

Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumunun Farklı *In Vitro* Metodlarla TespitiFethi FİLİK^{*}, Ayşegül KUBİLAY

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, Türkiye.

*Sorumlu Yazar: fethi.filik@hotmail.com

Araştırma Makalesi

Geliş 09 Mart 2019; Kabul 25 Haziran 2019; Basım 15 Eylül 2019.

Alıntılama: Filik, F., & Kubilay, A. (2019). Bazı bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm oluşumunun farklı *In Vitro* metodlarla tespiti. *Acta Aequatica Turcica*, 15(3), 378-390. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.537796>**Özet**

Bu çalışmada, fenomen bir virülens faktörü olan biyofilmin, bakteriyel balık patojeni olan *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum* bakterileri tarafından üretilmesi tüp, mikropalak ve kongo red agar yöntemleriyle araştırılmıştır. Tüp yöntemi ile biyofilm oluşum dereceleri tüpün iç yüzeyinde oluşan film tabakasının kalınlığına göre sırayla *F. psychrophilum*'da (++) , *A. sobria*'da (++) , *S. warneri*'de (+) , *Y. ruckeri*'de (-) , *V. anguillarum*'da (-) olarak tespit edilmiştir. Mikropalaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*'de 0,121, *A. sobria*'da 0,158, *Y. ruckeri*'de 0,071, *F. psychrophilum*'da 0,172, *V. anguillarum*'da 0,212 absorbans değeri tespit edilmiştir. Mikropalak testinde biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agar testinde biyofilm (slime) oluşturan bakterilerin koloni morfolojisinin renk değişmesine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*'de bulunmuştur. Pembe renkli koloni üreten *F. psychrophilum* ve *Y. ruckeri* bakterileri ise bu teste biyofilm oluşumu göstermemiştir. Sonuç olarak; biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar balıklar üzerinde ölümcül etki göstermektedir. Bu etkilerin araştırılması ve durdurulması balık ölümlerinin azaltılmasında önemlidir. Bakteriyel balık patojenlerinden olan *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri*'nin araştırmamızda oldukça güçlü biyofilm oluşturdıkları farklı yöntemlerle tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyel balık patojenleri, biyofilm, tüp yöntemi, mikropalak yöntemi, kongo red agar yöntemi**Determination of Biofilm Formation with Different *In Vitro* Methods in Some Bacterial Fish Pathogens****Abstract**

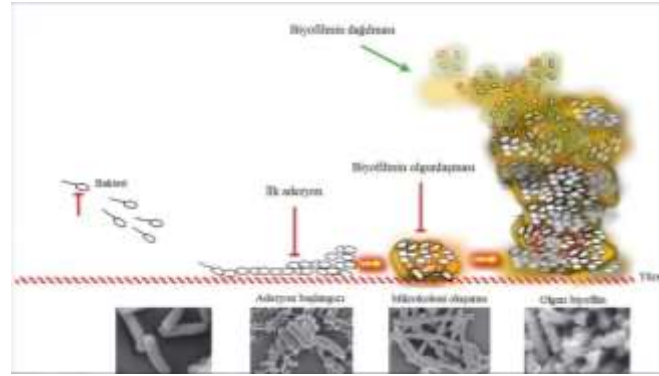
bacterial fish pathogens *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Vibrio anguillarum* by tube, microplate and congo red agar methods. The degree of biofilm formation by the tube method in order according to the thickness of the film formed on the inner surface of the tube is in *F. psychrophilum* (++) , in *A. sobria* (++) , in *S. warneri* (+) , in *Y. ruckeri* (-) was determined as (-) in *V. anguillarum*. In the biofilm biofilm test with microplates, the biofilm was found to be 0.048 in the negative control, 0.121 in *S. warneri*, 0.158 in *A. sobria*, 0.071 in *Y. ruckeri*, 0.172 in *F. psychrophilum* and 0.212 absorbance in *V. anguillarum*. Biofilm formation in microplate test was determined as *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*. In congo red agar test, biofilm formation was determined as *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* according to color change of colony morphology of bacteria forming slime. The most powerful biofilm formation by producing dry crystallized black colony in congo red agar was found in *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*. The pink colony producing *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* bacteria did not show biofilm formation in this test. As a result; Biofilm induced infections show a lethal effect on fish. Investigation and cessation of these effects is important in reducing fish mortality. It was determined that bacterial fish pathogens *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* create a very strong biofilm by using different methods.

Keywords: Bacterial fish pathogens, biofilm, tube method, microplate method, congo red agar method.

GİRİŞ

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan, iletişim ve bilgi aktarımına izin veren, farklı gen transkripsiyonu ve büyüme oranlarına bağlı olarak farklı fenotipik özellik gösterebilen (Donlan ve Costerton, 2002), birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir mimari organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Post vd., 2004). Biyofilm, kalınlığı 0,2 mikron üstünde ise bakteri içerebileceği belirtilmiştir (Larson, 2011). Dünyadaki mikrobiyal kütleinin %80 kadarının biyofilm durumunda bulunduğu iddia edilmektedir (Davies, 2003; Richards ve Melveer, 2009). Mikrobiyal biyofilmlerin balık sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ulusal sağlık enstitüleri enfeksiyonların %80'inden fazlasına biyofilmlerin neden olduğunu tahmin etmektedir (Donlan ve Costerton, 2002). Bu iddialar göz önüne alındığında savaşmamız gereken biyofilmlerin ne derece önem arz ettiği daha iyi anlaşılmaktadır. Söz konusu biyofilmin kimyasal kompozisyonu Tablo 1'de verilmiştir.

Biyofilm kitlesi yerleştiği bölgeye göre değişir ve genellikle bakteri, mantar, alg ve protozoa ve fajları içeren birçok mikroorganizma türünden oluşur (Wu vd., 2015). İlk yapışma (adezyon) olduğunda biyofilmin uzaklaştırılması artık zordur (Bryers, 2008).



Şekil 1. Biyofilm oluşumunun aşamaları (Monroe, 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012)

Biyofilm gelişmesinin beş aşaması (Şekil 1); 1: Planktonik bakterilerin biyomateryal yüzeyine yapışmaları, 2: Hücrelerin mikro koloniler oluşturması, ekstraselüler polimerik substantlar (EPS) yani slimenin dışarı atılması ve bağlanmanın geri döndürülemez hale gelmesi, 3: Biyofilm oluşması, olgunlaşması, 4: Üç boyutlu büyüme ve konakçı savunma mekanizmalarına ve antibiyotiklere karşı koruma sağlayarak biyofilmin daha da olgunlaşması, 5: Biyofilmin, kritik bir kütleyle ulaşması, diğer yüzeylere kolonize olmaya hazır olması ve planktonik bakterilerin dağılması şeklinde gelişmektedir (Monroe, 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012).

Tablo 1. Biyofilmin kimyasal kompozisyonu (Jamal vd., 2015)

Bileşen (Component)	Matriksteki yüzdesi
Mikrobiyal hücre	%2-5
DNA ve RNA	< %1-2
Polisakkaritler	%1-2
Proteinler	< %1-2
Su	%97



Şekil 2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie) (Çiftçi, 2005)

Biyofilmlerle ilgili balık enfeksiyonları araştırıldığında *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Bacillus* ve *Aeromonas* gibi bakteri türler biyofilm oluşturmakta ve hastalıklara neden olmaktadır (Mortensen, 2014). Biyofilmler bakterilerin birbirleri arasında horizontal gen transferi yapması için elverişli ortamlardır. Horizontal gen transferi bakterilere, balık enfeksiyonlarıyla mücadele de antimikrobiyal direnci gibi adaptif mutasyonlar geliştirmeleri avantajını sağlamaktadır. Enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan bakterilerin immün sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha hazırdır (Jurcisek ve Bakaletz, 2007).

Bakteriyel patogenezele ilgili yapılan araştırmaların çoğu akut enfeksiyonlara odaklanmış ancak bu hastalıklar, şimdi biyofilm (Şekil 2) içinde yetişen bakterilerin neden olduğu yeni bir kategori olan kronik enfeksiyonlarla desteklenmektedir. Kronik yaralar, fibrinöz peritonitis enfeksiyonları gibi biyofilm enfeksiyonları, dünyadaki milyonlarca balığı her yıl etkilemekte ve birçok ölüm meydana getirmektedir. Özellikle kronik biyofilmin temeli enfeksiyonların önemli noktası antibiyotiklere karşı aşırı direnç ve konakçı savunmalarından kaçmaktır (Bjarnsholt, 2013). Söz konusu tehlikeli biyofilm su ürünleri yetiştiriciliğinde de balık pulları gibi balığın vücudunda ve yetiştiricilik tesislerinde kullanılan birçok materyalin yüzeyinde görülmektedir. Etkili bir virülens faktörü olan biyofilmin yetiştiricilik tesislerinden uzak tutulması bu nedenle oldukça önemlidir.

S. warneri'de, *A. sobria*'da, *Y. ruckeri*'de, *F. psychrophilum*'da ve *V. anguillarum*'da biyofilm üretimi açısından araştırıldığında Stafilokokların biyofilm oluşturmalarında *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan polisakkarit intersellüler adhesin (PIA) en önemli rolü üstlendiği gösterilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Arciola vd., 2015). *S. warneri*'de hasta balıklar arasında kronik enfeksiyonların patognomik olduğu biyofilmi oluşturur (Molobela vd., 2010). *Aeromonas*'larda biyofilm oluşumunda polar flagella ile yüzme hareketinde ve başlangıç tutunmasında, lateral flagella ile ise hücrelerin kolonizasyonunda rol oynamaktadır (Kirov vd., 2003). Rahman vd., 2007'de *Aeromonas* klonlarının güçlü biyofilm oluşturduğunu göstermiştir. C-di-GMP (cyclic di-GMP) birçok bakteride biyofilm oluşumunu düzenlediğini bildirmiştir. *Yersinia* bakteri türleri Quorum Sensing: QS (Çevreyi Algılama) adı verilen bakteriyel iletişim mekanizmasının düzenlediği 3-oxo-C8-HSL molekülüyle biyofilm üretmektedir (Delshad vd., 2018). *Y. ruckeri*'de flagellar proteinin salgılanmasıyla yapışkanlığı artmakta ve biyofilm oluşturabilmektedir (Coquet vd., 2002). *F. psychrophilum* mutantları yüksek biyofilm geliştirir. Donlan, 2002; Högfors-Rönnholm vd., 2015; Levipan ve Avendaño-Herrera, 2017 yaptıkları çalışmalarda *F. psychrophilum*'un virülens ve biyofilm oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğunu ifade etmişlerdir (Levipan ve Avendaño-Herrera, 2017). *V. anguillarum*'da, transkripsiyonel düzenleyici, VanT'nin, biyofilm oluşumunu düzenlediği gösterilmiştir. *V. anguillarum*-VanT mutanı ve Sat-Vps73 DNA loküsünde polar mutasyon taşıyan bir mutantın, hatalı biyofilmler ürettiğini göstermiştir (Croxatto vd., 2002). *Vibrio*'ların biyofilm oluşturmasının özel genetik yapılarına (flagella, pili ve ekzopolisakkarit biyosentezi) ve düzenleyici işlemlere (iki düzenleyici bileşen, çevreyi algılama ve c-di-GMP molekülleri) bağlı olduğu bilinmektedir (Yıldız ve Visick, 2009).

Bu çalışmanın amacı; hasta balıklardan izole edilen *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* balık patojenlerinin biyofilm virülens gücü birbirinden farklı metotlar olan tüp, mikropalak, kongo red agar yöntemleriyle araştırılmasıdır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bakteriyel Suşlar (*S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* Suşlarının Üretim ve Depolanması)

Araştırmada ISUBÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarından temin edilen *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşları kullanılmıştır. *F. psychrophilum* 15°C’de, diğer patojenler 25°C’de üretilmiştir. Suşlar kullanılmaya kadar -80°C’de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için -80°C’den alınarak -20°C’de bekletildikten sonra *F. psychrophilum* Ordal Agar, diğer patojenler TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* 25°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekimleri yapılan *F. psychrophilum* suşu ise 15°C’de 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maximum 7 gün süreyle +4°C’de saklanmıştır.

Patojenlerin Biyofilm Testleri

Tüp yöntemi, mikropalak yöntemi ve kongo red agar yöntemi olmak üzere 3 farklı metotta araştırılmıştır.

Tüp Yöntemi

Christensen vd. (1985) tarafından bildirilen yöntemle göre, test edilecek *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşlarının, agar’da üreyen saf kültüründen tek bir koloni alınarak, içinde 5 ml % 0,25 glukoz içeren TSB besiyerine inokule edilerek 25°C’de, *F. psychrophilum* suşları ise 15°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılmış, %1’lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Boya dökülecek, tüpler steril PBS ile iki defa yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++) , (+++) ve (-) olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 3 paralel olarak çalışılmıştır (Demir ve İnanç, 2015).

Mikropalak Yöntemi

O’Toole ve Kolter (1998)’in tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Ye vd., 2008). Kısaca *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşları Triptik Soy Broth (TSB)’da 25°C’de 16 saat, *F. psychrophilum* 15°C, 72 saat üretilmiştir. Kültürlerin tümünden McFarland 0,5’e göre standardize edilen bakteri süspansiyonları düz tabanlı 96 çukurlu mikropalalara 100 µl olarak çukurlara ilave edilerek 25°C’de, *F. psychrophilum* ise 15°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkanmış ve biyofilme ilişkili hücre kalıntıları %1’lik kristal viole ile 15 dk süresince boyanmıştır. Boya fazlası hafif akan çeşme suyunda dikkatli bir şekilde yıkanmış ve bakterilerin oluşturduğu 96 çukurlu plakalara tutunmuş biyofilm fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için mikropalalara 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 ml ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Plakların 630 nm’de ELISA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülmüştür (Ye vd., 2008). Her bakteri için 24 sonucun OD değerleri ortalamaları alınmıştır. Test sırasında steril TSB negatif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.

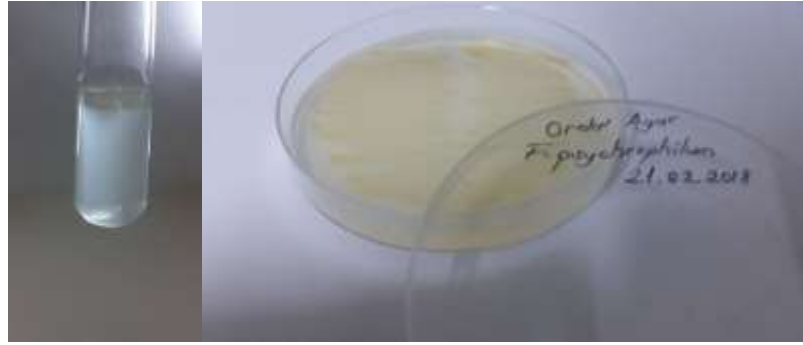
Kongo Red Agar Yöntemi

Freeman vd. (1989) tarafından bildirilen metoda göre hazırlanmıştır. Kongo kırmızılı besiyeri litrede 50 gr sakkaroz, 37 gr BHI (Brain Heart Infusion) Agar ve 0,8 gr Kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlanmıştır. Suşlar kongo kırmızılı agara ekim yapıldıktan sonra *F. psychrophilum* 15°C, diğer suşlar 25°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 2 paralel olarak çalışılmıştır (Demir ve İnanç, 2015).

BULGULAR

Balık Patojenleri *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum*'un Koloni Morfolojileri

Araştırmada 5 farklı balık patojeni kullanılmıştır. *F. psychrophilum* üretilmesi ve gençleştirilmesinde Ordal Agar (OA) kullanılmıştır. Bakteriler 15°C de 72 saat inkübe edilmiştir ve OA'da sarı turuncu renkte üremişlerdir (Madetoja, 2002; Wiklund, 1994) (Şekil 3). *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* patojenlerinin üretilmesi ve gençleştirilmesinde Triptik Soy Agar (TSA) kullanılmıştır. Bakteriler 25°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve TSA üzerinde krem renkli koloniler oluşturmuşlardır. *S. warneri* (Şekil 4), *A. sobria* (Şekil 5), *Y. ruckeri* (Şekil 6), *V. anguillarum* (Şekil 7) bakterileri kullanılmıştır. (Bakterilerin koloni rengi önemlidir çünkü kongo red agar testindeki biyofilm tespitinde koloni rengi değişimi sonucu verecektir).



Şekil 3. *F. psychrophilum* OA ve OB'da koloni morfolojisi



Şekil 4. *S. warneri* koloni morfolojisi



Şekil 5. *A. sobria* koloni morfolojisi



Şekil 6. *Y. ruckeri* koloni morfolojisi



Şekil 7. *V. anguillarum* koloni morfolojisi

Biyofilm Testleri Bulguları

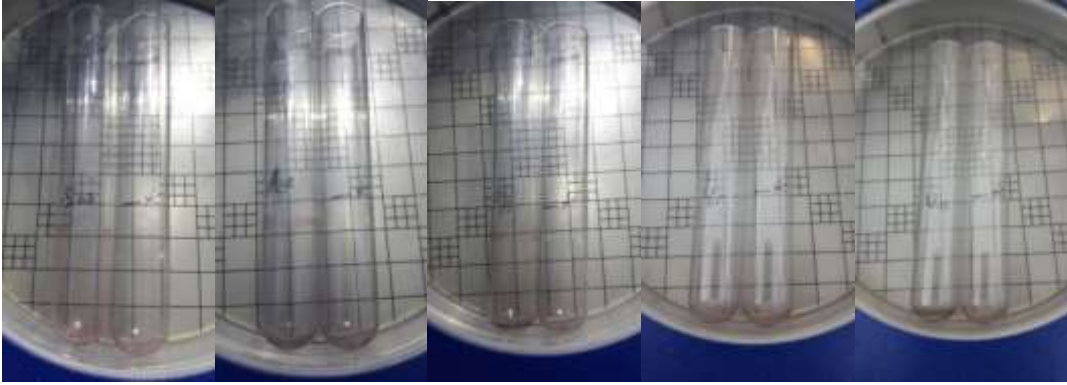
Tüp yöntemi, mikropalak yöntemi ve kongo red agar yöntemi olmak üzere 3 biyofilm tespit yöntemleriyle ilgili patojenlerin biyofilm virülens gücü araştırılmıştır.

Tüp Yöntemi Bulguları

Tüp yönteminde bakteri kültürü dökülerek safraninle boyanan tüplerde besiyerinin bittiği hizada safranin boyasıyla bakteri tutunmasından kaynaklanan biyofilm çizgisi belirlenmiştir. Tüp yönteminde tüpün iç yüzeyinde renkli bu film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++) , (+++) ve (-) olarak değerlendirme yapıldığında biyofilm *S. warneri*'de (+), *A. sobria*'da (++) , *Y. ruckeri*'de (-), *F. psychrophilum*'da (++) , *V. anguillarum*'da (-) olarak tespit edilmiştir (Şekil 8 ve Şekil 9). Tüp testinde tüpün iç yüzeyinde oluşan film tabakasının kalınlığına göre sırayla *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* olarak belirlenmiştir. En güçlü biyofilm oluşumu *F. psychrophilum* ve *A. sobria*'da görülmüştür.



Şekil 8. Tüp yöntemi ile *F. psychrophilum* (++) , *A. sobria* (++) , *S. warneri* (+) suşlarında film tabakası varlığıyla biyofilm oluşumu



Şekil 9. Tüp yönteminde *S. warneri* (+) , *A. sobria* (++) ve *F. psychrophilum* (++) , *Y. ruckeri* (-) , *V. anguillarum* (-) suşlarında biyofilm sonuçları

Mikroplak Yöntemi Bulguları

Mikroplaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm ELİSA okuyucusunda 630 nm’de ölçüldü ve absorbands değeri negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*’de 0,121, *A. sobria*’da 0,158, *Y. ruckeri*’de 0,071, *F. psychrophilum*’da 0,172, *V. anguillarum*’da 0,212 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışılan tüm bakteriyel balık patojenleri biyofilm oluşturmaktadır (Şekil 10 ve Şekil 11). Mikroplak testinde absorbands değerlerine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Mikroplak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*’da bulunmuştur.



Şekil 10. *V. anguillarum*’da biyofilm oluşumu



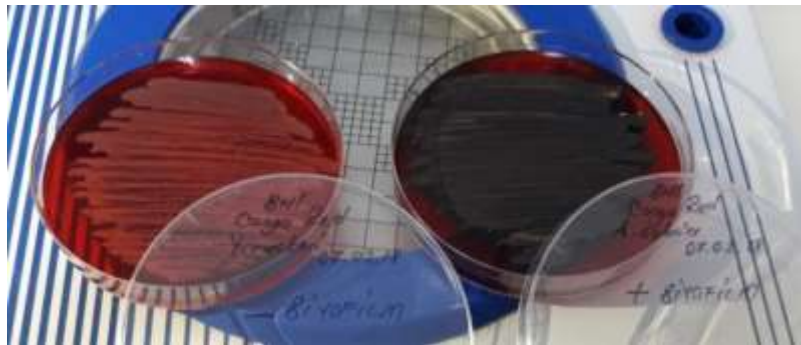
Şekil 11. *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum*'da biyofilm oluşumu

Kongo Red Agar Yöntemi Bulguları

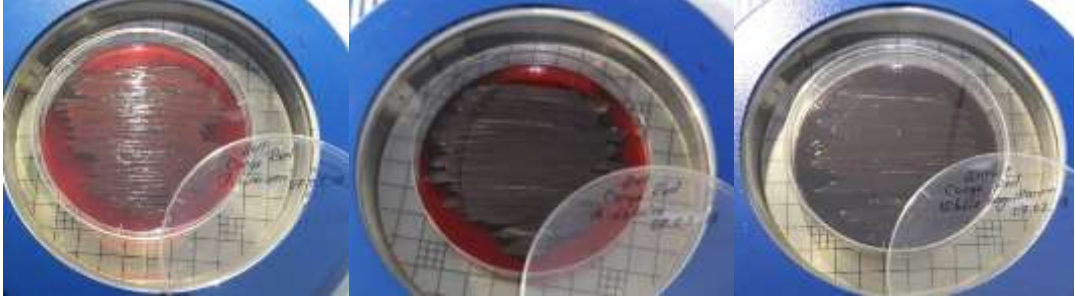
Doğası gereği krem renkte olan bakteriyel balık patojenleri bu biyofilm testiyle krem renkten farklı renge dönüşmektedir (Şekil 12). Kolonin pembe renge dönüşmesi biyofilm oluşturmadığını, siyah renge dönüşmesi biyofilm oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 13). Koloni morfolojisi incelendiğinde koloni rengiyle biyofilm oluşumunun tespit edildiği prensibe dayanan CRA testiyle *A. sobria*, *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşları kongo red agarda kuru kristalize siyah pigmentli koloni üreterek biyofilm (slime) üretimi pozitif bulunmuştur (Şekil 14). *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum* suşları pembe pigmentli koloni üreterek biyofilm üretimi negatif bulunmuştur (Şekil 15). Kongo red agar testinde biyofilm oluşturan bakterilerin koloni morfolojisinin renk değiştirmesine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agar testinde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*'de bulunmuştur.



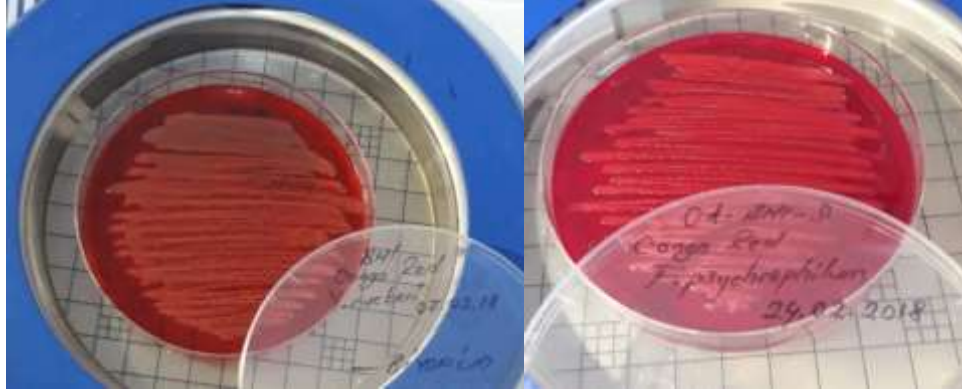
Şekil 12. Bakteri koloni renkleri: doğal krem koloni – biyofilm oluşmamasıyla pembe koloni – biyofilm oluşmasıyla siyah koloni



Şekil 13. CRA testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç



Şekil 14. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan *S. warneri*, *V. anguillarum* ve *A. sobria* suşları



Şekil 15. Pembe pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturmayan *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum* suşları

Tablo 2. Farklı metotlarda uygulanan biyofilm testine göre patojen bakterilerin biyofilm oluşturma güçleri

	<i>F. psychrophilum</i>	<i>A. sobria</i>	<i>S. warneri</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>V. anguillarum</i>
Tüp yöntemi	++	++	+	-	-
Mikroplak yöntemi	++	++	++	+	+++
Kongo red agar yöntemi	-	+++	+++	-	+++

Biyofilm oluşturan bakterilerin en iyi hangi yöntemle biyofilm oluşturdıklarının belirlenmesi amacıyla çalışılan bakterilerin tüp yöntemi, mikroplak yöntemi ve kongo red agar yöntemleriyle biyofilm oluşturmalarının karşılaştırılması Tablo 2’de verilmiştir.

TARİŞMA ve SONUÇ

Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir (Szcuka ve Kaznowski, 2014). Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı yöntem geliştirilmiştir (Deighton vd., 2001; Arciola vd., 2002; Harraghy vd., 2006). Bu yöntemlerden; tüp testi (Mathur vd., 2006), mikroplak testi (Stepanovic, 2000), radiolabeling mikroskopi (Deighton vd., 2001) ve kongo red agar testi (Arciola vd., 2002) gibi testler biyofilm tayini için kullanılmaktadır. Fakat mikroplak metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır (Stepanovic vd., 2007).

Sundell ve Wiklund (2011) *F. psychrophilum*’un biyofilm oluşturdıklarını kanıtlamışlardır. *F. psychrophilum* enfeksiyonunda patojen bakterileri barındıran dirençli biyofilmleriyle ve tekrarlayan enfeksiyonlarla daha karmaşık hale gelebildiğini bildirmişlerdir. Bu araştırma da *F. psychrophilum*’un biyofilm oluşturduğu tüp testinde ve mikroplak testinde kanıtlanmıştır.

Hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmada ve *A. veronii biovar sobria*’da, *A. hydrophila* ve *A. caviae*’ya göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu

gözlemlemişlerdir (Gavin vd., 2003). Çalışmamızda da aynı durum söz konusu olup *A. sobria*'da biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Biyofilm oluşumunun makroskobik saptanmasında kongo red agar yöntemi sıklıkla kullanılan, görsel sonuçlara dayalı bir yöntem olduğunu ifade edilmiştir (Aslan, 2015). Bu yöntemin ilk olarak Freeman vd., (1989) stafilkoklar üzerinde biyofilm üretiminin araştırılmasında kullanıldığını da ifade etmiştir. Araştırmamız da kongo red agar testinde balık patojenlerinin makroskobik incelemelerinde *A. sobria*, *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşlarının siyah pigment oluşturmalarıyla biyofilm oluşturdıkları bulunmuştur.

Ormancı (2010) yaptığı çalışmada mikroplak yöntemiyle yapılan biyofilm çalışmasında *Aeromonas*'ların tür bazında tutunmalarına baktığında, kuvvetli pozitif değerde en fazla tutunma balığın deri, solungaç ve bağırsağından izole edilen *A. veronii biovar sobria*'da olduğunu bildirmiştir. Biyofilm ölçümü için yaptığı tüp testinde *A. veronii biovar sobria* %61,43 ile yüksek kuvvetli pozitif biyofilm oluşumunda birinci sırada yer aldığını ifade etmişlerdir. Biyofilm ölçümü için diğer test olan kongo red agar testi ile de tayin etmiş ve sonuçta *A. veronii biovar sobria* izolatlarının %59,37 kuvvetli pozitif biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Araştırmamızda da aynı durum görülmüş ve çalışılan patojenler arasında en güçlü sonucu kongo red agarda siyah koloni oluşturarak *A. sobria* vermiştir. Tüp testinde ise *A. sobria*'da (++) yorumuyla güçlü biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Jahid vd. (2013) *A. hydrophila*'nın çeşitli glikoz konsantrasyonlarına yanıt olarak biyofilm oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada tüp yönteminde glikoz kullanılmıştır ve *A. sobria*'da biyofilm oluşumu (++) derecesiyle pozitif bulunmuştur.

Musharrafieh vd. (2014) çalışmalarında *V. anguillarum*'un *S. warneri* varlığında veya yokluğunda gökkuşacağı alabalığı pulları üzerinde biyofilmler oluşturmasını incelemişlerdir. Sonuçta, *S. warneri*'nin varlığında, *V. anguillarum*'un biyofilm oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte *S. warneri* patojenin *V. anguillarum*'un büyümesi ve biyofilm oluşturması için bir katalizör görevi görerek enfeksiyon başarısını artırdığını bildirmişlerdir. *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşlarının biyofilm oluşturmaları bu araştırmada da kanıtlanmıştır.

Nurcan (2010) yaptığı çalışmada, *V. anguillarum*'un mikroplak yönteminde biyofilm oluşturması bu çalışmayı desteklemektedir.

Černohorská ve Votava (2004), *S. warneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* suşlarının biyofilm oluşturdıklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da *S. warneri*'de aynı durum söz konusu olup biyofilm oluşturduğu görülmüştür.

Yıldız ve Visick (2009) *Vibrio* türlerinden, *cholerae*, *parahaemolyticus*, *vulnificus* ve *fischeri*'deki biyofilm oluşumunu karşılaştırdığında, biyofilm ile koloni morfolojisi arasında bir korelasyon olduğunu belirterek biyofilm üreten hücrelerin koloni yapılarının kıvrımlı ya da akışkan olabileceğini bildirmişlerdir. Biyofilmin matriks kimliğini tespit etmek için kolonideki değişimlere bakıldığını rapor ederek kongo red agar yönteminde koloninin renginin önemini vurgulamıştır. Bu çalışma baz alındığında araştırmamızda da *V. anguillarum* kolonisinin renginin kongo red agar testinde siyah olması bu bakterinin biyofilm oluşturduğunu göstermiştir.

Abdallah vd. (2009) *V. alginolyticus* ve *V. parahaemolyticus* suşlarının fenotipik slime üretimi kongo red agar testiyle araştırmışlardır. Sadece *V. alginolyticus* ATCC 17749 suşu kongo red agarda slime üreten siyah koloniler geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Yapışmanın ise *V. alginolyticus* suşlarında *V. parahaemolyticus* suşlarına göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada da kongo red agarda *V. anguillarum*'un siyah koloni oluşturarak slime ürettiği tespit edilmiştir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde biyofilmle mücadele de etkin koruma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İletişim, tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de çok etkin bir olgudur. Bakteriler salgıladıkları AHL molekülleri aracılığıyla iletişim kurarak bakteri-bakteri anlaşmasını sağlamaktadırlar. Bunun neticesinde de enfeksiyon oluşturan virülens faktörlerinin kritik gen ekspresyonlarını gerçekleştirmektedirler. Burada ki en önemli virülens faktörü son zamanlarda fenomen olan biyofilmdir. İletişimin gücüyle mikroorganizma virulent olmakta, klinik biyofilm oluşturmayla balık üzerinde ölümcül olmaktadır. Biyofilmin temeli olan QS'nin başarısız bir sistem haline getirilmesi bakteri için çok büyük bir kayıp olacaktır. Bu esasa hastalığı daha da güçlü hale getiren zararlı biyofilm gücünün hiç var olmaması su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodu olarak önerilebilir.

Biyofilm enfeksiyon sürecinde bakteriye ciddi bir etkinlik kazandırmakta ve tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bakteriye güç katan ve oldukça tehlikeli olan biyofilmlerin hasta balık

enfeksiyonlarında ilaç direncindeki rolünü araştırmalı ve biyofilm kontaminasyonu ile hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı tespit edilmelidir. Bu nedenle antibiyofilm yaklaşımları dikkat çekmektedir.

Araştırmacılar biyofilmlerin ölçümü için daha güvenilir teknikler ve kontrol stratejilerinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere daha iyi model sistemleri geliştirdikçe, daha etkili biyofilm kontrol stratejilerinin ortaya çıkması beklenmektedir. Ayrıca, biyofilmlerin antimikrobiyal ilaç direncindeki rolü araştırıldıkça ve biyofilm kontaminasyonu ile hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı daha iyi kuruldukça, biyofilmlerin yetiştiricilik sağlığındaki önemi konusunda daha net bir tablonun ortaya çıkacağına inanılmaktadır. Bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir virülens faktörü olan biyofilmi kongo red agar yöntemiyle saptamanın pratik, güvenilir ve az maliyetli olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan bazı suşların, neden olduğu vakalarının tedavisinde, antibiyogramla birlikte kongo red agar yönteminin kombine kullanımı, direnç gelişim mekanizmasını engelleyebilecek olan bir adım gibi gözüktüğü bazı araştırmalarda ifade edilmiştir. Örneğin Freeman vd. (1989)'a göre özel bir besiyeri olan kongo red agarda üreyen kolonilerin özelliklerine göre biyofilm yeteneğini belirlemeye çalışan yöntemler bulunmaktadır. Bu durumun balık hastalıkları enfeksiyonları tedavi çalışmalarında da fayda sağlayıp sağlamadığını tespit etmek için yapılacak çalışmalara bu araştırmadaki kongo red agar verileri ilk adım olabilir.

Sonuç olarak *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* bakterilerinde biyofilmin varlığı çalışmamızda açıkça ortaya konmuştur. Bu bakteriyel biyofilm inatçılığının bir sonucu olarak, klinik ilişkili biyofilm oluşumunu önlemek şarttır ve komplike teknolojilere gereksinim olduğu savunulmaktadır. Söz konusu biyofilm hastalıkların alt yapısını ciddi anlamda güçlendirmektedir. Bu çalışma da bakteri dünyasındaki enfeksiyon gücünün azaltılması, bakterinin kimliğinin ve doğasının çok iyi tanınması, bunun bir sonucu olarak bakteriyel güçlerden belki de etkili olan biyofilm virülens gücünün önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Burada esas vurgulanan amaç bakterinin daha biyofilmi oluşturmada önce onu engellemektir. Biyofilm oluşturmamış bakteri enfeksiyon gücü açısından zayıf bakteridir dolayısıyla biyofilmin engellenmesinin balık hastalıklarıyla mücadelede etkin role sahip olduğu ve büyük çıkır açacağı görüşündeyiz.

Teşekkür: Çalışma 5092-YL1-17 No'lu Proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından maddi olarak desteklenmiş olan yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., & Bakhrouf, A. (2009). Adherence assays ve slime production of *Vibrio alginolyticus* ve *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 394-398.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaioli, S., & Montanaro, L. (2015). Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural ve regulatory aspects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 7, doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., & Montanaro, L. (2002). Detection of Slime Production by Means of an Optimised Congo Red Agar Plate Test Based on a Colourimetric Scale in *Staphylococcus epidermidis*. *Clinical Isolates Genotyped for İca Locus, Biomaterials*, 23, 4233-4239.
- Aslan, H. (2015). *Cveida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal. T.C. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Supplement Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 136, 1-51.
- Bryers, J.D. (2008). Medical biofilms. *Biotechnology ve bioengineering*. 100(1), 1-18, PubMed PMID: 18366134.
- Černohorská, L., & Votava M. (2004). Determination of Minimal Regrowth Concentration (MRC) in Clinical Isolates of Various Biofilm-Forming Bacteria. *Folia Microbiologica*, 49 (1), 75-78.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.A., Baddour, L.M., Barrett, F.F., & Melton, D.M. vd. (1985). Adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (6), 996-06.
- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G. A., Beucher, E., Saiter, J. M., & Jouenne, T. (2002). Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell ve material surface properties. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 26 (4), 373-378.

- Coquet, L., Cosette, P., Quillet, L., Petit, F., Junter, G.A., & Jouenne, T. (2002). Occurrence ve Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 470-475.
- Çiftçi, Z. (2005). Kronik Tonsillit Biofilmin Rolü. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69s, İstanbul.
- Davies, D. (2003). Understveing biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-22.
- Deighton, M.A., Capstick, J., Domalewski, E., & Van Nguyen, T. (2001). Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods in Enzymology*, 336, 177-95.
- Delshad, S.T., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., & Bossier, P. (2018). Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and an *in vivo* evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *Journal of Fish Diseases*, <https://doi.org/10.1111/jfd.12840>.
- Demir, C., & İnanç, B.B. (2015). Investigate Nasal Colonize *Staphylococcus* Species Biofilm Produced (Nazal Kolonize Stafilokok Türlerinde Biyofilm Üretimini Araştırılması). *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 414-418.
- Donlan, R.M., & Costerton, W.J. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Diseases*, 8(9), 881-890.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., & Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(1), 872-4.
- Harraghy, N., Seiler, S., Jacobs, K., Hannig, M., Menger, M.D., & Herrmann, M. (2006). Advances in *in vitro* ve *in vivo* models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *The International Journal Artificial Organs*. 29, 368-78.
- Högfors-Rönholm, E., Norrgård, J., & Wiklund, T. (2015). Adhesion of Smoothan Drough Pheno types of *Flavobacterium psychrophilum* to Poly Styrene Surfaces, *Journal of Fish Diseases*, 38(5), 429-437.
- Jahid, I.K., Lee, N.Y., Kim, A., & Ha, S.D. (2013). Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76(2), 239-247.
- Jurcisek, J.A., & Bakaletz, L.O. (2007). Biofilms formed by nontypeable Haemophilus influenzae *In vivo* contain both double-strveed DNA ve type IV pilin protein. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3868-75.
- Kirov, S.M., Castrisios, A., & Shaw, J.G. (2003). Aeromonas Flegella (Polar ve Lateral) are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. *American Society for Micrbiology*, 72, 1939-45.
- Levipan, H.A., & Avendaño-Herrera, R. (2017). Different phenotypes of mature biofilm in *Flavobacterium psychrophilum* share a potential for virulence that differs from planktonic state. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(76), doi: 10.3389/fcimb.2017.00076.
- Madetoja, J. (2002). *Flavobacterium psychrophilum*: Characterisation, Experimental Transmission and Occurence in Fish and Fish Farming Environments. *Academic Dissertation, Finland*, 1-37.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal Medical Microbiology*, 24, 25-9.
- Molobela, I. P., Cloete, T.E., & Beukes, M. (2010). Protease ve amylaseenzymes for biofilm removal vedegradation of extracellular polymericsubstances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14), 1515-1524.
- Monroe, D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*, 5,11. Erişim tarihi: 14.10.2018. <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0050307>
- Mortensen, B.K. (2014). Problems caused by biofilms. *Bactoforce International A/S*. <http://www.bactoforce.se/wp-content/uploads/2014/09/Problems-caused-by-biofilms.pdf>.
- Nurcan, N. (2010). Bazı Gram-Negatif Bakteriyel Balık Patojenlerinde Çevreyi Algılama Sisteminin İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Ormancı, S. (2010). Hayvansal ve Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Hareketli *Aeromonas* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- O'Toole, G.A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., & Ehrlich, G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion Otolaryngology and Head Neck Surgery, Review*, 12(3), 185-90.
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U., & Möllby, R. (2007). The role of c-di-GMP signalling an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 273, 172-179.

- Rendueles, O., & Ghigo, J.M. (2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*, 1-18, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- Richards, J.J., & Melveer, C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem*, 10(14), 2287-94.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Ventura, G.B., Djukic, S., Irkovic, I.C. & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions ve practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *Apmis ResearchGate*, 115, 891-899.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*, 40, 175-9.
- Sundell, K., & Wiklund, T. (2011). Effect of biofilm formation on antimicrobial tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 34, 373-383 doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01250.x.
- Szczuka, E., & Kaznowski, A. (2014). Antimicrobial activity of tigecycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiology (Praha)*, 59, 283-8, <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-013-0296-9>.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönnström, L., & Dalsgaard, I. (1994). Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bulletin European Associate Fish Pathology*, 14, 44-46.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Hoiby, N., & Song, Z.J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1-7.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., & Yolota, I. (1994). Interaction between human polymorphonuclear leucocytes ve bacteria relased from *In vitro* bacteriol biofilms models. *Journal of Medical Microbiology*, 41, 359-67.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y., & Zhang, Y.X. (2008). Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.
- Yildiz, F.H., & Visick, K.L. (2009). Vibrio biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 17(3), 109-118.