



## ***Yersinia ruckeri* izolatlarında biyofilm oluşumunun ve bazı virulens faktörlerinin belirlenmesi**

**Esra Demirbaş<sup>1\*</sup>**, **Cansu Aktaş<sup>2</sup>**, **Volkan Kaydu<sup>3</sup>**, **Enescan Aksoy<sup>4</sup>**, **İlker Hancı<sup>5</sup>**,  
**Ünver Oğuzhan Tekay<sup>6</sup>**, **Meltem Özer<sup>7</sup>**, **Ertan Emek Onuk<sup>8</sup>**

<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Atakum, Samsun, Türkiye

**Geliş Tarihi** / Received: 23.01.2023, **Kabul Tarihi** / Accepted: 10.03.2023

**Özet:** Çalışmada gökkuşuğu alabalıklarından (*Oncorhynchus mykiss*) izole edilen 20 adet *Yersinia ruckeri* (*Y. ruckeri*) izolatının biyofilm oluşturma yeteneği ve bazı virulens faktörleri fenotipik olarak incelendi. İzolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde Kongo Red Agar (CRA), Modifiye Tüp Aderans (Christensen) ve Mikroplak yöntemleri kullanıldı. İzolatların hareket özelliği, hemolitik aktivitesi, lipaz aktivitesi ve proteaz aktivitesi fenotipik metotlar ile ortaya konuldu. CRA ve Christensen yöntemleri ile izolatlar biyofilm oluşturmazken mikroplak yönteminde izolatların büyük bir kısmının zayıf düzeyde biyofilm oluşturduğu saptandı. İzolatların 13'ünün hareketli ve lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenirken, 14 izolatın ise proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Ek olarak izolatların tamamının non-hemolitik olduğu saptandı. Çalışma sonuçlarına göre sadece hareket ve lipaz aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönlü, güçlü bir korelasyon saptandı. Mikroorganizmaların patojenitesi virulens faktörleri ve biyofilm oluşumu ile bağlantılı bir süreçtir. Bu nedenle, sonuçlarımızın *Y. ruckeri* enfeksiyonlarının önlenmesi veya tedavi edilmesinde anti-biyofilm terapilerinin geliştirilmesi gibi yeni stratejilerin oluşturulmasına önemli katkılar sağlayacağını öngörüyoruz.

**Anahtar kelimeler:** Akuakültür, biyofilm oluşumu, virulens faktörleri, *Yersinia ruckeri*

### **Determination of biofilm formation and some virulence factors in *Yersinia ruckeri* isolates**

**Abstract:** In the current study, biofilm forming ability and some virulence factors of 20 *Yersinia ruckeri* (*Y. ruckeri*) isolates obtained from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were examined phenotypically. The Congo Red Agar (CRA), Modified Tube Aderans (Christensen) and Microplate methods were used to determine the biofilm forming ability of these isolates. The motility characteristics, hemolytic activity, lipase activity and protease activity of the isolates were determined by phenotypic tests. It was determined that the majority of the isolates produced a weak biofilm when examined using the microplate method, despite the fact that isolates did not produce biofilms when evaluated using the CRA and Christensen methods. While 14 isolates were discovered to have protease activity, 13 of the isolates were determined to be motile and to have lipase activity. All of the isolates were also determined to be nonhemolytic. According to the study's results, a statistically significant, positive and strong correlation was found only between motility and lipase activity. The pathogenicity of microorganisms is associated with virulence factors and biofilm formation. Hence, we envisage that our results will significantly contribute to the establishment of novel techniques such as the development of anti-biofilm therapies for prevention or treatment of *Y. ruckeri* infections.

We envisage that our results will significantly contribute to the development of new photonic and light sensing devices.

**Keywords:** Aquaculture, biofilm formation, virulence factors, *Yersinia ruckeri*

### **Giriş**

*Y. ruckeri* balıklarda yersiniozis veya enterik kırmızı ağız (Enteric redmouth disease) hastalığı olarak bilinen hemorajik septisemi ile karakterize hastalığın etiyolojik etkenidir (Kumar ve ark., 2015). Hastalık salmonid cinsi balıkların en önemli hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir ve dünya genelinde, salmonid cinsi balık yetiştiriciliğinin yapıldığı her

yerde görülür. Etkenin salmonidler dışında diğer balık türlerinde de enfeksiyona neden olduğu rapor edilmiştir. Ancak diğer balık türlerine göre salmonidlerin, özellikle de, bu cins içerisinde yer alan gökkuşuğu alabalığının *Y. ruckeri* enfeksiyonuna daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Yersiniozis sistemik bir hastalıktır. Balıkların tüm gelişim aşamalarında görülür ve yüksek düzeyde mortaliteye neden olur (Hor-

**Yazışma adresi / Correspondence:** Esra Demirbaş, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Körfez Mah. Kurupelit Kampüsü Veteriner Fakültesi Atakum, Samsun, Türkiye e-posta: [esra.demirbas@omu.edu.tr](mailto:esra.demirbas@omu.edu.tr)

**ORCID IDs of the authors:** <sup>1</sup>0000-0002-3708-0804 • <sup>2</sup>0000-0003-3869-870X • <sup>3</sup>0000-0001-9631-1353 • <sup>4</sup>0000-0002-0722-2525 • <sup>5</sup>0000-0003-1031-6263 • <sup>6</sup>0000-0002-4580-1712 • <sup>7</sup>0000-0003-1629-2442 • <sup>8</sup>0000-0001-7643-046X

ne ve Barnes, 1999; Tobback ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2015). *Y. ruckeri* enfeksiyonlarında bulaşma enfekte ve taşıyıcı hayvanlar ile doğrudan temas yoluyla olmaktadır. Taşıyıcı durumda olan balıklar stres altında kaldığında enfeksiyonu yayabilmektedirler (Tobback ve ark., 2007; Kumar ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada gökkuşuğu alabalıklarında *Y. ruckeri* enfeksiyonundan 45 gün sonra dahi popülasyonun %25'inin, bağırsağının son bölümünde herhangi bir klinik tablo görülmeden etkeni taşıdığı belirlenmiştir (Busch ve Lingg, 1975). Klinik tablo göstermeyen bu tarz balıklarda görülen döngüsel salınım, kültür baliçlığı tesislerinde salgınların tamamen önlenmesini zorlaştırmaktadır (Wrobel ve ark., 2020).

*Y. ruckeri*, *Enterobacteriaceae* familyasının bir üyesidir. Etken Gram negatif, fakültatif anaerobik, sporsuz, kapsülsüz, çomak şeklinde bir bakteridir. Bazı suşlar flagellaya sahiptir ve buna bağlı olarak değişken bir bakteriyel hareket sergilerler. *Y. ruckeri* izolatları flagella'nın varlığına veya yokluğuna ve Tween 20/80'i hidrolize etme yeteneklerine bağlı olarak iki farklı biyotipe ayrılmıştır. Biyotip 1 içerisinde yer alan suşlar hareket ve lipaz sekresyonu yönünden pozitif iken, biyotip 2 içerisinde yer alan suşlar negatiftir (Horne ve Barnes, 1999; Tobback ve ark., 2007; Moreau ve ark., 2019; Wrobel ve ark., 2019). Serolojik olarak ise suşlar 4 grup içerisinde sınıflandırılmıştır (Romalde ve ark., 1993). Salmonidlerdeki epizootiklerin büyük çoğunluğuna serotip O1 biyotip 1'in neden olduğu bildirilmiştir. Ancak son yıllarda Avrupa ve Amerika'da biyotip 1 suşları içeren aşılardan kaçınmış olan salmonidlerde hastalık raporlarının sayısının arttığı gözlenmiştir. Bu salgınların bir kısmının hareketsiz olan *Y. ruckeri* serotip O1 biyotip 2 izolatlarından kaynaklandığı belirlenmiştir (Romalde JL ve Toranzo, 1993; Fouz ve ark., 2006; Arias ve ark., 2007; Calvez ve ark., 2014). Bu durum sadece biyotip 1 suşlardan yapılmış geleneksel aşılardan etkinliklerinin gözden geçirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Yapılan bir çalışmada monovalent *Y. ruckeri* aşısının biyotipler arasında çapraz koruma sağlamadığını ve biyotip 1 ile biyotip 2 izolatları arasında koruyucu antijenlerde fark olduğunu ortaya koymuştur (Tinsley ve ark., 2011).

*Y. ruckeri*'nin gökkuşuğu alabalığı ve Atlantik somon (*Salmo salar*) balığı yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplardan sorumlu olduğu iyi bilinmektedir. Buna rağmen bu patojenin virulens mekanizmalarını inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Wrobel ve ark., 2019). *Y. ruckeri*'nin şimdiki kadar tanımlanan virulens faktörlerinin birçoğunun özellikle, enterobakter grubunda yer alan çeşitli Gram negatif patojenik bakterilerde ortak olan ekstraselüler

ler faktörlere benzediği vurgulanmıştır. Ekstraselüler proteazlar, hemolizinler ve sideroforlar *Y. ruckeri*'nin enfeksiyon sürecinde yer alan temel ekstraselüler moleküller arasında yer almaktadır (Guijarro ve ark., 2018). Akuatik ortamlardaki sediment ve havuz, tank vb. yüzeylerdeki bakterilerin hayatta kalmasında en önemli etmen biyofilm oluşumudur (Kumar ve ark., 2015). Biyofilm, mikroorganizmalar için güvenli bir ev olarak tanımlanmaktadır ve bu yapı mikroorganizmalar tarafından üretilen polisakkaritler, hücre dışı proteinler, nükleik asit ve su gibi hücre dışı polimerik maddeleri içermektedir (Rather ve ark., 2021). Son yıllarda önemli balık patojenlerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin, biyofilm oluşumu üzerine etkili faktörlerin ve patojenlerin su ürünleri endüstrisinde kullanılan farklı türdeki materyallere kolonizasyon tercihlerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görülmektedir (Cai ve Arias, 2017; Chenia ve Duma, 2017; Rios-Castillo ve ark., 2018). Bununla birlikte *Y. ruckeri* üzerine yapılan çalışmaların ise oldukça yetersiz olduğu görülmektedir (Coquet ve ark., 2002a; 2002b; Filik ve Kubilay, 2019a; 2019b; Torabi ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar *Y. ruckeri*'nin balık kafesleri gibi akuakültür altyapısının ortak bileşenleri olan ahşap, beton, polivinil klorür (PVC) ve fiberglass gibi yüzey malzemeleri üzerindeki biyofilmlerde veya mikro kolonilerde uzun süre yaşayabildiğini göstermiştir (Coquet ve ark., 2002a; 2002b; Wrobel ve ark., 2020). Ayrıca, *Y. ruckeri* tarafından oluşturulan biyofilmin, gökkuşuğu alabalıklarında uzun dönemler boyunca tekrarlayan enfeksiyonların kaynağı olabileceği ileri sürülmektedir (Coquet ve ark., 2002a). *Y. ruckeri* enfeksiyonlarında patojenite ile biyofilm oluşumu ve virulens faktörleri arasındaki olası etkileşimlerin anlaşılabilmesi için farklı konakçı ve coğrafyalardan izole edilmiş türler üzerinde yeni çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Türkiye'de farklı bölgelerden izole edilmiş gökkuşuğu alabalığı kökenli 20 *Y. ruckeri* izolatının biyofilm oluşturma yeteneklerinin üç farklı yöntem ile karşılaştırmalı olarak ortaya konulması, izolatların sahip olduğu bazı virulens özelliklerinin fenotipik olarak belirlenmesi ve virulens faktörlerinin biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Materyol ve Metot

### Bakteriyel izolatlar ve kültür şartları

Çalışmada farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş, 20 adet gökkuşuğu alabalığı kökenli *Y. ruckeri* izolatı kullanıldı. İzolatların kökenleri ve kaynağı Tablo 1'de verildi. Çalışmadan önce %15 gliserinli buyyon içeri-

sinde -20°C'de saklanan izolatlar, trypticase soy broth (TSB)'a (Merck, Almanya) pasajlanarak 25°C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan *Y. ruckeri* izolatları ve izolasyon yerleri

No	İzolatlar	İzolasyon Yeri	
1	17 SA	Isparta	Akdeniz
2	Çandır	Isparta	Akdeniz
3	Baysallar	Isparta	Akdeniz
4	15 SA	Isparta	Akdeniz
5	35 SA	Denizli	Ege
6	7 SA	Denizli	Ege
7	18/2 SA	Denizli	Ege
8	A	Muğla	Ege
9	B	Muğla	Ege
10	C	Muğla	Ege
11	D	Muğla	Ege
12	36 SA	Yalova	Marmara
13	5 SA	Adapazarı	Marmara
14	29 SA	Adapazarı	Marmara
15	27 SA	Bolu	Karadeniz
16	8	Samsun	Karadeniz
17	80	Samsun	Karadeniz
18	81	Samsun	Karadeniz
19	82	Samsun	Karadeniz
20	6 SA	Kırıkkale	İç Anadolu

### İzolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi

İzolatların biyofilm üretme yeteneklerinin belirlenmesinde Kongo Red Agar (CRA), Modifiye Tüp Aderans (Christensen) ve Mikroplak yöntemleri kullanıldı.

**CRA Yöntemi:** Bu yöntem ile izolatların biyofilm üretimi CRA (litrede 10 gr agar (Biolife, İtalya), 50 gr glikoz (Himedia, Hindistan), 52 gr Brain-Heart Infusion Broth (Biolife, İtalya), 0,8 gr Kongo red boyası (İsolab, Almanya) ile belirlendi. Trypticase Soy Agar (TSA)'da (Merck, Almanya) saf olarak üreyen kolonilerden tek koloni alınarak, CRA'ya ekimleri yapıldı. Besiyerleri 25°C'de 24-48 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkubasyon süresi sonunda kolonilerde oluşan renk değişimlerine göre, siyah-gri renkte koloni oluşturan izolatlar biyofilm pozitif, pembe-kırmızı renkli koloniler biyofilm negatif olarak değerlendirildi (Ciftci ve ark., 2009; Atshan ve ark., 2012).

**Modifiye Tüp Aderans (Christensen) Yöntemi:** Bu yöntem ile biyofilm varlığı Christensen ve ark.,

(1985) tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. TSA'da üreyen izolatlardan %3 glikoz içeren TSB'ye geçildi ve besiyerleri 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. İnkubasyon sonrası tüplerde bulunan içerik boşaltıldı ve tüpler fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) ile yıkanarak, her bir tüpe 10'ar ml safranin (İsolab, Almanya) eklendi ve 5 dakika bekletildi. Daha sonra tüpler boşaltıldı ve bir gece kurumaya bırakıldı. Tüplerin iç çeperindeki rengin koyuluğu ve kalınlığına göre izolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri çok güçlü (+++), güçlü (++) ve zayıf (+) olarak değerlendirildi.

**Mikroplak Yöntemi:** TSB'de üretilen bakteri süspansiyonlarından 200 µl alınarak her bir izolat için üçer kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplak içerisine inoküle edildi ve 25°C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İlk üç kuyucuğa negatif kontrol olarak steril PBS inoküle edildi. İnkubasyon sonrası kuyucuk içerikleri boşaltılarak PBS ile yıkandı. Biyofilmin fizyasyonunu sağlamak amacıyla kuyucuklara 200'er µl metanol eklendi ve 1 dakika bekletildi. Sonrasında metanol döküldü ve kuyucuklara 200'er µl kristal viyolet (ChemBio, Türkiye) eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra mikroplak içeriği döküldü ve PBS ile yıkanarak 30 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldı. Mikroplak kuruduktan sonra kuyucuklara %96'lık etanol eklendi. Mikroplak içeriğinin 492 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı. Negatif kontrolün ve her bir izolatın yer aldığı üç kuyucuğun ortalama OD (Optik dansite) değerleri hesaplandı. Değerlendirmede OD (izolat) ≤ OD (negatif kontrol): Biyofilm oluşumu negatif; OD (negatif kontrol) ≤ OD (izolat) ≤ 2OD (negatif kontrol): zayıf biyofilm oluşumu; 2OD (negatif kontrol) ≤ OD (izolat) ≤ 4OD (negatif kontrol): orta düzey biyofilm oluşumu; 4OD (negatif kontrol) ≤ OD (izolat): güçlü biyofilm oluşumu olarak kabul edildi (Stepanovic ve ark., 2007; Yang ve ark., 2014; Akışoğlu ve ark., 2019).

### İzolatların bazı virulens faktörlerinin fenotipik olarak belirlenmesi

Hareket özelliğinin belirlenmesi amacıyla izolatların TSA'da saf olarak üreyen kültürlerinden tek koloni alınarak yarı katı besiyerine (%0.3 agar içeren TSB) iğne uçlu öze ile inoküle edildi. Besiyerleri 25°C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı ve inkubasyon sonrası merkezden çevreye doğru üreme alanlarının görülmesi hareket yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Torabi ve ark., 2019).

Hemolitik aktivite, %5 koyun kanı eklenmiş kanlı agar (Laborlar Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla her bir izolatın saf kültüründen

kanlı agar plakalarına ekimler yapıldı ve 25°C'de, 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası ekim hattının etrafında eritrositlerin parçalanarak bir zon oluşturup oluşturulmamasına göre değerlendirme yapıldı (Torabi ve ark., 2019).

Lipaz aktivitesi, izolatların Tween 20'yi hidroliz etme yeteneklerine göre belirlendi. Bu amaçla 500 ml distile su içerisinde, 5 gr pepton (Merck, Almanya), 2,5 gr NaCl (Merck, Almanya), 0,05 gr CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck, Almanya), 10 gr agar ve 5 ml Tween 20 (Merck, Almanya) içeren besiyeri hazırlandı. Daha sonra izolatların TSA'da saf olarak üreyen kolonilerinden tek koloni alınarak, besiyerine spot tarzında ekimleri yapıldı. Besiyerleri 25°C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonrası ekim hattının etrafında buzlu cam görünümünde zon oluşturması pozitif olarak kabul edildi (Kumar ve ark., 2012).

izolatların proteaz aktivitesinin belirlenmesinde %1,5 süt tozu (Neogen, USA) eklenmiş nutrient agar (HiMedia, Hindistan) (skim milk agar, SMA) kullanıldı. SMA'ya her bir izolatın saf kültüründen nokta tarzında ekimleri yapıldı ve 25°C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonrası bakteri kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf alanlar izolatların proteaz aktivitesine sahip olduklarının göstergesi olarak değerlendirildi (Igbinosa ve ark., 2017).

### İstatistiksel analiz

Çalışmada izolatların hareket, hemoliz, lipaz, serin proteaz, ve biyofilm oluşturma yetenekleri arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile Spearman korelasyon testi kullanıldı. Testte korelasyon katsayıları -1,0 ila -0,5 veya 0,5 ile 1,0 = güçlü, -0,5 ila -0,3 veya 0,3 ila 0,5 = orta dereceli, -0,3 ila -0,1 veya 0,1 ila 0,3 = zayıf olarak sınıflandırıldı (Chenia ve Duma, 2017). İstatistiksel analizler için SPSS 21v. paket programı kullanıldı ve p<0,05 ve p<0,01 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

Çalışmada kullanılan 20 *Y. ruckeri* izolatının 13'ünün hareketli olduğu, 20'sinin non-hemolitik olduğu, 13 izolatın lipaz aktivitesine ve 14 izolatın proteaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi (Tablo 2). Bununla birlikte 6 izolatın hareket, lipaz ve proteaz aktivite testlerinin her üçünden de pozitif sonuç verdiği belirlendi. Ayrıca hareketsiz izolatların tamamının lipaz aktivitesi yönünden negatif sonuç verdiği gözlemlendi ve bu izolatlar biyotip 2 içerisinde sınıflandırıldı. Çalışma sonuçlarına göre sadece hareket ve lipaz aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönlü, güçlü bir korelasyon saptandı ( $r_{spearman} = 1,000$ , p<0,01) (Tablo 3).

**Tablo 2.** *Y. ruckeri* izolatlarının hareket, lipaz, hemoliz ve proteaz aktiviteleri

İzolatlar	Hareket Özelliği	Hemolitik Aktivite	Lipaz Aktivitesi	Proteaz Aktivitesi	Biyotip
17 SA	7,0 cm	non-hemolitik	+	+	1
Çandır	7,5 cm	non-hemolitik	+	-	1
Baysallar	8,5 cm	non-hemolitik	+	+	1
15 SA	8,5 cm	non-hemolitik	+	+	1
35 SA	7,0 cm	non-hemolitik	+	-	1
7 SA	8,5 cm	non-hemolitik	+	-	1
18/2 SA	Hareketsiz	non-hemolitik	-	-	2
A	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
B	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
C	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
D	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
36 SA	8,5 cm	non-hemolitik	+	+	1
5 SA	8,5 cm	non-hemolitik	+	-	1
29 SA	1,0 cm	non-hemolitik	+	-	1
27 SA	8,5 cm	non-hemolitik	+	-	1
8	6,3 cm	non-hemolitik	+	+	1
80	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
81	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
82	Hareketsiz	non-hemolitik	-	+	2
6 SA	6,0 cm	non-hemolitik	+	+	1

**Tablo 3.** Çalışmadaki izolatların, hareket, lipaz aktivitesi, proteaz aktivitesi ve mikroplak metodunun Spearman Korelasyonları analiz sonuçları

Değişkenler	n	Ort.	SS	Hareket	Lipaz Aktivitesi	Proteaz Aktivitesi	Mikroplak Metodu
Hareket	20	1,600	0,5026	-	1,000**	-0,385	-0,153
Lipaz Aktivitesi	20	1,600	0,5026		-	-0,385	-0,153
Proteaz Aktivitesi	20	1,650	0,4894			-	0,419
Mikroplak Metodu	20	1,800	0,4104				-

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ 

Çalışmada izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde 3 farklı fenotipik yöntem kullanılmış olup bu yöntemlerden Christensen ve CRA yöntemi ile izolatların tamamının biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmadıkları belirlendi.

Bu iki yöntemin aksine mikroplak yöntemi ile izolatların büyük bir kısmının (%80) zayıf düzeyde olsa biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları belirlendi (Tablo 4).

**Tablo 4.** Mikroplak yöntemi ile 492 nm'de izolatlara ve negatif kontrole ait elde edilen optik dansite (OD) değerleri.

İzolatlar	1. Değer (OD)	2. Değer (OD)	3. Değer (OD)	Ortalama Değer	Sonuç
Negatif Kontrol	0,8276	0,5715	0,5142	0,6377	-
17 SA	0,8465	0,9893	0,698	0,8446	Zayıf
Çandır	0,6148	0,5434	0,6596	0,6059	Negatif
Baysallar	0,6991	0,6857	0,8367	0,7405	Zayıf
15 SA	0,6681	0,5034	0,7971	0,6562	Zayıf
35 SA	1,2926	1,2298	0,7709	1,0977	Zayıf
7 SA	0,6171	0,6155	0,5467	0,5931	Negatif
18/2 SA	0,4968	0,5552	0,5713	0,5411	Negatif
A	0,8726	0,6582	1,0783	0,8697	Zayıf
B	0,7414	0,6304	0,7621	0,7113	Zayıf
C	0,6288	0,761	0,7785	0,7227	Zayıf
D	1,1751	0,8709	1,1313	1,0591	Zayıf
36 SA	0,475	0,5707	0,5361	0,5272	Negatif
5 SA	0,7154	0,5989	0,8691	0,7278	Zayıf
29 SA	1,095	0,7503	1,2575	1,0342	Zayıf
27 SA	1,1935	0,9767	1,0404	1,0702	Zayıf
8	1,1546	1,1379	1,3985	1,2303	Zayıf
80	0,8146	0,6582	0,6425	0,7051	Zayıf
81	1,0115	1,0623	1,4574	1,177	Zayıf
82	1,0921	0,8902	0,9732	0,9851	Zayıf
6 SA	0,9647	0,6946	0,8207	0,8266	Zayıf

## Tartışma

Enfeksiyöz hastalıklar kültür balığı yetiştiriciliği için büyük bir tehdit oluşturmakta ve yıllık milyonlarca dolar kayba neden olmaktadır (Soto ve ark., 2021). *Yersiniozis* salmonid cinsi balıkların özellikle, gökkuşağı alabalıklarının en önemli hastalıklarından biridir (Pajdak-Czaus ve ark., 2019). Ülkemizde ilk hastalık bildirimini 1990 yılında gökkuşağı alabalıklarından

yapılmış olup, ilerleyen yıllarda etken, Türkiye'de en geniş dağılıma sahip balık patojenlerinden biri haline gelmiştir ve birçok bölgeden izole edilmiştir (Çağırğan ve Yürekli Türk, 1991; Onuk ve ark., 2011; Altun ve ark., 2013; Öztürk ve Altınok, 2014; Duman ve ark., 2017). Günümüze kadar *Y. ruckeri* izolatları biyokimyasal ve serolojik özelliklerine dayanılarak farklı biyotip ve serotiplere ayrılmıştır. Biyotiplen-



dirmede izolatlar hareket ve lipaz aktivitelerine dayanılarak iki biyotip'e ayrılmıştır (Horne ve Barnes, 1999; Tobback ve ark., 2007). Ülkemizde biyotip 2'nin varlığına dair ilk bildirim 2016 yılında yapılmıştır. Söz konusu çalışmada 1994-2010 yılları arasında farklı coğrafik bölgelerden izole edilmiş 24 izolatın 13'ünün biyotip 2 olduğu bildirilmiştir (Altınok ve ark., 2016). Bu çalışmada ise 20 izolattan 8'inin biyotip 2 olduğu belirlenmiş olup, biyotip 2'ye dahil olan izolatların Ege ve Karadeniz bölgelerinden izole edilmiş olması dikkat çekmiştir.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde birçok metot kullanılmaktadır. Mikrotitre plak yöntemi, biyofilm üretiminin saptanmasında en yaygın kullanılan ve standart test olarak tarif edilen bir yöntemdir (Marma ve ark., 2022). Bu yöntem dışında CRA ve modifiye tüp ade-rans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi) biyofilm oluşumunu saptanmasında en yaygın kullanılan diğer yöntemlerdendir (Temel ve Eraç, 2018). Bu üç yöntem, çeşitli bakteriyel türlerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bir çalışmada 74 *Staphylococcus aureus* izolatının mikrotitre plak yöntemi ile 58'inin, Christensen yöntemi ile 49'unun ve CRA yöntemi ile 42'sinin biyofilm oluşturduğu saptanmış ve mikrotitre plak yönteminin daha kantitatif ve güvenilir bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur (Mohamed ve ark., 2016). Benzer şekilde farklı bakteriyel türlere ait 110 klinik bakteri izolatının kullanıldığı bir çalışmada, mikrotitre plak yöntemi Christensen ve CRA yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha güvenilir bulunmuş ve biyofilm oluşturan mikroorganizmaların tespit edilmesinde genel bir tarama yöntemi olarak önerilmiştir (Hassan ve ark., 2011). Filik ve Kubilay (2019a) bazı balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun farklı *in vitro* (CRA, Christensen ve mikroplak yöntemleri) metotlar kullanarak tespit ettikleri çalışmalarında *Y. ruckeri*'nin biyofilm oluşumunu sadece mikroplak metodu ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde CRA, Christensen ve mikroplak yöntemlerinden sadece mikroplak metodu ile *Y. ruckeri* izolatlarında biyofilm oluşumu yönünden pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar *Y. ruckeri* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde mikroplak yönteminin CRA ve Christensen yöntemleri oranla daha duyarlı bir yöntem olduğunu ve *Y. ruckeri* izolatlarında biyofilm oluşumunun belirlenmesinde mikroplak yönteminin kullanılması gerektiğini göstermektedir.

Biyofilm oluşumu dinamik bir süreçtir ve hareket, hücre yüzey özelliği ve/veya hücre metabolizması gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Satpathy ve ark., 2016; Chenia ve Duma, 2017). Bu nedenle biyofilm oluşumuna potansiyel katkıda bulunan faktörlerin ve bunların biyofilm oluşumu ile ilişkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu faktörlerin başında mikroorganizmaların sahip oldukları virulens faktörleri gelmektedir. Virulens faktörlerinin tanımlanması, bakteriyel patogenezin ve etkenin konakçı içindeki etkileşimlerinin anlaşılmasında önem taşır (Banu ve ark., 2011). Günümüze kadar farklı bakteriyel türlerde biyofilm üretimi ile virulens faktörleri arasındaki olası ilişkilerin ortaya konulduğu birçok çalışma bulunmaktadır (Chenia ve Duma, 2017; Saffari ve ark., 2017; Gajdác ve ark., 2021). Ancak *Y. ruckeri* izolatlarının sahip oldukları virulens faktörlerinin biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin değerlendirildiği sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır. Söz konusu çalışmada, Type V sekresyon sınıfında bulunan ve *Y. ruckeri* invazin (*yrInv*) ve *Y. ruckeri* invazin benzeri molekül (*yrIIm*) olarak adlandırılan iki inverse autotransporter adezininin *Y. ruckeri*'nin farklı abiyotik substratlar üzerinde biyofilm oluşumunu desteklediği ortaya konulmuştur (Wrobel ve ark., 2020). Bu çalışmada ise *Y. ruckeri* izolatlarının biyofilm üretme yeteneği ile hareket özelliği, hemoliz, proteaz ve lipaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yetenekleri önemli bir virulens faktörü olarak kabul edilmekte olup (Costerton ve ark., 1999), sadece mikroorganizmaların patojenitesinde önemli bir basamak oluşturmaz (Bell, 2001), aynı zamanda antimikrobiyal tedavinin etkinliğini engeller, mikroorganizmayı konakçı savunma mekanizmalarına karşı korur ve virulens belirleyicilerinin ekspresyonuna yol açan bakteriyel iletişimi kolaylaştırır (Lavender ve ark., 2004). Dolayısıyla mikroorganizmaların biyofilm ve diğer virulens faktörlerinin belirlenmesi, yeni hastalık kontrol planlarının oluşturulmasına önemli katkılar sağlayacaktır. Özellikle akuatik çevrenin mikroorganizmaların uzun süre hayatta kalmalarına ve tekrarlayan enfeksiyonların oluşmasına uygun bir habitat sunması *Y. ruckeri* gibi balık sağlığını tehdit eden önemli patojenlerin kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır. Bu bağlamda mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinin engellenmesi üzerine yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Kaynaklar

- Akışoğlu Ö, Engin D, Sarıçam S, Müştak HK, Şener B, ve Hasçelik G. (2019). Kistik fibrozisli ve kistik fibrozis olmayan hasta grubunda Burkholderia türlerinin multilokus sekans analizi, biyofilm oluşturma, antibiyotik duyarlılık ve sinerji testleri. Mikrobiyol Bul. 53(1), 22-36.
- Altun S, Onuk EE, Çiftçi A, Duman M, & Büyükekiz AG. (2013). Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 19 (2): 225-232. (2013)
- Altınok İ, Capkin E, & Boran H. (2016). Comparison of molecular and biochemical heterogeneity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from Turkey and the USA. Aquaculture. 450, 80-88.
- Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, & Klesius PH. (2007). First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. J Aquat Anim Health. 19(1), 35-40.
- Atshan SS, Shamsudin MN, Thian Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, & Pei Pei C. (2012). Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol. 2012.
- Banu A, Kabbin J, Anand M. (2011). Extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an emerging issue. J Clin Diag Res. 5:486-90.
- Bell, M. (2001). Biofilms: a clinical perspective. Curr Infect Dis Rep. 3: 483-486.
- Busch RA, & Lingg AJ. (1975). Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J Fish Res Board Can. 32(12), 2429-2432.
- Cai W, & Arias CR. (2017). Biofilm formation on aquaculture substrates by selected bacterial fish pathogens. J Aquat Anim. 29(2), 95-104.
- Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet DG, & Daniel P. (2014). *Yersinia ruckeri* biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. Dis Aquat Org. 109(2), 117-126.
- Chenia HY, & Duma S. (2017). Characterization of virulence, cell surface characteristics and biofilm-forming ability of *Aeromonas* spp. isolates from fish and sea water. J Fish Dis. 40(3), 339-350.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM., Barrett FF, Melton DM, & Beachey EH. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 22(6), 996-1006.
- Çiftçi A, Findik A, Onuk EE, & Savasan S. (2009). Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. Braz J Microbiol. 40, 254-261.
- Costerton J, Stewart P & Greenberg E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 284(5418), 1318-1322.
- Coquet L, Cosette P, Junter GA, Beucher E, Saiter JM, Jouenne T. (2002a). Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. Colloids Surf B:Biointerfaces. 26(4), 373-378.
- Coquet L, Cosette P, Quillet L, Petit F, Junter G, Jouenne T. (2002b). Occurrence and phenotypic characterization of *Yersinia ruckeri* strains with biofilm-forming capacity in a rainbow trout farm. Appl Environ Microbiol. 68(2), 470-475.
- Çağırğan H, Yürekli Türk O. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in Turkey. Fifth International Conference, Disease of Fish and Shellfish Book of Abstracts 1991;131.
- Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, & Sahinturk P. (2017). Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. Dis Aquat Org. 125(1), 31-44.
- Filik F & Kubilay A. (2019a). Bazı bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun in vitro metodlarla tespiti. Acta Aquat Turc. 15(3), 378-390.
- Filik N & Kubilay A. (2019b). *Yersinia ruckeri* suşlarında çevreyi algılama sistemi ve yönetimindeki virülens faktörlerinin araştırılması. Acta Aquat Turc. 15(3), 391-403.
- Fouz B, Zarza C, & Amaro C. (2006). First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. J Fish Dis. 29(6), 339-346.
- Gajdác M, Baráth Z, Kárpáti K, Szabó D, Usai D, Zanetti S, & Donadu MG. (2021). No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. Antibiotics. 10(9), 1134.
- Guijarro J A, García-Torrico AI, Cascales D, & Méndez J. (2018). The infection process of *Yersinia ruckeri*: reviewing the pieces of the Jigsaw puzzle. Front Cell Infect Microbiol. 8, 218.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, & Iqbal M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis. 15, 305-311.
- Horne MT, Barnes AC. (1999). Enteric Red Mouth Diseases (*Yersinia ruckeri*) In: Fish Diseases and Disorders Volume 3. Viral, Bacterial and Fungal Infections. Ed.: P.T.K. Woo, D.W. Bruno, CAB International, New York, USA. p.455-479.
- Igbinosa IH, Beshiru A, Odjajare EE, Ateba CN, & Igbinosa EO. (2017). Pathogenic potentials of *Aeromonas* species isolated from aquaculture and abattoir environments. Microb Pathog. 107, 185-192.
- Kumar D, Kumar L, Nagar S, Raina C, Parshad R, & Gupta VK. (2012). Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. Arch Appl Sci Res. 4(4), 1763-1770.
- Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, & El-Matbouli M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Vet Res. 46(1), 1-10.
- Lavender HF, Jagnow JR, Clegg S. (2004). Biofilm formation in vitro and virulence in vivo of mutants of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 72: 4888-4890.
- Marma CC, Ahmed S, Akhter F, Keya SA, Ullah P, & Barua S. (2022). Detection of Biofilm Producing Uropathogenic Bacteria and Their Antibiotic Sensitivity Pattern. Sch J App Med Sci. 8, 1244-1251.
- Mohamed A, Rajaa AM, Khalid Z, Fouad M, & Naima R. (2016). Comparison of three methods for the detection of biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus* isolated in Casablanca. Int J Sci Res. 5(10), 1156-9.
- Moreau E, Thomas T, Brevet M, Thorin C, Fournel C, & Calvez S. (2019). Mutations involved in the emergence of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in France. Transbound Emerg Dis. 66(3), 1387-1394.
- Onuk EE, Çiftçi A, Findik A, Çiftçi G, Altun S, Balta F, Özer S & Çoban AY. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124 (7-8): 320-328.
- Öztürk RÇ, & Altınok İ. (2014). Bacterial and viral fish diseases in Turkey. Turkish J Fish Aquat Sci. 14(1).

- Pajdak-Czaus J, Platt-Samoraj A, Szweda W, Siwicki AK, & Terech-Majewska E. (2019). *Yersinia ruckeri*-A threat not only to rainbow trout. *Aquac Res.* 50(11), 3083-3096.
- Rather MA, Gupta K, Bardhan P, Borah M, Sarkar A, Eldiehy KS, ... & Mandal M. (2021). Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. *J Basic Microbiol.* 61(5), 380-395.
- Ríos-Castillo AG, Thompson KD, Adams A, Marín de Mateo M, & Rodríguez-Jerez, JJ. (2018). Biofilm formation of *Flavobacterium psychrophilum* on various substrates. *Aquac Res.* 49(12), 3830-3837.
- Romalde JL, & Toranzo AE. (1993). Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiol Lett.* 112(3), 291-299.
- Romalde JL, Magarinos B, Barja JL, & Toranzo AE. (1993). Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* proposal for a new intraspecies classification. *Syst Appl Microbiol.* 16(3), 411-419.
- Saffari F, Dalfardi MS., Mansouri S, & Ahmadrajabi R. (2017). Survey for correlation between biofilm formation and virulence determinants in a collection of pathogenic and fecal *Enterococcus faecalis* isolates. *Infect Chemother.* 49(3), 176-183.
- Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, & Raut S. (2016). Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol.* 7, 56-66.
- Soto E, Coleman D, Yazdi Z, Purcell SL, Camus A, & Fast MD. (2021). Analysis of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) immune response during immunostimulation and *Veronaea botryosa* infection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics.* 40, 100879.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura GD, Djukić S, Ćirković I, & Ruzicka F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 115(8), 891-899.
- Temel A, & Eraç B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* 48(1), 1-13.
- Tinsley JW, Lyndon AR, & Austin B. (2011). Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Appl Microbiol.* 111(1), 8-16.
- Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, & Chiers K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis.* 30(5), 257-268.
- Torabi Delshad S, Soltanian S, Sharifiyazdi H, & Bossier P. (2019). Effect of catecholamine stress hormones (dopamine and norepinephrine) on growth, swimming motility, biofilm formation and virulence factors of *Yersinia ruckeri* in vitro and an in vivo evaluation in rainbow trout. *J Fish Dis.* 42(4), 477-487.
- Wrobel A, Leo JC, & Linke D. (2019). Overcoming fish defences: the virulence factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes.* 10(9), 700.
- Wrobel A, Saragliadis A, Pérez-Ortega J, Sittman C, Göttig S, Lisiewicz K, ... & Linke D. (2020). The inverse autotransporters of *Yersinia ruckeri*, YrInV and YrIIm, contribute to biofilm formation and virulence. *Environ Microbiol.* 22(7), 2939-2955.
- Yang Q, Anh ND, Bossier P, & Defoirdt T. (2014). Norepinephrine and dopamine increase motility, biofilm formation, and virulence of *Vibrio harveyi*. *Front Microbiol.* 5, 584.