

## Süs balığı satışı yapılan akvaryumlardan izole edilen Gram negatif bakterilerin antimikrobiyal direnç profillerinin araştırılması

### Investigation of antimicrobial resistance profiles of Gram negative bacteria isolated from ornamental fish aquariums in petshops

Esra ÖZKAYA<sup>1</sup>, Kurtuluş BURUK<sup>1</sup>, Neşe KAKLIKKAYA<sup>1</sup>, İlknur TOSUN<sup>1</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Süs balığı satışı yapılan iş yerlerinde bulunan akvaryumlarda çok sayıda balık bir aradadır ve çok sayıda mikroorganizma çoğalabilmektedir. Daha da önemlisi, satış yapılırken balıklar bir miktar su ile birlikte transfer edildiğinden mikroorganizmalar farklı akvaryumlara da aktarılmaktadırlar. Süs balıklarının üretilmesi esnasında balık hastalıklarının önlenmesi ya da tedavi edilmesi amacıyla akvaryumlara çeşitli antimikrobiyaller eklenebilmektedir. Bu da antimikrobiyal direnç gelişimine neden olabilmektedir. Çalışmamızın amacı; evcil hayvan satışı yapılan mağazalardaki süs balığı akvaryumlarından alınan su örneklerinde bulunan Gram negatif bakterilerin varlığı ve antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesidir.

**Yöntem:** Trabzon ilinde hizmet vermekte olan beş evcil hayvan satış mağazasında bulunan 27 adet süs balığı akvaryumundan su örnekleri alındı. Bu örneklerin %5 Koyun Kanlı Agar ve Eosin-Methylene-Blue Agar besiyerlerine ekimleri yapıldı. Üreme olan plaklardan alınan koloniler, MALDI-TOF MS kullanılarak tanımlandı. Antimikrobiyal duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı.

**Bulgular:** Beş evcil hayvan satış mağazasından alınan 27 adet süs balığı akvaryum suyu örneğinde 31 adet Gram negatif bakteri tanımlandı. En sık %25,8 ile *Citrobacter*

#### ABSTRACT

**Objective:** In aquariums in shops which sell ornamental fish, a large number of fish are present together, and many microorganisms can grow in them. Moreover, since the fish which are sold are transferred with some water the microorganisms are transported to different aquariums as well. A variety of antimicrobials can be added to aquariums to prevent or treat fish diseases during the breeding of ornamental fish, and this can lead to the development of antimicrobial resistance. The aim of this study is to determine the presence and antimicrobial susceptibility of Gram negative bacteria isolated from water samples taken from ornamental fish aquariums in stores where pets are sold.

**Methods:** Water samples were collected from 27 ornamental fish aquariums in five pet shops serving in Trabzon. These specimens were inoculated on 5% Sheep Blood Agar and Eosin-Methylene-Blue Agar media. Colonies from plaques were identified using MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibility tests were performed using the Kirby-Bauer disc diffusion method.

**Results:** A total of 31 Gram negative bacteria were identified in the 27 samples of ornamental fish aquarium water taken from the five pet shops. *Citrobacter freundii* was detected most frequently with a rate of 25.8%.

<sup>1</sup>Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TRABZON

İletişim/Corresponding Author : Esra ÖZKAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ortahisar - Trabzon - Türkiye  
Tel : +90 505 620 42 57 E-posta/ E-mail : esraozkaya@ktu.com.tr

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2017.18292

Özkaya E, Buruk K, Kaklıkkaya N, Tosun İ. Süs balığı satışı yapılan akvaryumlardan izole edilen gram negatif bakterilerin antimikrobiyal direnç profillerinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2017; 74(EK-1): 35-40

*freundii* tespit edildi. Dört *Aeromonas hydrophila* suşundan birinde klinik tedavilerde sıkça kullanılan imipeneme, meropeneme ve ertapeneme karşı direnç varlığı belirlendi. Üretilen *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde, *Pseudomonas* türleri ve *Acinetobacter* türlerinde trimetoprim-sülfametoksazol ve siprofloksasine direnç görüldü.

**Sonuç:** Balıkların zoonotik bulaştırmadaki rolleri bilinmektedir. Özellikle antimikrobiyal dirençli suşlar, tedavi seçeneği sınırlanmış ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Dolayısıyla izlemi konusunda hassas davranılması gereklidir. Sonuç olarak akvaryum suları ile temasın dirençli mikroorganizmaların yayılımında önemli faktörlerden biri olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamız, akvaryum sularından izole edilen “Gram negatif bakterilerde antimikrobiyal direnç varlığı” için geniş bir çalışma olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** akvaryum, Gram negatif bakteriler, antimikrobiyal direnç

Resistance to imipenem, meropenem and ertapenem, which are commonly used antibiotics in clinical treatments, was determined in one isolate among the four *Aeromonas hydrophila* isolates. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and ciprofloxacin was seen in members of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. isolated in this study.

**Conclusion:** Fish have an important role in zoonotic transmission. Antimicrobial resistant strains can cause serious infections which have limited therapeutic options. As a result, it should be considered that contact with aquarium water may be one of the important factors in the spread of resistant microorganisms. In our study, it is the most extensive study that has been conducted to investigate the presence of antimicrobial resistance in Gram negative bacteria isolated from aquarium water.

**Key Words:** aquarium, Gram negative, antimicrobial resistance

## GİRİŞ

Süs balığı akvaryumları; evlerde, ofislerde, okullarda, huzur evlerinde, restoranlarda hatta bazen hastanelerde ya da dış kliniklerinde bulunduran dekoratif amaçlı kaplardır. Akvaryumların ve içerisindeki alet ve objelerin temizliği, akvaryum suyunun değiştirilmesi, bitki ekimi ya da balıkların beslenmesi esnasında genellikle akvaryum suyu ile temas edilmektedir. Akvaryumlar, hem canlı balık hem su, hem de su bitkileri içermeleri sebebi ile çok sayıda mikroorganizma bulundurabilmektedir. Özellikle balık satışı yapılan akvaryumlarda çok sayıda balık bir arada bulunmakta, satış yapılırken balıklar bir miktar su ile birlikte transfer edildiğinden bu mikroorganizmalar farklı akvaryumlara da aktarılabilmektedirler (1).

Akvaryum sularında insan sağlığı ile ilişkili olabilecek bakterilerin arandığı bazı çalışmalar

yapılmış, koliform bakteriler, *Salmonella* spp., *Camphylobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Citrobacter*, *Vibrio* spp., *Legionella* ya da *Mycobacterium* gibi bazı bakteri türleri izole edilmiştir (2-4).

Süs balıklarının üretilmesi esnasında balık hastalıklarının önlenmesi ya da tedavi edilmesi amacıyla akvaryumlara çeşitli antimikrobiyaller eklenebilmektedir. Genellikle eklenen antimikrobiyaller su içerisinde dilüe olmakta ve terapötik seviyenin altında kalmaktadır. Bu da antibiyotik direnci gelişimine neden olabilmektedir (5).

Bu çalışmanın amacı, evcil hayvan satışı yapılan mağazalardaki süs balığı akvaryumlarından alınan su örneklerinde bulunan Gram negatif bakterilerin antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesidir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Trabzon ilinde hizmet vermekte olan beş hayvan satış mağazasında bulunan 27 adet süs balığı akvaryumundan 1'er mL su örneği steril vidalı kapaklı kaplara alındı. Bu örneklerin her birinden 10'ar µL %5 Koyun Kanlı Agar (GBL, Türkiye) ve Eosin-Methylene-Blue Agar besiyerlerine (GBL, Türkiye) ekim yapılarak, bir gece boyunca 35°C'de inkübe edildi. Üreme olan plaklardan alınan koloniler MALDI-TOF MS (The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) (Bruker Microflex LT, ABD) kullanılarak tanımlandı. Antimikrobiyal duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı ve sonuçlar CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) standartlarına göre değerlendirildi. Değerlendirme yapılırken orta duyarlı (intermediate) bulunan suşlar da dirençli olarak kabul edildi (6, 7).

## BULGULAR

Çalışma için örnek alınan tüm akvaryum sularının Kanlı Agar ve EMB agar besiyerlerinde üremeleri tespit edildi (Tablo 1). Plaklarda üreyen bakteriler ve bu bakterilerin antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 2 ve 3'te belirtilmiştir.

**Tablo 1.** Akvaryum sularından izole edilen bakteriler ve saptanma oranları

Bakteri Adı	Sayı*	Yüzdesi
<i>Citrobacter freundii</i>	8	25,8
<i>Acinetobacter junii</i>	4	12,9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	12,9
<i>Aeromonas veronii</i>	4	12,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	6,5
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2	6,5
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	6,5
<i>Acinetobacter</i> spp.	1	3,2
<i>Escherichia coli</i>	1	3,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3,2
<i>Pseudomonas mastitis</i>	1	3,2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	3,2
<b>TOPLAM</b>	<b>31</b>	<b>100</b>

\*İlgili bakterinin saptandığı örnek sayısı

## TARTIŞMA

Çalışmaya alınan 27 akvaryum suyu örneğinden 31 adet Gram negatif bakteri izolatu üretilmiştir. Bu izolatların duyarlılıkları araştırıldığında bazı *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Acinetobacter* ve *Aeromonas* suşlarında direnç belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda da benzer örneklerden üretilen *Citrobacter*, *Aeromonas* ve *Salmonella* türlerinde antibiyotik direnci gösterilmiştir (1, 2, 5, 8-10).

Çalışmamızda en çok sayıda izole edilen *Citrobacter freundii* suşlarının tümünde ampisilin ve amoksisilin-klavulonata karşı direnç saptanmışken, üçünde trimetoprim-sulfametaksazol, ikisinde de sefuroksime karşı direnç varlığı belirlenmiştir. Brezilya'da melek balıkları ile ilgili bir çalışmada izole edilen *Citrobacter freundii* suşunda da çalışmamızla benzer şekilde ampisilin direnci tespit edilmiş, ayrıca izole edilen bakterinin farklı antimikrobiyallere karşı da dirençli olduğu gösterilmiştir (11).

İzole edilen *Aeromonas* türlerinin antimikrobiyal direnç profilini incelediğimizde, Gram negatif bakterilerin tedavilerinde son seçeneklerden biri olarak kabul edilen karbapenemlere karşı üç izolatta direncin görülmesi oldukça dikkat çekicidir (12). *Aeromonas* türü bakterilerde beta-laktamaz üretimi tedavi planlamalarında güçlükler neden olmaktadır. Bu nedenle tedavide beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine antimikrobiyaller önerilmektedir. Ancak çalışmamızda üretilen *Aeromonas* cinsi bakterilerin amoksisilin-klavulanata karşı dirençli olarak belirlenmiştir (13). İzole edilen yedi *Pseudomonas* spp. suşunun beşinde seftriakson ve sefotaksime, beş *Acinetobacter* spp. suşunun üçünde siprofloksasine karşı direnç belirlenmiştir. Ayrıca izole edilen *E. coli* suşunda da çeşitli antibakteriyellere direnç gösterilmiştir. Bu durum akvaryum kaynaklı bakterilerin hastalık yapabileceğini düşündürmektedir.

Balıkların zoonotik bulaştırmadaki rolleri bilinmektedir. Özellikle antimikrobiyal dirençli

Tablo 2. Akvaryum sularından izole edilen *Enterobacteriaceae* ait türlerin antimikrobiyal duyarlılıkları

Örnek no	Bakteri adı	*Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları												
		AMC	CX	CRO	CTX	FEP	IMP	MEM	ERT	AK	GN	SXT	CIP	
C8	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A7	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B6	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
B10	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D10	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E9	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B4	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
B1	<i>Citrobacter freundii</i>	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
A2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
A7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
A9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E8	<i>Aeromonas veronii</i>	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D8	<i>Aeromonas veronii</i>	-	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S
D1	<i>Aeromonas veronii</i>	-	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
D4	<i>Aeromonas veronii</i>	-	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
D9	<i>Esherichia coli</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
E1	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

\*AM: Ampisilin; AMC: Amoksisilin-klavunat; CX: Sefuroksim; CRO: Seftriakson; CTX:Sefotaksim; FEP: Sefepim; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; ERT:Ertapenem; AK: Amikasin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; GN:Gentamisin; CIP: Siprofloksasin; R: Rezistan (dirençli), S: Sensitif (duyarlı).

Tablo 3. Akvaryum sularından izole edilen nonfermentatif bakteri türlerinin antimikrobiyal duyarlılıkları

Örnek no	Bakteri adı	*Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları											
		SAM	CAZ	CRO	CTX	FEP	IMP	MEM	AK	GN	CIP	SXT	
C4	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
E1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	-	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-
C2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-
D7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-
B7	<i>Pseudomonas mastitis</i>	-	-	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-
B2	<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
A1	<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	R	R	S	S	S	S	S	R	-	-
E3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
D6	<i>Acinetobacter junii</i>	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S
E10	<i>Acinetobacter junii</i>	S	S	-	-	S	S	S	S	S	S	S	S
C10	<i>Acinetobacter junii</i>	S	S	-	-	S	S	S	S	S	R	S	S
C9	<i>Acinetobacter junii</i>	S	S	-	-	S	S	S	S	S	R	S	S
A1	<i>Acinetobacter spp.</i>	S	S	-	-	S	S	S	S	S	R	S	S

\*SAM: Ampisilin-sulbaktam; CAZ: Seftazidim; CRO: Seftriakson;  
 CTX: Sefotaksim; FEP: Sefepim; IMP: İmipenem;  
 MEM: Meropenem; AK: Amikasin; GN: Gentamisin;  
 CIP: Siprofloksasin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol;  
 R: Rezistan (dirençli), S: Sensitif (duyarlı).

suşlar, tedavi seçeneği sınırlanmış ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (9). Dolayısıyla izlemi konusunda hassas davranılması gereklidir.

Çalışmamız sonucunda akvaryum sularından izole edilen Gram negatif bakterilerde antimikrobiyal

direnç varlığını araştıran kapsamlı bir çalışma olduğu kanaatindeyiz. Akvaryum suları ile direkt temasın dirençli mikroorganizmaların yayılımında önemli faktörlerden biri olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Seepersadsingh N, Adesiyun AA. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in pet mammals, reptiles, fish aquarium water, and birds in Trinidad. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2003; 50(10): 488-93.
2. Culpepper EE, Clayton LA, Hadfield CA, Arnold JE, Bourbon HM. Coliform bacteria monitoring in fish systems: current practices in public aquaria. *J Aquat Anim Health*, 2016; 28(2): 85-90.
3. Smith KF, Schmidt V, Rosen GE, Amaral-Zettler L. Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 2011; 14(3): 427-38.
4. Kušar D, Zajc U, Jenčič V, Očepek M, Higgins J, Žolnir-Dovč M, et al. Mycobacteria in aquarium fish: results of a 3-year survey indicate caution required in handling pet-shop fish. *J Fish Dis*, 2016 Oct 17. doi: 10.1111/jfd.12558.
5. Trust TJ, Whitby JL. Antibiotic resistance of bacteria in water containing ornamental fishes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1976;10(4):598-603.
6. Anonymous. Methods for the antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, 2nd ed, M45-A2. Wayne, PA: CLSI, 2006.
7. Anonymous. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19. Wayne, PA: CLSI, 2009.
8. Sha Q, Forstner MR, Bonner TH, Hahn D. *Salmonellae* in fish feces analyzed by in situ hybridization and quantitative polymerase chain reaction. *J Aquat Anim Health*, 2013; 25(3): 184-90.
9. Boylan S. Zoonoses associated with fish. *PLoS One*, 2012; 7(9): e39971.
10. Musto J, Kirk M, Lightfoot D, Combs BG, Mwanri L. Multi-drug resistant *Salmonella* Java infections acquired from tropical fish aquariums, Australia, 2003-04. *Commun Dis Intell Q Rep*, 2006; 30(2): 222-7.
11. Gallani SU, Sebastião FA, Valladão GM, Boaratti AZ, Pilarski F. Pathogenesis of mixed infection by *Spironucleus* sp. and *Citrobacter freundii* in freshwater angelfish *Pterophyllum scalare*. *Microb Pathog*, 2016; 100: 119-123.
12. Yagoubat M, Ould El-Hadj-Khelil A, Malki A, Bakour S, Touati A, Rolain JM. Genetic characterisation of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria isolated from the University Hospital Mohamed Boudiaf in Ouargla, southern Algeria. *J Glob Antimicrob Resist*, 2016; 8: 55-59.
13. Aravena-Román M, Inglis TJ, Henderson B, Riley TV, Chang BJ. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012; 56(2): 1110-2.