

İzmir İlindeki Çeşitli Kaynaklardan *Aeromonas hydrophila*'nın İzolasyon, İdentifikasyon ve Toksik Özellikleri

Ataç UZEL, Füsün UÇAR

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilimdalı, 35100, Bornova, İzmir - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 11.03.1999

Özet : İzmir ilindeki toplam 43 örnek (14 deniz suyu, 5 kuyu suyu, 4 dere suyu, 10 midye ve 10 balık örneği) *Aeromonas hydrophila*' varlığı bakımından incelenmiştir.

Zenginleştirmede, çevresel örnekler için Alkaline Peptone Water (APW), gıda örnekleri için ise Ampisilin' li Trypticase Soy Broth (TSBA) kullanılmıştır. İzolasyonda, Ampisilin ve Toluidin mavi'li Dnaz Agar (DNTA), Aeromonas Agar (AA), Rimler Shotts Agar (RSA), mA Agar ve Aeromonas Medium Base (AMB) olmak üzere 5 farklı seçici besiyeri denenmiştir. İzolatların identifikasyonu Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984)'e göre gerçekleştirilmiş ve 9 izolat *A. hydrophila* olarak identifiye edilmiştir. Bu 9 izolatın enterotoksin üretimleri "Süt Emen Fare Deneyi" kullanılarak araştırılmış ve 8 izolatın enterotoksigenik oldukları bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Aeromonas hydrophila*, AMB, Süt Emen Fare Deneyi

Isolation, Identification and Toxigenic Tests of *Aeromonas hydrophila* from Several Sources in Izmir

Abstract : A total of 43 samples (4 sea water, 5 water, 4 river water, 10 oyster and 10 fish samples) from Izmir were examined for the presence of *Aeromonas hydrophila*.

Alkaline peptone Water (APW) for the environmental samples and Trypticase Soy Broth with Ampicillin and Toluidine Blue (TSBA) for the food samples were used for enrichment of the samples. In isolation, 5 different selective media were used: DNase Agar with Toluidine blue and Ampicillin (DNTA), Aeromonas Agar (AA), Rimler Shotts Agar (RSA), mA Agar and Aeromonas Mediums Base (AMB). Identification of the isolates was performed according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1984) and 9 isolates were identified as *A. hydrophila*. The enterotoxin production of 9 isolates was investigated by the suckling mouse assay and 8 of the 9 isolates were found to be enterotoxigenic.

Key Words: *Aeromonas hydrophila*, AMB, suckling mouse assay

Giriş

Aeromonas hydrophila, 1890' da Zimmerman ve 1891'de Sanrelli tarafından orijinal tanımlaması yapıldığından bu yana su, toprak, insanlar ve hayvanlardan izole edilebilmektedir (1).

A. hydrophila'nın balıklarda, kurbaçalarda ve daha birçok değişik hayvanlarda salgınlara sebep olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (2), ancak son yıllarda yapılan araştırmalar bu mikroorganizmanın insanlarda da değişik enfeksiyonlara neden olduğunu göstermektedir (3 - 5). *A. hydrophila* insanlara su kaynaklarından ve gıda maddelerinden bulaşmakta, ayrıca yaraların kirli su veya toprakla teması sonucu yara enfeksiyonlarına ve sepsismeğe neden olmaktadır. Bundan başka akut lösemi ve kemik iliği hastalığı olan ve immün sistemleri baskılanmış olan kişiler de *A. hydrophila* ile kolayca enfekte olabilmektedirler (1, 6).

A. hydrophila tatlı su ekosistemlerinin yerli florasına ait olan ve uygun koşullar altında çabucak çoğalabilen bir bakteridir. *Aeromonas* cinsi üyeleri aynı zamanda klorlanmış ve klorlanmamış içme suları, kuyu suları, dereler, deniz suları, ham çamur, işlenmiş çamur ve aktif çamur, atık su drenaj sistemleri ve yüzme havuzları gibi sucul çevrelerin yanı sıra etlerde, balıklarda, deniz kabuklularında, kümes hayvanlarında, çiğ süt ve süt ürünlerinde de bulunabilmektedirler (1, 3, 6).

A. hydrophila enterotoksin, sitotoksin ve hemolizin gibi biyolojik olarak aktif ekstraselüler virülens faktörlere sahiptir. Hareketli *Aeromonas*'lar tarafından 2 farklı hemolizin üretildiği bulunmuştur. Bunlardan bir tanesi optimum 22°C' ta üretilen α -hemolizin, diğeri ise optimum 37°C' ta üretilen β -hemolizin' dir. *Aeromonas* türlerinin enteropatogeniteleri sitotoksik enterotoksinle ilişkilidir ve enterotoksin üretimi de hemolizin üretimi ile bir bağlantı göstermektedir (1, 7, 8).

Gerek primer gerekse sekonder enfeksiyonlara neden olan *A. hydrophila* ile ilgili detaylı çalışmalara gerek duyulduğu açıktır. Özellikle insanlara ve hayvanlara bulaşma kaynaklarının iyi araştırılması ve identifikasyonlarının daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Belirtilen nedenlerle bu çalışmada *A. hydrophila* suşlarının çeşitli kaynaklardan izolasyonu, identifikasyonu ve toksijenik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Ocak 1995-Ocak 1996 tarihleri arasında İzmir bölgesinden alınan 14 deniz suyu, 4 dere suyu, 5 kuyu suyu, 10 balık (Hamsi, İstavrit, Mercan, İskorpit, Kefal, Bakalyora, Barbun, Sardalya, Palamut, Alabalık) ve 10 midye örneği araştırmamızın temel materyalini oluşturmuştur.

Örneklerin alınması: Su örnekleri 200 ml 'lik Roux şişelerinde, yüzeyin 1 m altından alınmış ve analiz için 2 saat içinde laboratuvara getirilmişlerdir (9). Midye ve balık örnekleri (9 deniz ve

1 tatlı su balığı) İzmir Balık Hali'nden temin edilmiş ve analiz için sadece, balıkların sindirim organları, midyelerin de iç kısımları alınarak steril, kapalı kaplarda 2 saat içinde laboratuvara getirilerek incelemeye alınmıştır (10, 11).

Zenginleştirme ve izolasyon: Alınan su örneklerinin 20 ml'si steril pipetler ile 500 ml' lik erlenler içinde bulunan 100 ml' lik steril Alkaline Pepton Water (APW)' a konulmuş ve bir gece boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır (12). Balık ve midye örnekleri ise steril blendırda parçalanıp homojenize edildikten sonra 0,1g/10 ml, 10g/10 ml, 10g/50 ml ve 20g/180 ml oranlarında Ampicillin'li Trypticase Soy Broth (TSBA)'a konulmuşlar ve 35°C'ta 24 saat inkübe edilmişlerdir (11). Daha sonra zenginleştirme broth'larından 5 farklı seçici besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Kullanılan besiyerleri sırası ile; Rimler - Shotts Agar (13), Aeromonas Medium Base (14), mA Agar (15), Ampisilin ve Toluidin Mavi'li DNaz Agar (DNTA) ve Aeromonas Agar (AA)'dır (1). Bu seçici besiyerlerinden, 35°C'ta 24 saat inkübasyondan sonra, 5'er adet tipik koloni alınmış ve ön identifikasyon için AH besiyerine aktarılmışlardır. DNTA'da üreyen ve etrafında DNA hidrolizinden dolayı geniş pembe bir zon bulunan koloniler, AA'daki ksiloz negatif olan koloniler, mA'da üreyen bütün koloniler, RSA'da üreyen ve merkezi siyah olmayan sarı koloniler ve AMB'de üreyen merkezi koyu, yeşil renkli bütün koloniler tipik koloni olarak değerlendirilmişlerdir.

AH besiyeri; Proteoz pepton, 5g; Maya ekstraktı, 3g; Triptone, 10g; L-ornitin hidroklorit, 5g; Mannitol, 1g; İnositol, 10g; Sodyum tiyosülfat, 0,4g; Ferrik amonyum sitrat, 0,5g; Brom krezol moru, 0,02g; Agar, 3g (Oxoid); Distile su, 1000 ml'dir. AH besiyerinde üstte alkali, dipte asit üreten, hareketli, H₂S (-) ve İndol (+) olan koloniler kesin identifikasyon için biyokimyasal testlere tabi tutulmuşlardır (16). İdentifikasyonda referans suş olarak İzmir Bölge Hıfzısıhha Enstitüsünden elde edilen *A. hydrophila* ATCC 7996 suşu kullanılmıştır. İdentifikasyon Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1984'e göre yapılmış ve bunun için toplam 45 biyokimyasal test; İndol, Eskülin hidrolizi; KCN'de büyüme; L- histidin, L- arginin ve L- arabinoz kullanımı; İnositol; Malonat; mukat; D-tartrat parçalanması; VP; Glukozdan gaz oluşumu; Sisteinden H₂S oluşumu; Oksidaz; Nitrat redüksiyonu, LDC; ODC; ADH; Triptofan deaminaz; Fenil alanin deaminaz; Üreaz; Amilaz; Jelatinaz; DNaz; RNaz; Tvin 80 esteraz; Simon sitrat; Kristiyansen sitrat; ONPG ve Salisin, Sükroz, Mannitol, İnositol, Maltoz, Galaktoz, Trehaloz, Sellobiyoz, Laktoz, Sorbitol, Dulsitol, Ramnoz, Ksiloz, Rafinoz, Adonitol ve Gliserol fermentasyonu gerçekleştirilmiştir (17).

Hemolizin Testi: Hemolitik aktivite tayini katı ortamda gerçekleştirilmiştir. İzolatlar % 5 insan kırmızı kan hücresi içeren Triptik Soya Agar'a (TSA) çizgi halinde inoküle edilmiş ve 37°C'ta 72 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresince petriler her gün hemolizin zonu varlığı bakımından incelenmişlerdir (18, 19).

Enterotoksin Üretim Testi: Elde edilen izolatların enterotoksin üretimleri "Süt Emen Fare Deneyi" kullanılarak araştırılmıştır. Bu denemede 0,02 ml, % 0,1 Etil viyoleto içeren 100 µl test süpernatantları 3 günlük Albino İsviçre Farelerine verilmiş ve 26°C'ta 3 saat inkübasyondan

sonra ince ve kalın barsakları çıkartılarak tartılmış ve bulunan değer kalan vücut ağırlığına oranlanmıştır. 0,08'in üzerinde çıkan oranlar enterotoksin üretimi için pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (9, 11).

Bulgular

İzolasyon çalışma sonuçları: Yapılan araştırmalar sonunda 4'ü deniz suyundan, 3'ü midyelerden, 1'i dere suyundan ve 1'i de balıklardan olmak üzere 43 örnekten toplam 9 *A. hydrophila* suşu izole edilmiştir.

İzolasyonda seçici besiyeri olarak DNTA, AA, RSA, mA Agar ve AMB kullanılmıştır. Çalışmanın ilk 3 ayı boyunca, bu besiyerlerinin ilk 4'ünden etkili bir izolasyon yapılamazken AMB'de izolasyon yapılmış ve çalışmanın sonuna kadar bu ortam seçici besiyeri olarak kullanılmıştır. Balık ve midye örneklerinin zenginleştirilmesinde kullanılan dilüsyonlardan en iyi sonuç 10g/50ml ve 20g/180ml'lik dilüsyonlardan alınmıştır. Her örnek için kullanılan AMB petri plaklarından 5'er adet tipik koloni (toplam 215 koloni) AH besiyerinde ön identifikasyona tabi tutulmuşlar ve bu ortamdaki reaksiyonlarına göre, farklı örneklerden elde edilen 20 izolat muhtemel *A. hydrophila* olarak değerlendirilmiştir.

İdentifikasyon sonuçları: Kesin identifikasyon için yapılan kültürel, mikroskopik ve biyokimyasal testler sonucunda +2 ü deniz suyundan (AU5, AU6, AU11 ve AU12), 3'ü midyelerden (AU17, AU18 ve AU27), 1'i dere suyundan (AU28) ve 1'i de balıklardan (kefal) (AU38) olmak üzere toplam 9 izolat *A. hydrophila* olarak identifiye edilmiştir. *A. hydrophila* ve Enterobacteriaceae üyelerinin AH besiyerindeki reaksiyonları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. *A. hydrophila* ve Enterobacteriaceae üyelerinin AH besiyerindeki reaksiyonları (Kaper, et al.,1979).

	ÜST	DİP	Hareketlilik	H ₂ S	İndol
<i>A. hydrophila</i>	K	A	+	-	+
<i>K.pneumoniae</i>	A	A	-	-	-
<i>K.oxytoca</i>	A	A	-	-	+
<i>E.coli</i>	K	K veya A	+ veya -	-	+
<i>Salmonella spp.</i>	K veya A	K veya A	+	+	-
<i>Enterobacter spp.</i>	K veya N	K veya N	+	-	-
<i>Proteus spp.</i>	K	K veya A	+	+ veya -	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	K veya N	K veya N	-	-	+ veya -
<i>Citrobacter spp.</i>	K	A veya N	+	+	-
<i>Serratia spp.</i>	N veya K	N veya K	+	-	-

K: Alkali reaksiyon, A: Asit reaksiyon

N : İndikatörün tahribinden dolayı beyazlatılmış nötral renk

+ : % 90 veya daha fazla pozitif

- : % 90 veya daha fazla negatif

Enterotoksin testi: İdentifikasyonu yapılan 9 *A. hydrophila* suşu hemolizin ve enterotoksin üretimi bakımından incelenmiş ve hepsi de β -hemolizin üretimi açısından pozitif bulunmuşlardır. İzolatlarda β -hemolizin'den başka bir hemolizin çeşidine rastlanmamıştır. Enterotoksin üretimi ise AU27 no'lu izolatta negatif, diğer bütün izolatlarda pozitif olarak gözlenmiştir (Tablo 2). Eğer "Süt Emen Fare Deneyi" nde kullanılan süpernatantlar enterotoksin içeriyorlarsa farelerin barsaklarına sıvı akümüasyonu gerçekleşmekte ve barsak ağırlığı / vücut ağırlığı oranı artarak 0,08'in üzerine çıkmakta, enterotoksin içermiyorlarsa bu oran düşük kalmaktadır ($< 0,08$). Enterotoksin testinde pozitif kontrol olarak enterotoksin ürettiği bilinen *A. hydrophila* ATCC 7966 referans suşu, negatif kontrol olarak ta 100 ml steril fizyolojik su kullanılmıştır. (Tablo 2). Enterotoksin testinin pozitif ve negatif sonuçları Şekil 1'de gösterilmektedir.

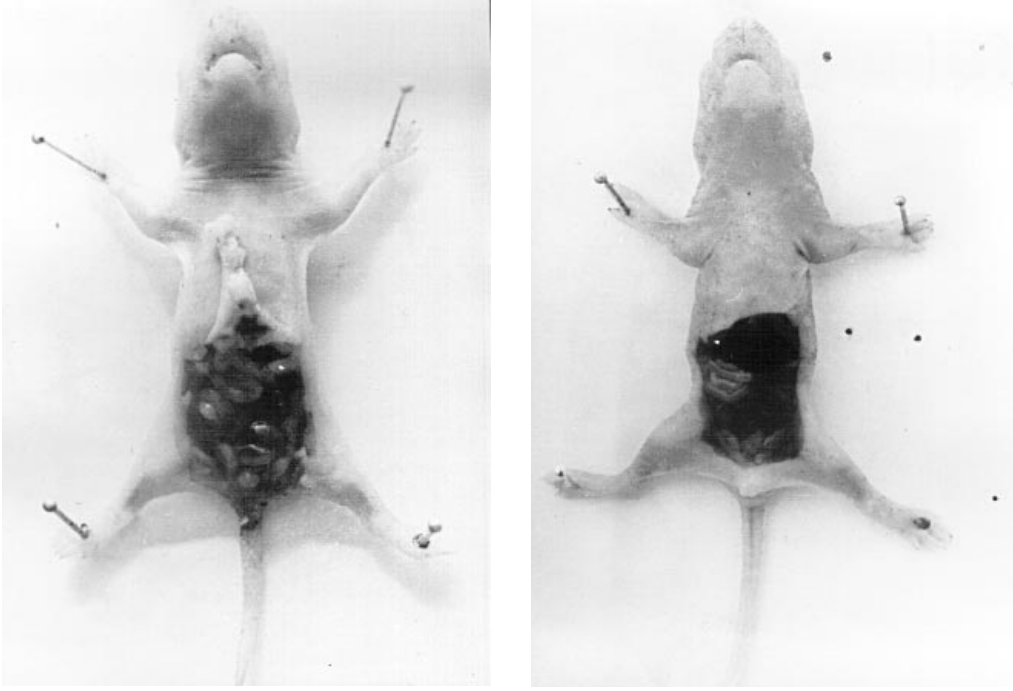
Tartışma ve Sonuç

Son yıllarda *A. hydrophila* üzerinde yoğunlaşan ilgiyle beraber bu organizmanın potansiyel kaynakları da araştırılmaya başlanmıştır. Bu organizmanın tatlı sulardan, deniz sularından, klorlanmış ve klorlanmamış içme sularından, çeşitli deniz kabuklularından, balıklardan, etlerden, sebzelerden, çiğ süt ve süt ürünlerinden, gaitadan ve çeşitli hastalardan izole edilebildiğine dair raporlar mevcuttur (4, 6, 10, 20, 21). Bu araştırmada da *A. hydrophila* izolasyonunun en çok bildirildiği kaynaklar göz önünde tutularak araştırmanın materyali bu yönde seçilmiş ve bu

İzolat no	B.a	V.a	B.a/V.a
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	0,54	5,85	0,092
5	0,51	5,80	0,087
6	0,48	5,03	0,095
11	0,52	5,90	0,088
12	0,45	5,12	0,087
17	0,43	4,95	0,086
18	0,45	5,50	0,081
27	0,42	5,29	0,079
28	0,52	6,20	0,083
38	0,50	5,92	0,084
Negatif kontrol	0,32	5,54	0,057

Tablo 2. Elde edilen 9 *A. hydrophila* izolatının ve *A. hydrophila* ATCC 7966'nin enterotoksin üretim test sonuçları.

Ba; Barsak ağırlığı, Va; Vücut ağırlığı.



Şekil 1. a. Enterotoksigenik bir *A. hydrophila* straininin (6 No'lu izolat) kültür süpernatantının yavru farenin barsaklarında yarattığı sıvı akümüülasyonu. b. Negatif kontrol olarak kullanılan ve kültür süpernatantı yerine steril su verilmiş olan bir farenin barsak görüntüsü.

doğrultuda yapılan araştırmada, 14 deniz suyundan 4'ünde (% 28.5), 10 midyeden 3'ünde (% 30), 4 dere suyundan 1'inde (% 25) ve 10 balıktan 1'inde (% 10) oranlarında *A. hydrophila*'ya rastlanmıştır. Ancak araştırma materyalinin bir kısmını oluşturan balık ve midye örneklerinin sayısı az olduğundan ve mikrobiyal yükleri mevsimlere göre değişiklik gösterebildiğinden bu konuda bir genelleme yapmak hatalı olabilir.

Şimdiye kadar *A. hydrophila*'nın izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda çok çeşitli seçici besiyerleri kullanılmış ancak bunlardan hiçbirisi genel olarak bir diğerine göre üstün bulunmamıştır (1). Yapılan araştırmada *A. hydrophila* izolasyonunda kullanılan seçici besiyerlerinin çokluğu ve hiçbirisinin genel olarak bir diğerine üstün olmadığı göz önünde tutularak, öncelikle her tip örnek için uygun olan bir besiyerinin bulunmasına çalışılmıştır. Bunun için nispeten daha iyi sonuç verdikleri belirtilen 5 farklı seçici besiyeri denenmiş (DNNTA, AA, RSA, mA Agar ve AMB) ve bu besiyerleri içinde *A. hydrophila*'nın izolasyonu için en uygun besiyerinin AMB olduğu bulunmuştur.

İdentifikasyon için yapılan biyokimyasal testler sonunda , *A. hydrophila*'nın laktoz ve adonitol negatif bir organizma olduğunun bildirilmesine rağmen (1), 27 No'lu izolatın laktozu ve 28 No'lu izolatın da adonitolü fermente etme yeteneğinde olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmada izole edilen 9 *A. hydrophila* izolatının enterotoksin üretimlerini test etmek için "Suckling Mouse Assay" kullanılmış ve 9 *A. hydrophila* izolatından 8 tanesinin (AU5, AU6, AU11, AU12, AU17, AU18, AU28 ve AU38) enterotoksigenik oldukları bulunmuştur.

A. hydrophila'nın en yaygın kaynaklarının gıdalar ve sucul çevreler olduğu bilinmektedir. Bu kaynaklardan *A. hydrophila*'nın saptanması ile ilgili rutin testler varsa da bu testler geliştirilerek daha pratik hale getirilmelidir. Bu nedenle öncelikle *A. hydrophila*'nın karakterizasyonu ile ilgili araştırmalara yoğunluk verilmesi, ayrıca bu organizmanın insanlarda hastalık yapma mekanizmasının anlaşılabilmesi için virülens faktörlerinin detaylı genetik araştırmalarla ortaya çıkartılması gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Farmer, J. J., Arduino, M. J. and Hickman-Brenner, F. W. The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*, In A. Balows et al. (Ed), The Prokaryotes. 1992. Vol 3, Springer-Verlag, New York. 889p.
2. Rahim, Z., Sanyal, S. C., Aziz, K. M. S., Hug, M. I. and Chowdhury, A. A. Isolation of Enterotoxigenic, Hemolytic and Antibiotic Resistant *Aeromonas hydrophila* strains from Infected Fish in Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 48: 865 - 867, 1984.
3. Arcos, M. L., Vicente, A., Morinigo, M. A., Romero, P. and Borrego, J. J. Evolution of Several Selective Media for Recovery of *Aeromonas hydrophila* from Polluted Waters. Applied and Environmental Microbiology. 54: 2786 - 2792, 1988.
4. Berrang, M. E., Brackett, R. E. and Beuchat, L. R. Growth of *Aeromonas hydrophila* on Fresh Vegetables Stored Under a Controlled Atmosphere. Applied and Environmental Microbiology. 22: 2167 - 2171, 1989.
5. Lina, P. D., Saraswathi, K. And Varudhar, A. aeromonas spp. and their Association with human diarrheal disease. J. Clin. Micro. 29: 853 - 856, 1991.
6. Abeyta, C. and Wekell, M. M. Potential Sources of *Aeromonas hydrophila*. Journal of Food Safety. 9: 11 - 22, 1988.
7. Brenden, R. and Janda, J. M. Detection, Quantitation and Stability of the β -Hemolysin of *Aeromonas* spp.. J. Med. Microbiol. 24: 247 - 251, 1987.
8. Monford, F. and Baleux, B. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* and *Aeromonas caviae* in a Sewage Treatment Pond. Applied and Environmental Microbiology. 56: 1999 - 2006, 1990.
9. Pathak, S. B., Bhattacharjee, J. W., Kalra, N. and Chondra, S. Seasonal Distribution of *Aeromonas hydrophila* in River Water and Isolation from river fish. J. Appl. Bact. 65: 347 - 352, 1988.
10. Nishikawa, Y. and Kishi, Y. Isolation and Characterisation of Motile *Aeromonas* from Human, Food and Environmental Specimens. Epidem. Infec. 101: 213 - 223, 1988.
11. Abeyta, C., Kaysner, C. A., Wekell, M. M., Sullivan, J. J. and Stelma, G. N. Recovery of *Aeromonas hydrophila* from Oysters Implicated in an Outbreak of Foodborne Illness. Journal of Food Protection. 49: 643 - 646, 1986.
12. Millership, S. E. and Cattopadhyay, B. *Aeromonas hydrophila* in Chlorinated Water Supplies. Journal of Hospital Infection. 6: 75 - 80, 1985.

13. Shotts, E. B. and Rimler, R. Medium for the Isolation of *Aeromonas hydrophila*. App. Microbiol. 26: 550 - 5543, 1973.
14. Bridson, E. Y. The Oxoid Manual. 1990. Unipath Ltd., England. 590p.
15. Poffe, R. and Beeck, E. O. Enumeration of *Aeromonas hydrophila* from Domestic Wastewater Treatment Plants and Surface Waters. Journal of Applied Bacteriology. 71: 366 - 370, 1991.
16. Kaper, J., Seidler, J., Jockman, H and Colwell, R. R. Medium for the Presumptive Identification of *Aeromonas hydrophila* and Enterobacteriaceae. Applied and Environmental Microbiology. 38: 1023 - 1026, 1979.
17. Paul, B. And Ralph, H. W. S. Vibrionaceae and Other Gram Negative Facultatively Anaerobic Rods. In Krieg, N. R. (Editör). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. 1984. Williams & Wilkins. USA. 942p.
18. Gerard, N. S. Jr., Johnson, C. H., and Spaulding, P. Evidence for the Direct Involvement of β -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* Enteropathogenicity. Current Microbiology. 14: 71 - 77, 1986.
19. Bloch, S. & Monteil, H. Purification and Characterization of *Aeromonas hydrophila* Beta-hemolysin. Toxicon. 27: 1279 - 1287, 1989.
20. Kooij, D. V. D. and Hijnen, W. A. M. Nutritional Versatility and Growth Kinetics of an *Aeromonas hydrophila* Strain Isolated from Drinking Water. Applied and Environmental Microbiology. 54: 2842 - 2851, 1988.
21. Pasquale, V., Baloda, S. B., Dumontet, S. and Krovacek, K. An Outbreak of *Aeromonas hydrophila* Infection in Turtles (*Pseudemys scripta*). Appl. Environ. Microbiol. 60: 1678 - 1680, 1994.