

Kültürü Yapılan Gökkuşluğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nin Barsağından İzole Edilen Hareketli *Aeromonas* Suşlarının Antibiyotik Hassasiyetleri Üzerine NaCl'ün Etkisi

Jale KORUN *  Hatice Betül TOPRAK *

* Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Hastalıklar Anabilim Dalı, Dumlupınar Bulvarı Kampus, 07058 Antalya - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-453

Özet

Bu çalışmada, gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nin barsağından izole edilen bakterilerin antibiyotik hassasiyeti üzerine NaCl'ün etkisi çalışılmıştır. İncelenen balık örneklerinden toplam 8 bakteri suşu elde edilmiştir. Elde edilen suşlardan 3 *Aeromonas caviae*, 4 *Aeromonas hydrophila*, 1 *Aeromonas sobria* suşu tanımlanmıştır. Suşların ampisilin, c. sulfonamidler, flumequin, tetrasiklin ve trimetoprim'e olan hassasiyetleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak, %2 ve %4 NaCl ilaveli ve NaCl ilavesiz Mueller-Hinton agarda gerçekleştirilmiştir. C. sulfonamidler, flumequin, tetrasiklin ve trimetoprim dahil bu antimikrobiyal maddeler için elde edilen zon çaplarının, çalışmada izole edilen suşlara ve NaCl konsantrasyonlarına göre değiştiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, tüm suşların NaCl'süz ve %2 ve %4 NaCl eklenerek hazırlanan Mueller-Hinton agarda gerçekleştirilen testlerde ampisilin'e dirençli oldukları bulunmuştur. İki *A. hydrophila* suşu dışında, diğer suşlar β-hemolitik aktivite göstermiş, ayrıca suşlar CAS agarlı petrilere siderofor da üretmişlerdir.

Anahtar sözcükler: Gökkuşluğu alabalığı, Hareketli *Aeromonas* Suşları, Antibiyotik, NaCl, Siderofor üretimi, Hemoliz

The Effect of NaCl on Their Antibiotic Susceptibility Motile *Aeromonas* Strains Isolated from the Intestine of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Summary


In this study, the effect of NaCl on antibiotic susceptibility of bacteria isolated from the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were studied. A total of 8 bacterial strains were recovered from the examined fish samples. 3 *Aeromonas caviae*, 4 *Aeromonas hydrophila*, 1 *Aeromonas sobria*, were identified. The susceptibility of the isolated strains to ampicillin, c. sulphonamides, flumequin, tetracycline and trimethoprim were made on Mueller-Hinton agar without and with the addition of 2% and 4% NaCl by using disc diffusion assays. It was determined that the zone diameters obtained for these antimicrobial agents including c. sulphonamides, flumequin, tetracycline and trimethoprim were changed according to the strains isolated in the study and NaCl concentrations. However, it was found that all the strains were resistance to ampicillin in the tests made on Mueller-Hinton agar prepared without NaCl and by adding 2% and 4% NaCl. Except two *A. hydrophila* strains, other strains showed β-haemolytic activity and they also produced siderophore on the CAS agar plates.


Keywords: Rainbow trout, Motile *Aeromonas* Strains, Antibiotic, NaCl, Siderophore production, Haemolysis


GİRİŞ

Balıklar da diğer canlılar gibi mikroorganizmalarla çevrili bir dünyada yaşamaktadırlar. Normal koşullarda balığın yapısı mikroorganizmalara karşı koyabilmekte,

bünyelerinde bunun için çeşitli koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır. Primer bariyerler olarak ifade edilen bu koruyucu mekanizmalar, başlıca goblet hücreleri tarafın-

 İletişim (Correspondence)

 +90 242 3102018

 jalekorun@akdeniz.edu.tr

dan üretilen mukus, barsak epitelyumunun asidik mikroflorası, mide asidi, lizozim ve epidermal mukusun antibakteriyel aktiviteleri şeklinde sıralanmaktadır¹. Bununla birlikte, patojenik mikroorganizmalar bu bariyerleri geçerek, özellikle balıkların stresli olup bağışıklık sistemlerinin zayıfladığı durumlarda hastalıklara neden olabilmektedirler.

Balıklarda patojenik mikroorganizmaların vücuda giriş yapabilme noktaları arasında deri, solungaçlar ve sindirim kanalı yer almaktadır¹. Bu giriş noktalarından biri olan, sindirim kanalının mikroflorası çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılarak, tatlı su balıklarının türüne göre kendi barsak kanallarında *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* türleri ile Enterobacteriaceae, Bacteroidaceae familyası üyelerini içerdiği bildirilmiştir^{2,3}. Bu üyeler arasında yer alan *Aeromonas* spp. Gram-negatif bir bakteri türü olup, hem tatlı suda hem de tuzlu suda yaygın olarak bulunmakta ve sağlıklı balıkların normal barsak mikroflorasının bir kısmını oluşturmaktadır^{4,5}.

Birçok ülkede hayvansal proteinin başlıca kaynağı olan balık, yoğun balık kültürleri ile elde edilmektedir. Bu ortamlarda yapılan üretim, stres ve patojen mikroorganizmalar nedeniyle, hastalıkların yayılmasına ve dolayısıyla antibiyotik ve kimyasal maddelerin kullanımının artmasına neden olmuştur⁵. Bununla birlikte, hasta balıkları tedavi etmek amacı ile kullanılması düşünülen antimikrobialerin doğru seçimi hem ekonomik kayıpları hem de insan sağlığı açısından oluşabilecek riskleri de önemli ölçüde azaltacaktır⁶. Balıklardan izole edilen bakterilerin antimikrobiyal hassasiyetlerinin tespitinde disk difüzyon protokolleri kullanılmaktadır. Bu protokoller arasında yer alan M42-P, *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas hydrophila* ve diğer mezofilik aeromonadlar, *Shewanella* spp., *Aeromonas salmonicida* (psikrofilik olmayan suşlar), *Plesiomonas shigelloides* gibi seçici olmayan bakteri türleri için modifiye edilmemiş Mueller-Hinton agarı (MHA) önermektedir^{7,8}. Bununla birlikte, PANDA (Permanent Advisory Network for Aquatic Disease) ise bazı laboratuvarların antibiyogram testi için besiyerine tuz ilave edilmesinde bakteri suşunun deniz veya tatlı su çevrelerinden izole edilme durumlarına göre karar verdiklerini, örneğin tatlı sudan izole edilen *A. salmonicida* suşları için modifiyesiz MHA'ı kullanırken, deniz balıklarından izole edilen *A. salmonicida* suşları içinse tuz eklenerek hazırlanan MHA'ın kullanıldığını bildirmiştir⁸.

Mevcut çalışmanın amacı ise, gökkuşluğu alabalıklarının barsaklarından izole edilen hareketli *Aeromonas* suşlarının antibiyotik hassasiyet durumları üzerine besiyerine tuz ilavesinin etkili olup olmayacağını tespit edilmesidir. Çalışmada ayrıca, bakteri suşlarının siderofor üretimi ve hemoliz aktiviteleri de çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Balık Örnekleri

Bu çalışmada kullanılan gökkuşluğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü'nden 2007 yılının Ekim ayında temin edildi. Balıklar, içerisinde buz akülerin bulunduğu taşıma kabı ile en kısa sürede araştırmanın yapıldığı laboratuvarına getirildi. Çalışmada toplam olarak 10 balık (ort. ağırlık 114.83 g) kullanıldı.

Mikroorganizmaların İzolasyonu

Laboratuvara getirilen balıklara, 2-phenoxyethanol ile anestezi uygulanarak dekapite edildi. Daha sonra balıkların vücut yüzeyleri %70'lik etil alkol ile silinerek, dezenfeksiyonu yapıldı. Aseptik koşullarda abdominal insizyon gerçekleştirildi. Her bir balığın barsak kanalından gaita örneği alınarak, homojen hale getirildikten sonra alkalın peptonlu su ile seri bir şekilde sulandırıldı. Daha sonra her bir sulandırmadan 0.1 ml alınarak, Beyin Kalp İnfüzyon Agar (BHIA) besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 24±2°C'de 48 saat süre ile inkübe edildi⁵. İnkübasyon sonrası, besiyerinde gelişen bakteri kolonilerinden altkültürler hazırlanarak, aşağıda belirtilen testler uygulandı: Gram boyama, hareket, oksidasyon-fermentasyon (OF) testi, oksidaz, katalaz üretimi, vibriostatik ajanlara karşı hassasiyet (10 µg ve 150 µg), TCBS (Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose) besiyerinde gelişme, arjinin dihidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri, glükozdan gaz üretimi, Voges-Proskauer, metil red testi ve mannitol, arabinoz, galaktoz, sukroz, glukoz ve laktozdan asit üretimi⁹. İzole edilen bakteri suşlarının tanımlanması Baumann ve ark.¹⁰ ve Popoff'a¹¹ göre yapıldı.

Antibiyotik Direnci ve Hassasiyetini Belirleme

Gökkuşluğu alabalıklarının barsağından izole edilen bakterilerin antibiyotik dirençleri üzerine NaCl'ün etkisi, tuzsuz Mueller-Hinton agar ile içerisine %2 ve %4 oranında NaCl eklenerek hazırlanan Mueller-Hinton agar kullanılarak standart disk difüzyon yöntemine göre tespit edildi. Bu amaçla BHIA da pasajlanmış bakteri suşlarının 24±2°C de 16-18 saatlik kültürlerinden öze yardımı ile koloniler alınarak, 2 ml'lik steril fizyolojik suda (%0.9 NaCl) süspanse edilerek, bulanıklık McFarland No. 0.5 olacak şekilde ayarlandı^{12,13}. Bakteri suşları, daha sonra steril pamuklu eküvyon çubukları kullanılarak, tuzsuz Mueller-Hinton agarlı petripler ile içerisinde %2 ve %4 oranında NaCl içeren Mueller-Hinton agarlı petriplerin yüzeyine yayılarak, 15 dak. beklenildi. Daha sonra antibiyotik içeren diskler besiyeri yüzeyine yerleştirilip 24±2°C'de 16-18 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon

süresi sonunda antibiyotik içeren her bir diskin etrafındaki inhibisyon zonunun çapı ölçüldü. Çalışma iki tekrarlı olup sonuçlar, ortalaması alındıktan sonra NCCLS¹⁴ standartlarına göre değerlendirilerek, bakteri suşlarının hassas ya da dirençli oldukları tespit edildi. Çalışmada test edilen antibiyotikler aşağıda verilmiştir: Ampisilin (AMP 10), flumekuın (UB 30), c. sulfonamidler (S3 300), tetrasiklin (TE 30) ve trimetoprim (W5).

Hemolizin Deneyi

Çalışmada izole edilen bakteri suşlarının hemolitik aktivitelerinin tespiti için, içerisinde %5 koyun kanı bulunan Trypticase Soy Agar (TSA) kullanılmıştır. Beta-hemolitik aktivite, 24°C'de 7 günlük inkübasyon sonrası, bakteri kolonilerinin etrafında belirgin zonların görülmesi ile kaydedildi¹⁵.

Siderofor Üretimi

Bakteri suşlarının siderofor üretimlerinin tespiti için Chrome Azurol S (CAS) agarlı besiyerleri kullanıldı¹⁶. Bakteri kolonilerinin etrafında gelişen portakal renkli halenin varlığı, pozitif olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada gökkuşuğu alabalıklarının barsaklarından, 3 *Aeromonas caviae*, 4 *Aeromonas hydrophila*, 1 *Aeromonas sobria* suşu izole edilmiştir. İzole suşların hepsi, hareketli, Gram-negatif, fermentatif ve katalaz pozitif özellik göstermişlerdir^{10,11}. İzole edilen suşlara ait fenotipik özelliklerin tümü ise **Tablo 1**'de verilmiştir. Suşların beta-hemolitik aktiviteleri değerlendirildiğinde, 1 nolu *A. hydrophila* suşu dışında çalışılan diğer izolatların β-hemolitik oldukları tespit edilmiştir. 2 nolu *A. hydrophila* suşu dışında diğer izolatlar CAS agarlı petrielerde koloni etrafında portakal renkli hale oluşturduklarından, siderofor üretimleri pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmada izole edilen 2 nolu *A. hydrophila* suşu en fazla antibiyotik direnç örneği gösteren suş olmuştur. Suşun %0, %2 ve %4 NaCl oranlarında flumekuın dışında trimetoprim, tetrasiklin, c. sulfonamidler ve ampisilin'e karşı dirençli olduğu gözlenmiştir. Çalışmada izole edilen 1, 2 ve 5 nolu *A. hydrophila* suşlarının besiyerindeki NaCl oranının %0'dan %4'e kadar artması ile, flumekuın diskinde karşı gösterdikleri hassasiyet de artmıştır. 1 nolu *A. hydrophila* suşunun c. sulfonamidler'e gösterdiği hassasiyette de tuzluluk oranının artması ile artış göstermiştir. 5 nolu *A. hydrophila* suşunun trimetoprim'e karşı hassasiyeti %0 tuzluluktan %4 tuzluluğa kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. *A. caviae* suşlarından 3 nolu suşun tetrasiklin ve c. sulfonamidler'e gösterdikleri hassasiyet tuzluluk oranının artması ile artma göstermiştir. 4 nolu suş sadece %0 NaCl içeren Mueller-Hinton agarlı besiyerinde

tetrasiklin ve c. sulfonamidler'e karşı hassasiyet gösterirken, diğer tuzluluk oranlarında bu antibiyotiklere karşı dirençli olduğu bulunmuştur. 7 nolu suş ise flumekuın'e karşı hassasiyeti tuzluluk oranlarının %0'dan %4'e kadar artması ile artış göstermiştir. 8 nolu suş *A. sobria*'nın tetrasiklin, flumekuın ve c. sulfonamidler'e olan hassasiyet-

Tablo 1. Çalışmada izole edilen bakteri suşlarına ait fenotipik özellikler

Table 1. The phenotypic characteristics of the isolated bacterial strains in the study

Reaksiyonlar	Suşlar							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Hareket	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Şekil	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç	Ç
Oksidaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F
VP	+	+	-	-	+	-	-	-
Metil red	-	+	+	+	-	+	-	+
Jelatinaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Üreaz	-	-	-	-	-	-	-	-
Amilaz	+	+	-	-	+	+	+	+
İndol	+	-	+	+	+	+	+	-
Simmon's sitrat-	+	-	+	+	+	+	+	+
Nitrat indirgeme	+	+	-	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	+	-	+	-	-	-	-
Arjinin dihidrolaz	+	+	+	+	+	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	-	-	-	-	+	-	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Şekerlerden asit üretimi</i>								
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Sukroz	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinoz	-	+	+	+	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+	+	-	-	-
Glükozdan gaz oluşumu	-	+	+	+	-	-	-	-
TCBS'de gelişme	S ₁ +	S ₁ +	S ₁ +	S ₁ +	S ₁ +	S ₁ +	S ₁ +	S ₁ +
TCBS+%1.5 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
β-hemoliz	-	+	+	+	+	+	+	+
Siderofor üretimi	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Gelişme</i>								
5°C'de	-	-	-	-	-	-	-	-
37°C'de	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>O/129 vibriostat</i>								
10 µg	-	-	-	-	-	-	-	-
150 µg	-	-	-	-	-	-	-	-

Semboller; +: pozitif, -: negatif, Ç: çomak, KB: kokobasil, ONPG: o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside, O/129: 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate, VP: Voges-Proskauer, s: sarı renkli koloni oluşumu, y: yeşil renkli koloni oluşumu, O/F: Oksidasyon / Fermentasyon, 3, 4, 7: *Aeromonas caviae*, 1, 2, 5, 6: *A. hydrophila*, 8: *Aeromonas sobria*

leri tuzluluk oranlarının %0'dan %4'e artması ile birlikte artmıştır. Çalışmada izole edilen bakteri suşlarının hepsinin ampisilin'e karşı %0, %2 ve %4 NaCl oranlarında direnç gösterdikleri tespit edilmiştir (Tablo 2, 3, 4).

Tablo 2. %0 NaCl tuzlulukta bakteri izolatlarının antibiyogram test sonuçları

Table 2. The antibiogram tests results of the bacteria isolates at 0% NaCl

Antibiyotikler	Suşlar							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Trimetoprim	2.6	0	3.2	0	2.5	2.5	3.1	2.5
Tetrasiklin	0	0	2.3	2.4	2.6	2.6	2.3	2.1
Flumequin	2.7	2.4	3.4	3.6	4.0	3.6	3.6	4.3
c. sulfonamidler	2.8	0	2.2	2.3	3.4	2.7	3.3	2.1
Ampisilin	0	0	0	0	0	0	0	0

Tablo 3. %2 NaCl tuzlulukta bakteri izolatlarının antibiyogram test sonuçları

Table 3. The antibiogram tests results of the bacteria isolates at 2% NaCl

Antibiyotikler	Suşlar							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Trimetoprim	2.6	0	2.8	0	2.8	2.2	3.4	2.6
Tetrasiklin	0	0	2.5	0	2.8	2.5	2.8	2.6
Flumequin	3.8	2.5	4.1	2.8	4.0	3.6	3.9	4.3
c. sulfonamidler	2.9	0	3.0	0	3.1	2.6	3.5	3.5
Ampisilin	0	0	0	1.1	0	0	0	0

Tablo 4. %4 NaCl tuzlulukta bakteri izolatlarının antibiyogram test sonuçları

Table 4. The antibiogram tests results of the bacteria isolates at 4% NaCl

Antibiyotikler	Suşlar							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Trimetoprim	3.4	0	3.9	0	3.3	2.6	3.6	3.7
Tetrasiklin	0	0	3.5	0	3.5	3.0	2.2	3.6
Flumequin	4.3	2.9	3.9	3.0	4.2	3.4	4.4	4.9
c. sulfonamidler	3.5	0	3.8	0	4.1	3.0	3.6	4.5
Ampisilin	0	0	0	0	0	0	0	0

TARTIŞMA ve SONUÇ

Gökkuşluğu alabalıklarının barsağından izole edilen hareketli *Aeromonas* suşlarının antibiyotiklere olan dirençliliği üzerine NaCl'ün etkisini araştırmak amacı ile gerçekleştirilen bu çalışmada, *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* olmak üzere üç suş izole ve tanımlanmıştır. Ülkemizde gökkuşluğu alabalıklarının barsak florası

ile ilgili olarak yapılan diğer çalışmalarda; *Salmonella*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Alcaligenes* ve *Proteus* türlerinin tespit edildiği ifade edilmektedir¹⁷⁻¹⁹. Hareketli *Aeromonas* türlerinin, sağlıklı balıkların normal barsak mikrobiyotasının bir kısmını oluşturdukları bildirilmesine karşın^{4,5}, *A. hydrophila*'nın hastalık etkeni olarak sazan (*Cyprinus carpio*), tatlı su levreği (*Perca fluviatilis*), havuz balığı (*Carasius auratus*) gibi tatlı su balıklarında ayrıca Ege Denizi'nde kültürü yapılan Avrupa levrek balıklarından (*Dicentrarchus labrax*) ve Puntazzo puntazzo'dan izole edildikleri bildirilmiştir^{20,21}.

Bu çalışmada izole edilen suşlardan, 1 nolu *A. hydrophila* suşu dışında çalışılan diğer suşların β -hemolitik oldukları tespit edilmiştir. Hatha ve ark.¹⁵ izole ettikleri hareketli *Aeromonas* suşlarının kanlı besiyerinde β -hemoliz oluşturduklarını bildirmiştir. Mikroorganizmalar demiri tutmak amacı ile sideroforları üretilen salgımlar²². Esteve ve Amaro²³ yılan balıklarından izole ettikleri hareketli *Aeromonas* suşlarının CAS agarda siderofor ürettiklerini bildirmiştir. Gökkuşluğu alabalıklarının barsağından izole edilen, 2 nolu *A. hydrophila* suşu dışındaki diğer izolatların da bu çalışmada siderofor üretimlerinin pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Gökkuşluğu alabalıklarının barsaklarından izole edilen hareketli *Aeromonas* suşlarının antibiyotik hassasiyetleri üzerine NaCl'ün etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, suşların trimetoprim'e karşı hassasiyetlerinin besiyerine katılan tuz miktarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği, suşa bağlı olarak %2 NaCl de zon çaplarında 0.1-0.3 cm kadar artış söz konusu iken, %4 NaCl de suşların hassasiyet zon çaplarının 0.1-1.2 cm kadar arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 2 nolu *A. hydrophila* suşu ile 4 nolu *A. caviae* suşunun trimetoprime karşı tüm tuzluluk oranlarında dirençli oldukları görülmüştür. Çalışmada izole edilen *A. hydrophila* suşlardan 5 ve 6 nolu suşların tetrasiklin antibiyotiklerine karşı tuz oranının artışına bağlı olarak arttığı ve %4 NaCl içeren MHA besiyerinde zon çapının %0 NaCl içeren MHA besiyerindeki zon çapından 0.2-0.9 cm daha geniş olduğu tespit edilmiştir. 1 ve 2 nolu *A. hydrophila* suşlarının ise bu antibiyotiklere karşı bütün tuzluluk değerlerinde dirençli oldukları tespit edilmiştir. Çalışmada izole edilen tüm suşların flumequin'e karşı tüm tuzluluk oranlarında hassas oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte 1 ve 2 nolu *A. hydrophila* suşları ile 7 nolu *A. caviae* suşunun bu antibiyotiklere karşı hassasiyetleri %0 tuzluluktan %4 tuzluluk da dahil olmak üzere artış gösterirken, 5 nolu *A. hydrophila* suşu ile 8 nolu *A. sobria* suşlarının flumequin için zon çaplarının %0 ve %2 NaCl'de değişmediği ancak %4 NaCl de ise

artış (0.2 cm) göstermiştir. 2 nolu *A. hydrophila* suşu c. sulfonamidlere karşı tüm tuzluluk oranlarında dirençli olduğu, 4 nolu *A. caviae* suşunun ise %0 tuzlulukta hassas, %2 ve %4 tuzluluk oranlarında ise direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer hareketli *Aeromonas* suşlarının (1, 3, 7 ve 8 nolu suşlar) ise c. sulfonamidlere karşı hassasiyetlerinin tuz oranının artışına bağlı olarak, arttığı tespit edilmiştir. 5 ve 6 nolu *A. hydrophila* suşlarının c. sulfonamidlere karşı hassasiyetlikleri %0 NaCl içeren MHA besiyerinde %2 NaCl içeren MHA besiyerine göre daha fazla olduğu, %2 NaCl de zon çapının 0.1-0.3 cm kadar azaldığı ancak %4 NaCl oranında ise zon çaplarında %0 NaCl oranına göre 0.3-0.7 cm'lik artış görülmüştür. Çalışmamızda Mueller-Hinton besiyerine %0, %2 ve %4 oranlarında NaCl ilave edilerek gerçekleştirilen antibiyogram testlerinde, çalışılan bakteri suşlarına göre trimetoprim, flumequin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı hassasiyetlerinin tuz oranının artmasına bağlı olarak arttığı, bazı suşların tetrasiklin'e tüm tuzluluk oranlarında dirençli oldukları, bazı suşların ise c. sulfonamid karşı gösterdikleri hassasiyetin %0 ve %4 tuzluluk oranlarında daha yüksek, %2 NaCl oranında ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Douglas ve ark.⁸ MHA'a %2 NaCl ilavesinin, disk difüzyon deneyleri tarafından gerçekleştirilen veriler üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini bildirmiştir. Yine aynı araştırmacılar referans suş *A. salmonicida*'nın (NCIMB 1102) antimikrobiyal ajanlara karşı hassasiyeti üzerine NaCl'ün etkisini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada; ampicilin, eritromisin, enrofloksasin, florfenikol, oksalınik asit ve oksitetrasiklin antibiyotiklerine karşı oluşan zon çapının tuzlu MHA besiyerinde 10 mm daha büyük olduğunu ve trimetoprim/sulfametokzol diskleri içinse zon çap büyüklüğünün yukarıda belirtilen diğer antibiyotik disklerine oranla daha küçük ancak önemli olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, Pursell ve ark.²⁴ *A. salmonicida*'nın flumequin için Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri üzerine NaCl konsantrasyonlarının suşlar arasında farklılık gösterdiğini öne sürerken, Medeiros ve ark.²⁵ ise MİK değerleri üzerine NaCl'ün etkisinin hem türe özgü hem de antibiyotik maddeye özgü olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda diğer araştırmacıların bulgularına benzer olarak, izole ettiğimiz suşların antibiyotik hassasiyetleri üzerine NaCl'ün konsantrasyonlarının suşlar arasında farklılık gösterdiğini ve zon çapları üzerine NaCl'ün etkisinin hem bakteri suşuna hem de çalışmada kullanılan antimikrobiyallere özgü olduğunu tespit ettik. *Aeromonas* trota dışında, çoğu aeromonad suşu kromozomal olarak kodlanan β-laktamazların üretiminden dolayı ampicilin'e direnç göstermekte olup²⁶, Hatha ve ark.¹⁵ *Catla catla*, *Labeo rohita* ve *Ctenopharyngodon idella* gibi tatlı su balık türlerinin mide-barsak kanalından izole ettikleri *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* suşlarının ampicilin'e dirençli olduklarını bildirmiştir. Çalışmamızda izole

ettiğimiz hareketli *Aeromonas* suşlarının bu antibiyotiğe karşı tüm tuzluluk oranlarında dirençli oldukları gözlenmiştir. Bu bulgularımız Hatha ve ark.'nın¹⁵ bulgularına benzerlik göstermektedir.

Hareketli *Aeromonas* türlerinden *A. hydrophila* suşlarının denizde kültürü yapılan levrek (*D. labrax*) ve *Puntazzo puntazzo* balık türlerinden izole edildiğine dair çalışmalarda mevcuttur. Bu türlerin izolasyonunda NaCl içeren besiyerleri, örneğin Tryptic Soy Agar (TSA) kullanılmaktadır. Ayrıca, bir başka balık patojeni *Pseudomonas anguilliseptica*'nın hasta kültür çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve kalkan (*Scophthalmus maximus*) gibi deniz balıklarından izole edildiği bir çalışmada²⁷, araştırmacılar bakteri suşunun %0 tuzlulukta gelişme gösterdiğini ve ilk izolasyonlarının tuz ilave edilmiş besiyerinde gerçekleştirdiklerini bildirirken, Balbao ve ark.²⁸ ise *P. anguilla* suşlarının morina (*Gadus morhua*) balıklarından izolasyonlarının %1 NaCl eklenecek hazırlanan tuzlu TSA da gerçekleştirdiklerini ve suşların antibiyotik hassasiyetlerini belirlemek amacı ile %1 NaCl içeren MHA besiyerini kullandıklarını bildirmiştir.

Bu nedenle, *A. hydrophila* gibi tatlı su balık türleri ile deniz balıklarından izole edilen veya deniz balıklarından izole edilmesine karşın %0 tuzlulukta gelişme gösterebilen diğer bakteri suşlarının antibiyotik hassasiyetleri üzerine NaCl'ün etkisinin araştırılmasının, tedaviye yönelik uygulamalarda, hangi antibiyotiğin daha etkili olabileceği yönünde fikir verebileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Ringø E, Jutfelt F, Kanapathipillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE: Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res*, 318, 305-311, 2004.
2. Asfie M, Yoshima T, Sugitand H: Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. *Fish Sci*, 69, 21-26, 2003.
3. Sakata T: Microflora of Healthy Animals. In, Austin B, Austin DA (Eds): Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. pp. 141-163, Ellis Horwood Limited, Chichester. 1989.
4. Schroers V, van der Marel M, Neuhaus H, Steinhagen D: Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 288, 184-189, 2009.
5. Karataş-Düğenci S, Candan A: Isolation of *Aeromonas* strains isolated from the intestinal flora of Atlantic salmon (*Salmo salar* L. 1758). *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 1071-1075, 2002.
6. Kirkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O, Tekbıyık S: *In vitro* antimicrobial susceptibility of pathogenic bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turk J Vet Anim Sci*, 30, 337-341, 2006.

- 7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI):** Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals: Approved Guideline, CLSI document M42-A Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- 8. Douglas I, Smith P, Fleming GTA:** The effect of NaCl on measures of the antimicrobial agent susceptibility of *Aeromonas salmonicida* in standard disc diffusion assays. *Bull Eur Fish Pathol*, 26 (5): 232-235, 2006.
- 9. Joseph SW, Carnahan A:** The isolation, identification, and systematics of the motile *Aeromonas* species. *Annu Rev Fish Dis*, 4, 315-343, 1994.
- 10. Baumann P, Furniss AL, Lee JV:** Genus I. *Vibrio*. In, Krieg NR, Holt JG, (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.1, pp. 518-538. Williams and Wilkins, 1994.
- 11. Popoff M:** Genus 3 *Aeromonas*. In, Krieg NR, Holt JG, (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, pp. 545-548. Williams and Wilkins, Baltimore, 1984.
- 12. Alderman DJ, Smith P:** Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, 196, 211-243, 2001.
- 13. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M:** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-496, 1966.
- 14. NCCLS:** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eighth ed. NCCLS documents M2-A8 /M100-S13 (M2), (ISBN 1-56238-485-6), 2003.
- 15. Hatha M, Vivekanandham AA, Jukie Joice Christol G:** Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *Int J Food Microbiol*, 98, 131-134, 2005.
- 16. Schwyn B, Neilands JB:** Universal chemical assay for the detection and determination siderophores, *Anal Biochem*, 160 (1): 47-56, 1987.
- 17. Kılıç A, Şeker E, Özcan M, İspir Ü:** Elazığ'daki gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) işletmelerinin bakteriyel yönden incelenmesi. *Fırat Üniv Fen ve Müh Bil Derg*, 19 (2): 129-132, 2007.
- 18. Diler Ö, Altun S, Çalikuşu F, Diler A:** Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kalitatif ve kantitatif bakteriyel florası üzerine bir araştırma. *Turk J Vet Anim Sci*, 24, 251-259, 2000.
- 19. Sarıeyüpoğlu M:** Gökkuşığı alabalıklarında (*S. gairdneri*) mide-barsak bakteriyel florasının aerobik yönden incelenmesi. *Doğa Bil Derg*, 8 (3): 281-287, 1984.
- 20. Şahrikoğlu L:** Levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) Balıklarında *Aeromonas hydrophila* İnfeksiyonu Üzerinde Bir Çalışma. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniv Fen Bil Enst, s. 40, 2002.
- 21. Doukas V, Ahtanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E:** *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. *J Fish Dis*, 21, 317-320, 1998.
- 22. Pérez-Miranda N, Cabirol R, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ:** O-CAS, a fast and universal method for siderophore production. *J Microbiol Methods*, 70 (1): 127-131, 2007.
- 23. Esteve C, Amaro C:** Siderophore production in *Aeromonas* spp. isolated from European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis*, 14, 423-427, 1991.
- 24. Pursell L, Samuelsen OB, Smith P:** Reduction in the *in vitro* activity of flumequine against *Aeromonas salmonicida* in the presence of the concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺ ions found in sea water. *Aquaculture*, 135, 245-256, 1995.
- 25. Medeiros AA, O'Brien TF, Wacker WE, Yulug NF:** Effect of salt concentration on the apparent *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas* and other gram-negative bacilli to gentamicin. *J Infect Dis*, 124, 1971.
- 26. Huddleston JR, Zak JC, Jeter RM:** Sampling bias created by ampicillin in isolation media for *Aeromonas*. *Can J Microbiol*, 53, 39-44, 2007.
- 27. Berthe FCJ, Michel C, Bernardet JF:** Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Dis aquat Org*, 21, 151-155, 1995.
- 28. Balboa S, Ferguson HW, Romalde JL:** Phenotypic, serological and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from cod, *Gadus morhua* L., in northern Europe. *J Fish Dis*, 30, 657-664, 2007.