olarak hastalardan izole edilen bakterilerde β -hemolitik aktiviteye rastlanmaması, *Salmonella* bakterilerinin kültür ortamında çoğalması sonucu hemolitik özelliklerini kaybettiğini düşündürmektedir.

Salmonella bakterilerinin virülans özelliklerinin konak türleri arasında değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Romyantsev (2004) yaptığı çalışmada, *Salmonella* toksinlerinin bazı canlı eritrositleriyle (gine domuzu, at, tavşan ve beyaz fare) hemoliz oluştururken, bazı canlı eritrositleriyle (köpek, kedi, tavuk, maymun, koyun ve insan) nadiren hemoliz oluşturduğunu kaydetmiştir. Ayrıca sağlıklı insan eritrositlerinin çoğunlukla hemolize karşı dirençli olduğunu bildirmiştir [23]. Çalışmamızda kullanılan *Salmonella* bakterilerinin insan eritrositleriyle β -hemoliz oluşmaması ve koyun eritrositleriyle oluşturduğu β -hemoliz oranının düşük olmasının (% 8.1), sonuçların kullanılan eritrosit türlerinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Bakterilerde bulunan bir diğer virülans faktörü ise konak canlılara tutunmada görevli olan fimbriya yapılarıdır. Kimiran ve Anđ Küçüker (2002) tarafından yapılan bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen *S. Enteritidis* bakterilerinin çoğunun oda sıcaklığında MR-HA gösterdiğini, buna karşın bakterilerin çok azının MR/KHA gösterdiğini bildirmişlerdir [6]. Çalışmamızda kullanılan *Salmonella* bakterilerinin tümünde MR-HA görülmesi, ayrıca klinik izolatlardan ve standart *S. Enteritidis* ATCC 13076 bakterilerinin tamamının MR/KHA oluşturma özelliği göstermesi Kimiran ve Anđ Küçüker'in (2002) sonuçlarıyla benzerdir.

Bakteriler doğada genellikle biyofilm içerisinde yer alarak yaşamlarını sürdürmektedir. Özellikle su ekosistemlerinde biyofilm yapısı içerisinde yerleşen bakteriler, su yüzeyinde meydana gelen hareketlilikten etkilenmemektedir. Bu şekilde biyofilm oluşturan bakterilerin antijenik özelliklerini,

dolayısıyla virülans etkinliklerini artırdıkları bilinmektedir [24]. Nitekim çalışmamızda deniz suyu örneklerinden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin çoğunda (% 78.5) zayıf, orta veya kuvvetli tutunma ile biyofilm oluşturma kapasitesinin bulunması, sucul ortamlardaki bakterilerin virülansı hakkında fikir vermektedir. Ayrıca, çalışmamızda, kıyma ve deniz suyu örneklerinden izole edilen bakteriler arasında biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından belirgin bir fark olmadığı saptanmıştır.

Demirden yoksun ortamlarda bakterilerin çoğu, düşük molekül ağırlığına sahip ve dış ortamdan demir alımında görev yapan siderofor denilen moleküller üretmektedir. Enterobacteriaceae ailesinin birçok üyesi katekolat tipte sideroforlardan olan enterokelin moleküllerini üretmektedirler [9]. Çalışmamızda kıyma, deniz suyu ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella* cinsi bakterilerin ve standart bakterilerin % 75.7' sinin CAS agar besiyerinde siderofor üretme yeteneğinde olduğu görülmüş, kıyma izolatlarındaki siderofor varlığının (% 94.4), deniz suyu izolatlarına göre (% 57.1) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Standart bakterilerden ise sadece *S. Typhimurium* ATCC 14028 bakterisinde siderofor üretimi görülmüştür.

Çalışmamızda kıyma izolatlarının tümünün ve deniz suyu izolatlarından sekizinin CAS Agar besiyerinde siderofor üretme yeteneğine sahip olduğu, buna karşın İTK ile kıyma örneklerinin ikisinde (ZD-16 ve ZD-17) ve deniz suyu örneklerinin ikisinde (ZS-13 ve ZS-14) 2,3-DHBA molekülünün varlığı tespit edilmiştir (Tablo 1). *Salmonella* bakterilerinin katekolat tipte siderofor sentezlediği bilinmesine rağmen, yapılan bir çalışmada, çevresel örneklerden izole edilen bazı *Salmonella* bakterilerinin mutasyonlar sonucu katekol tipteki 2,3-dihidroksibenzoik asit (2,3-DHBA) gibi katekolat tipte siderofor öncülü molekülleri üretmediği belirlenmiştir [18]. Araştırmamızda referans olarak sadece 2,3-DHBA molekülü kullanıldığından, ölçümlerde görülen farklı Rf değerlerinin *Salmonella* bakterilerinin farklı tipte sideroforlar üretme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, ölçümlerde görülen farklı Rf değerleri, *Salmonella* bakterilerinin katekolat yapıları haricinde, hidroksimat tipte siderofor moleküllerini de üretme yeteneğine sahip olabileceğini göstermektedir.

Bakterilerin ürettiği hemolizinlerin ve siderofor tiplerinin birbirinden farklı olduğu bilinmektedir. Kokosharov ve Phetisova (2002) yaptıkları çalışmada, *Salmonella* bakterilerinin hidroksimat tipte aerobaktin moleküllerini üretme yeteneğinde olduğunu, fakat bakterilerin siderofor üretiminin α -hemoliz aktivitesinden bağımsız olarak geliştiğini tespit etmişlerdir [10]. Çalışmamızdaki tüm *Salmonella* bakterilerinin α -hemoliz oluşturma yeteneğinde olmasına rağmen, sadece bir kısmında siderofor üretimi tespit edilmesi, Kokosharov ve

Phetisova' nın (2002) sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Antibiyotiklerin dış zarda taşınmasında rol oynayan protein yapılarının, aynı zamanda siderofor aracılığıyla demir alımında görevli olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada [25] dış zar yapısı içerisindeki taşıyıcı proteinlerle alınan aminoglikozid veya kinolon türevi antibiyotiklerin, siderofor molekülleri ile yaptığı kimyasal bağlar nedeniyle, hücre duvarı yıkımını gerçekleştirmediği belirlenmiştir. Çalışmamızda CAS agar deneyinde deniz suyu izolatlarından ZS-2, ZS-4, ZS-6, ZS-8, ZS-12, ZS-13 ve ZS-15 izolatlarının aynı zamanda bir aminoglikozid türevi olan GM antibiyotiğine dirençli olması, yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Ortalama toplam virülans oranları değerlendirildiğinde, kıyma örneklerinden izole edilen *Salmonella* bakterilerinin (%29) diğer kaynaklardan izole edilenlere göre daha patojen olduğu, en patojen bakterinin ise %38 virülans değeriyle ZS-4 izolatı olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, *Salmonella* bakterilerinin virülans faktörlerinin izole edildikleri kaynağa göre farklılık gösterdiği görülmüş, fakat bazı durumlarda bu virülans faktörleri arasında bir ilişki olabileceği saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarının, *Salmonella* bakterilerindeki virülans faktörleri konusunda yapılacak olan moleküler çalışmalarla birlikte değerlendirilebileceği ve benzer çalışmalara öncül olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, herhangi bir salgına neden olmadığı düşünülen çevre izolatlarının da enfeksiyon oluşturma potansiyellerinin olduğuna dikkat çekmesi beklenmektedir

Teşekkür

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 17825 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1] Özer, D., Kimiran-Erdem, A. 2013. Comparison of Different Methods for the Detection of *Salmonella* spp. in Minced Meat Samples. Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 19(5), 801-806.
- [2] Sırıken, B. 2013. *Salmonella* Patojenite Adaları. Mikrobiyoloji bülteni, 47(1), 181-188.
- [3] Nishio, M., Okada, N., Miki, T., Haneda, T., Danbara, H. 2005. Identification of the Outer-Membrane Protein PagC Required for the Serum Resistance Phenotype in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. Microbiology, 151(1), 863-873.

- [4] Frost, J.A., Kelleher, A., Rowe, B. 1996. Increasing Ciprofloxacin resistance in *Salmonellas* in England and Wales, 1991-1994. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37(1), 85-91.
- [5] Libby, S.J., Goebel, W., Ludwig A et al. 1994. A Cytolysin Encoded by *Salmonella* Is Required for Survival within Macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 489-493.
- [6] Kimiran, A., Anđ-Küçüker, M. 2002. *Salmonella enteritidis* Suşlarında Hemaglutinasyon Etkinliđi ve Fimbriyalar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 32(1), 270-274.
- [7] Römling, U. 2005. Characterization of the rdar Morphotype, a Multicellular Behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(1), 1234-1246.
- [8] Varma, A., Chincholkar, S.B. 2007. Soil microbiology: Microbial siderophores, 12th ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 978-3-540-71159-9.
- [9] Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., Winkelmann, G. 2003. Salmochelins, Siderophores of *Salmonella enterica* and Uropathogenic *Escherichia coli* Strains, Are Recognized by the Outer Membrane Receptor IronN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3677-3682.
- [10] Kokosharov, T., Phetisova, K. 2002. Hemolysins and Aerobactin in *Salmonella* Gallinarum Strains Isolated from Poultry. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153(6), 411-414.
- [11] Gürün, S., Kimiran-Erdem, A. 2013. Ayamama Deresi'nin Marmara Denizi'ne Deşarj Alanındaki Bakteriyojik Kirlilik Düzeyinin İncelenmesi. *Ekoloji*, 22(86), 48-57.
- [12] Benge, G.R. 1988. Bactericidal Activity of Human Serum against Strains of *Klebsiella* from Different Sources. *Journal of Medical Microbiology*, 27 (1), 11-15.
- [13] CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; 8th ed., Approved standard M2A8, CLSI, Wayne, PA.
- [14] Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Christol, G.J.J. 2004. Antibiotic Resistance Pattern of Motile Aeromonads from Farm Raised Fresh Water Fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 131-134.
- [15] Haslan, E., Kimiran Erdem, A. 2013. Investigation of N-Acyl Homoserine Lactone (AHL) Molecule Production in Gram-Negative Bacteria isolated from Cooling Tower Water, and Biofilm Samples. *Folia Microbiologica*, 13, 349-360.
- [16] Barghouthi, S., Young, R., Olson, M.O., Arceneaux, J.E., Clem, L.W., Byers, B.R. 1989. Amonabactin, a Novel Tryptophan-Orphenylalanine-Containing Phenolate Siderophore in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 171 (4), 1811-1816.
- [17] Arnow, L.E. 1937. Colorimetric Determination of the Components of 3,4-Dihydroxyphenylalaninetyrosine Mixtures. *The Journal of Biological Chemistry*, 118, 531-537.
- [18] Hu, S.P., Felice, L.J., Sivanandan, V., Maheswaran, S.K. 1986. Siderophore Production by *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*, 54(3), 804-810.
- [19] López-Goñi, I., Moriyón, I., Neilands, J.B. 1992. Identification of 2,3-Dihydroxybenzoic Acid as a *Brucella abortus* Siderophore. *Infection and Immunity*, 60(11), 4496- 4503.
- [20] Aksakal, A. 2003. Bazı Kanatlıların Dışkılarında *Salmonella* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı ile Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 14(1), 95-101.
- [21] Threlfall, E.J. 2002. Antimicrobial Drug Resistance in *Salmonella*: Problems and Perspectives in Food- and Water-Borne Infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(1), 141-148.
- [22] Nelson, B.W., Roantree, R.J. 1967. Analyses of Lipopolysaccharides Extracted from Penicillin-Resistant, Serum-Sensitive *Salmonella* Mutants. *Journal of General Microbiology*, 48(1), 179-188.
- [23] Rumyantsev, S.N. 2004. Toward Molecular Level of the "Salmonella-Victim" Ecology, Genetics, and Evolution. *The Scientific World Journal*, 4(1), 193-199.
- [24] Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S. 2006. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916-3923.
- [25] Bastida, A., Hidalgo, A., Chiara, J.L., Torrado M., Corzana, F., Perez-Canadillas, J.M., Groves, P., Garcia-Junceda, E., Gonzalez, C., Jimenez-Barbero, J., Asensio, J.L. 2006. Exploring the use of Conformationally Locked Aminoglycosides as a New Strategy to Overcome Bacterial Resistance. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 100-116.