

***Patella* sp. (Gastropoda: Mollusca) Mukus Salgısına Denizel Bakterilerin Yerleşimi**

*Beria Falakalı Mutaf¹, Deniz Akşit², Jale Korun³

¹Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Temel Bilimler Bölümü, Dumlupınar Bulvarı, Yerleşke, Antalya, Türkiye
²Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı, Dumlupınar Bulvarı, Yerleşke, Antalya, Türkiye
³Akdeniz Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Dumlupınar Bulvarı, Yerleşke, Antalya, Türkiye
*E-mail: fmberia@akdeniz.edu.tr

Abstract: *Settlement of marine bacteria on Patella sp. (Gastropoda: Mollusca) mucus.* The mucus which is used during locomotion of *Patella* species is a habitat for microorganism adhesion. In order to determine the increase capability of bacteria on mucus of different *Patella* species, *Vibrio fluvialis*, *V. furnissii*, isolated from seawater, were inoculated to *Patella caerulea* and *P. rustica* mucus. Adhesion densities of the bacteria on *Patella* sp. mucus were examined comparatively on crystal violet stained slides by light microscopy. Mucus preference of the *Vibrio* species differed according to the *Patella* sp. The results showed that mucous film on a rock, produced by a *Patella* sp., seems important for marine bacteria settlement which is directed to a presumption of mucus being a stimulant for succession of other organisms.

Key Words: *Patella caerulea*, *P. rustica*, *Vibrio fluvialis*, *V. furnissii*, mucus.

Özet: Tutunma ve kayma hareketleri gösteren *Patella* türlerinin oluşturduğu mukus salgısı mikroorganizmalar için bir yapışma ortamıdır. Türler göre mukus salgısının bakterilerin çoğalma potansiyellerine etkisinin araştırılması amaçlanmış, deniz suyundan izole edilen *Vibrio fluvialis* ve *V. furnissii* türleri *Patella caerulea* ve *P. rustica* mukusuna aşılanmıştır. Yapışma yoğunlukları karşılaştırmalı olarak kristal viyole ile boyanmış lamlarda ışık mikroskobu düzeyinde belirlenmiştir. *Vibrio* türlerinin mukus tercihleri *Patella* türlerine göre farklılık göstermiştir. Bu çalışma bulguları, *Patella* sp. mukus tabakasının kaya üzerinde denizel bakterilerin yerleşimi açısından önemini ve bu bakterilerin diğer organizmalar için uyarıcı etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Patella caerulea*, *P. rustica*, *Vibrio fluvialis*, *V. furnissii*, mukus.

Giriş

Gastropodlarda muköz salgılar, bu organizmaların belli habitatta yerleşimi ve hareketleri açısından önemli rol oynar (Calow 1974, Peduzzi and Herm 1991, Smith and Marin 2002). *Patella* cinsi bireyler mediolitoral zonda kayalar üzerine sıkıca yapışır. Smith (1992) bu canlıların iki farklı yapışma durumunu dönüşümlü olarak gösterdiğini, ıslak dönemde kas gücüyle, suların çekildiği dönemde ise zank gibi bir madde ile yapıştığını açıklamıştır. Ayrıca zanksı yapışma uzun süreli olup sert bir maddeden ziyade bir mukus salgısına dayanmaktadır.

Mukus salgısı omurgalılarda sindirim ve solunum gibi sistemlerde koruyucu bir tabaka oluşturur. Ayrıca omurgalılar ve omurgasızlarda vücut yüzeyinde bakteri veya başka organizmaların yapışmasını önleyici bir madde olarak bulunur (Krovacek ve diğ. 1987). Gastropodlarda mukus, protein ve polisakkaritlerin oluşturduğu gevşek moleküler bir ağ özelliğinde bulunmuştur (Holmes ve diğ. 2002). Bu mukus salgısı, *Patella* gibi hareketi sınırlı alanda gerçekleşebilen gastropodların besin kaynaklarını artırıcı yönde mikro ve makro alglerin gelişimlerinde etkileri açısından incelenmiştir (Connor 1986, Davies ve diğ. 1992, Holmes ve diğ. 2002).

Bu çalışmada *Vibrio* cinsine dahil bakterilerin patojenik olma özellikleri (Yan ve diğ. 2010) yanında bakterioplankton özelliği taşımaları nedeniyle (Hornak ve diğ. 2005), iki farklı *Patella* türünün oluşturduğu mukusun bu bakterilerin çoğalma

potansiyelleri yönüyle karşılaştırılması ve mukus salgısının ortamın besin ekolojisi açısından önemini ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Antalya Körfezinden (36°53'04.26 N - 36°36'25.22 N ve 31°46' 31.30 E- 30°42'03.62E) toplanan (Şekil 1) *P. rustica* ve *P. caerulea* örnekleri canlı olarak deniz suyu içerisinde Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Araştırma laboratuvarına getirilerek, akvaryumda temiz deniz suyuna aktarma suretiyle yaşatıldı. Ayak mukus salgısının eldesi için, 5'er adet *Patella* örnekleri içine steril lam yerleştirilmiş derin petride 12 saat tutularak, bu organizmalar daha sonra alınıp mukuslu lamlar 12 saat oda sıcaklığında kurutuldu (Connor 1986, Smith 2002). Ayrıca örneklerin toplandığı bölgeden steril bir kaba alınan deniz suyu 2 saat içinde laboratuvara getirilip, fizyolojik su ile sulandırılarak % 10 Marine Salts Medium Agar (MSMA) (NCIMB, 1994)'da 24 °C de 72 saat süre ile inkübe edildi.

İzole edilen bakterilerin MSMA da alt kültürlerinin oluşumu sağlandı (Hervio-Heath ve diğ. 2002; Powell ve Lautit, 1990), ve bakteri türlerinin tanımlanabilmesi amacı ile morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulandı. (Esteve 1995). Bu testlere: Gram-boyanma, hareketlilik (asıllı damla yöntemi kullanılarak), sitokrom oksidaz ve katalaz üretimi, O/F testi, TCBS (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose) de gelişme ve

sukroz kullanımı, O/129 vibriostat testine hassasiyet (10 µg ve 150 µg), Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri, arjinin dihidrolaz, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri, farklı sıcaklık ve tuzluluk oranlarında gelişme, glukozdan asit ve gaz oluşturma, jelatinaz üretimi, onpg (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside), ureaz üretimi, indol üretimi, nitratı nitrite indirgeme, şekerlerin fermentasyonu (D-glukoz, L-arabinoz, D-mannoz, maltoz, sukroz, D-mannitol, laktoz, myo-inositol, D-galaktoz) dahildir (Tablo 1). Bakteri türlerinin tanımlanması *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'e göre gerçekleştirilmiştir (Amora ve diğ. 1995, Farmer ve diğ., 2005).

Tablo 1. Çalışmada İzole Edilen Bakteri İzolatlarının Fenotipik Özellikleri, İzolat1: *Vibrio fluvialis*, İzolat2: *Vibrio furnissii*, +: pozitif sonuç, -: negatif sonuç, z,T: zayıf pozitif, s: sarı renkli koloni oluşumu, F: fermentatif, VP: Voges-Proskauer, ADH: Arjinin dihidrolaz, LDK: Lizin dekarboksilaz, ODK: Ornitin dekarboksilaz.

Testler	İzolat 1	İzolat2
Gram boyanma	-	-
Hareketlilik	+	+
Sitokrom oksidaz	+	+
Katalaz	+	+
O/F	F	F
İndol üretimi	+	-
TCBS de gelişme	+,s	+,s
Vibriostat (10 µg)	H	H
Vibriostat (150 µg)	H	H
Metil kırmızısı	+	+
VP	-	-
ADH	+	+
LDK	-	-
ODK	-	-
Üreaz	-	-
Jelatinaz	+	+
Onpg	+	+
Simmon's sitrat	+	+
Glukozdan asit oluşumu	+	+
Glukozdan gaz oluşumu	-	+
Fermentasyon		
D-glukoz	+	+
L-arabinoz	-	+
D-mannoz	+	+
D-mannitol	+	+
Maltoz	+	+
Laktoz	+	-
D-galaktoz	+	+
Sukroz	+	+
myo-inositol	-	-
Nitratı nitrite indirgeme	+	+
Gelişme:		
%0 NaCl	-	-
%2 NaCl	+	+
%4 NaCl	+	+
%6 NaCl	+	+
%8 NaCl	+	+
%10 NaCl	z,+	z,+
Gelişme:		
4 °C	-	-
22 °C	+	+
30 °C	+	+
37 °C	+	+
40 °C	+	+



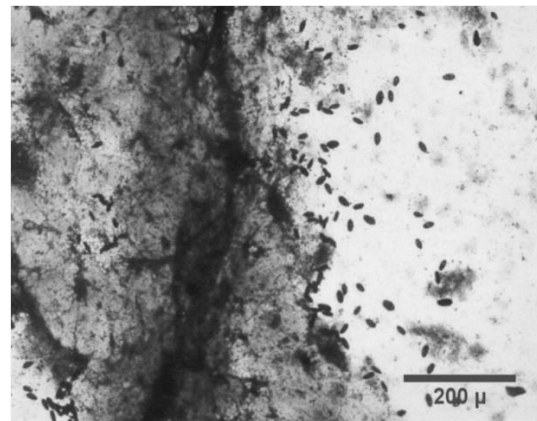
Şekil 1. Antalya Körfezi'nde örnekleme bölgesi

Bakteri suşlarının *Patella* sp. mucusuna yapışma deneyleri kaynaklarda açıklanan işlemlere göre gerçekleştirilmiştir (Connor 1986, Davies 1992).

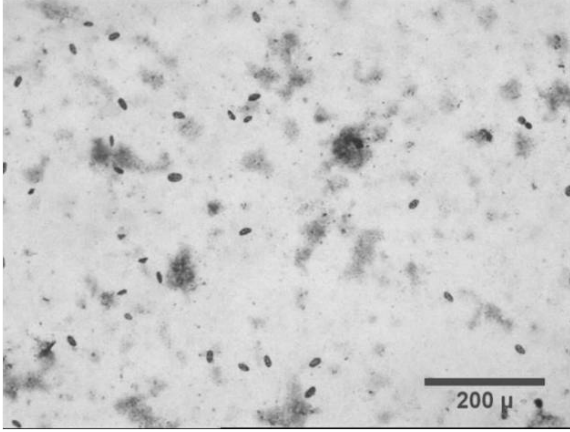
Mukuslu lamlar 20 dakika saf metil alkol ile tespit edilip farklı petrielerde bakteriyel süspansiyon örnekleri (% 0.85 NaCl fizyolojik su ile hazırlanan; 10 ml: McFarland No: 0.5) eklendi. Mukus içermeyen lamlar da benzer işlemlerden geçirilerek negatif kontroller olarak kullanıldı. Hafifçe çalkalanarak 2 saat inkübe edilen lamlar birkaç kez fizyolojik suda yıkanıp bir gece oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve tekrar 20 dakika saf metil alkolde tespit edildi. Krezil viola ile 1-2 dakika boyanan lamlar üç kez yıkanıp kurutulularak Olympus 31X ışık mikroskopunda incelendi. Bakteri sayımları karelere bölünmüş 1x1 mm² mikrometrik oküler yardımı ile her lamdan 10 alan rastgele seçilerek toplam 50 alanda gerçekleştirilmiştir. İstatistiki değerlendirmeler Minitab ve Excell programları ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Patella rustica ve *P. caerulea* örneklerinin toplandığı bölgeden alınan deniz suyundan *Vibrio fluvialis* ve *V. furnissii* türü bakteriler izole edilerek tanımlandı. İki *Patella* türünün lamlar üzerinde oluşturdukları mukus salgılarına, alt kültürleri oluşturulan *Vibrio fluvialis* ve *V. furnissii* türü bakterilerin yapışma durumlarının mukus yoğunluğuna göre farklılık gösterdiği izlendi (Şekil 2, 3). Bu nedenle rastgele seçilen elli adet 1 mm² alanda yapılan bakteri sayımlar Tablo 2'de gösterildi.



Şekil 2. *Vibrio* sp.'nin yoğun *Patella* sp. mucusunda yerleşim sıklığı

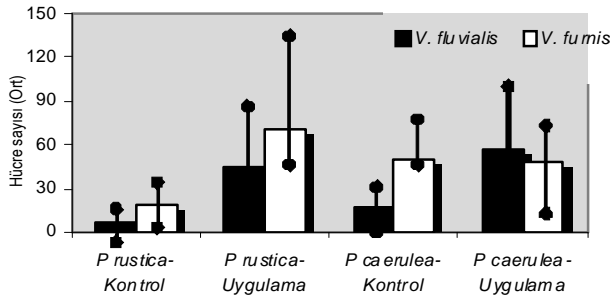


Şekil 3. *Vibrio* sp.'nin az yoğun *Patella* sp. mukusunda seyrek yerleşimi.

Tablo 2. Rastgele seçilen 50 adet 1mm² alanda yapılan bakteri sayımları.

Tür	İşlem	<i>Vibrio fluvialis</i> Ort± S. H.	<i>Vibrio furnissii</i> Ort± S. H.
<i>P. rustica</i>	Kontrol	6,21±0,632 ^b	19,65±0,951 ^b
	Uygulama	45,34±1,603 ^a	71,12±2,437 ^a
<i>P. caerulea</i>	Kontrol	16,79±1,499 ^b	50,64±1,402 ^b
	Uygulama	57,01±2,135 ^a	48,37±1,432 ^a

a: *Patella* sp. mukusunda yapışan bakterilerin ortalama sayıları, b: mukussuz lam üzerine bakterilerin yapışma durumu. (Ort± S.H. Ortalama Standart Hata, a,b harfleri ile gösterilen aynı türün aynı sütun içindeki ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir. $P \leq 0.05$).



Şekil 4. İki *Patella* türü mukusunda ve kontrol gruplarda bakteri sıklığı (Ort: Ortalama)

İki bakteri türünün mukuslu ve kontrol lamlarında dağılımı sayısal olarak incelendiğinde, *Patella* türlerinin mukuslarına ve kontrollere göre farklılıklar olduğu gözlemlendi ($P \leq 0.05$). *V. fluvialis* türünün, her iki tür *Patella*'nın mukuslarında kontrol lamlarındakinden önemli farkla yapışma ve hızlı üreme gösterdiği belirlendi. Ancak *P. caerulea*'nın oluşturduğu mukusu daha fazla tercih ettiği görüldü. *V. furnissii* türünün ise *P. rustica* mukusunu tercih ettiği, *P. caerulea* mukusundaki yapışma ve üreme tercihinin kontrol lamdakinden çok farklı olmadığı gözlemlendi. Her iki türün, mukussuz lamalarda çoğalma durumlarının daha düşük seviyelerde kaldığı, ancak *V. furnissii* türünde mukuslu ortamdakiler ile farkın daha az olduğu belirlendi (Tablo 1 ve Şekil 3).

Tartışma ve Sonuç

Patella gibi bazı gastropodlar yerleştikleri kayalar üzerindeki makroalgleri kazıyarak herbivor beslenme gösterir. Fakat *Patella* sp. ve diğer bazı gastropodların ayak bezlerinden salgılanan muköz maddelerin mikroalg ve makroalg tutunması ve gelişimi açısından önemi konusunda da birçok çalışma bulunmaktadır (Connor 1986; Peduzzi ve Herndl, 1991; Davies ve diğ. 1992; Holmes 2005). Oluşturduğu mukusun, besin olacak türlerin yapışıp gelişimini sağlaması o organizma açısından önemlidir. Bu zıt durumlar ortamın ekolojik özelliklerini belirler ve sürekli bir besin döngüsünün ortamda oluşmasını sağlar. Bu nedenle mukus oluşumları, mukusun biyokimyasal özellikleri ve organizmaların yerleşimi ve gelişimleri açısından önemleri sürekli ilgi odağıdır (Davies ve diğ. 1992, Smith ve diğ. 1999, Smith ve Morin 2002, Holmes 2005).

Doğal ortamda ve laboratuarda benzer uygulamalarla gerçekleştirilmiş bir çalışmada, doğal ortamın mukus etkinliğinde daha iyi olduğu açıklanmıştır (Connor 1986). Mukusun bakteri gelişimini önemli ölçüde arttırdığı çok az sayıdaki bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Seçilen *Vibrio* bakterisi, omurgalı ve omurgasızlarda enterik mikrobiota oluşturma yanında denizel ortamlarda saprofitik bakteri veya bakterioplankton özelliği ile tanınır (Kimbell ve Mcfall-Ngai 2003).

Balık deri mukusunun da çeşitli *Vibrio* türlerinin yapışıp koloni oluşturması açısından uygun bir ortam olduğu da gösterilmiştir (Krovacek ve diğ. 1987, Amaro ve diğ. 1995, Yan ve diğ. 2010). Ayrıca mukusta bakteri ve mikroalg gelişimleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuş, bu iki organizma grubunun mukustaki farklı kimyasal içeriklerden beslendikleri veya aynı kimyasalın önce bakteri, sonra da alg gelişimini sağladığı olasılıklarından söz edilmiştir (Connor 1986). Fakat karbon tanecikleri kullanılarak yapılan bir çalışmada bakteri gelişimi ile mukus filminin yerini mikrobiyal film aldığı, çünkü denizel bakterilerin çoğunun salgıladıkları ekstrasellüler mikopolisakkaritler ile organik bir film oluşturdukları ileri sürülmüştür (Corpe 1973). Bakterilerin, diatomlar gibi mikroalglerden daha kısa üreme döngüsüne girdikleri ve mukus filminin bakterilerce tüketilip mikrobiyal film olduğu düşülürse bakterilerin mikroalg gelişimini sağlattığı kabul edilmelidir. Çünkü bakteriyel enzimler mukusu parçalayarak mikroalglerin biyolojik aktiviteleri için uygun bir zemin ve besiyeri oluşmasını sağlar (Corpe 1973). Ayrıca bakterilerin oluşturduğu B-12 vitamini gibi maddeler mikroalglerin kullanımına hazır olur (Haines ve Guillard 1974). Sadece *Patella* gibi herbivor türler değil diğer bazı kamivor salyangozların mukuslarının da bakteri gelişiminde etkili oldukları belirlenmiş, örneğin *Planorbis contortus* L (Calow 1974) ve *Hydrobia ventrosa* L. (Kofoed 1975) mukuslarının bakteri yapışmasına neden oldukları gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmada, *Vibrio fluvialis* türünün, *Patella caerulea* ve *P. rustica* türlerinin mukuslarında yapışma ve üreme gösterdiği, *V. furnissii* türünün de özellikle *P. rustica* mukusunu tercih ettiği belirlenmiştir. Mukus tipi farklılığı bakterilerin seçiciliğini ortaya koyduğu gibi mukus oluşturan türlerin farklılığını da yansıtmakta ve sistematik açıdan

konunun önemini ortaya koymaktadır. Ancak bu çalışma bir ön izleme özelliği taşıdığı için izole edilen bakterileri suşlarının patojenik olup olmadıkları belirlenmemiştir. Beslenmesinde mukusa bağımlı olan organizmalarda mukusun bakteri, mikro ve makroalg gelişimini uyarması çok önemlidir. Ekolojide canlı

topluluklarının oluşumunda göz önünde bulundurulması gereken bir konudur. Çalışmanın ileri aşamasında doğrudan *Patella* mukusundan izole edilecek bakterilerin belirlenmesi ve üremelerinin takip edilmesi, mikro ve makro algler ile bakterilerin etkileşiminin izlenmesi planlanmıştır.

Kaynaklar

- Amaro C., E. G. Biosca, B.Fouz, E.Alcaide, and C.Esteve. 1995. Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype 2 infections to eels. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 61: 1133-1137.
- Calow P. 1974. Some observations on locomotory strategies and their metabolic effects in two species of freshwater gastropods. *Oceanoglia*, 16: 149-161.
- Connor V.M. 1986. The use of mucous trails by intertidal limpets to enhance food resources. *Biol. Bull.*, 171:548-564.
- Corpe W.A. 1973. Microfouling: the role of primary film forming marine bacteria. In: *Proc.3rd Int.Congress on Marine Corrosion and Fouling*. Ed: R. F. Acker, Northwestern Univ. Pres, Evanston.,pp.598-609.
- Davies M.S., S.J. Hawkins and H.D. Jones 1992. Pedal mucus and its influence on the microbial food supply of two intertidal gastropods, *Patella vulgata* L. and *Littorina littorea* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161: 57-77.
- Esteve C. 1995. Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brakish water. *Syst. of Appl. Microbiol.*, 18: 391-402.
- Farmer III, J. J., J.M. Janda, F.W. Brenner, D.N. Cameron, K. M. Birkhead., 2005. Genus I. *Vibrio* Pacini 1854. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Vol. Two, Eds. DJ, Brenner, NR Krieg, JT Staley, Springer.
- Haines K.C. and P.R.L. Guillard 1974. Growth of vitamin B-12 requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B-12 producing marine bacteria. *J. Phycol.* 10: 245-252.
- Hervio-Heath, D., R. R. Colwell A. Derrien, A. Robert-Pillot, J. M. Fournier, M. Pommepuy. 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *J. Appl. Microbiol.* 92: 1123-1135.
- Holmes S.P. 2005. The effect of *Patella vulgata* pedal mucus on the settlement and development or propagation of *Skeletonema costatum* and *Fucus spiralis*. *J.Moll.Stud.* 71: 53-57.
- Holmes S.P., A.Cherrill and M.S. Davies 2002. The surface characteristics of pedal mucus: a potential aid to the settlement of marine organisms. *J.Mar.Biol.Assoc. UK*, 82: 131-139.
- Hornak K., M. Masin, J. Jezbera, Y. Bettarel, J. Nedoma, T. Sime-Ngando, K. Šimek 2005. Effects of decreased resource availability, protozoan grazing and viral impact on a structure of bacterioplankton assemblage in a canyon-shaped reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 52, 315-327.
- Kimbell J. R. and M. J. Mcfall-Ngai 2003. The squid-Vibrio symbiosis: From Demes to Genes. *Integrated Comparative Biology*, 43:254-260.
- Kofoed L.H. 1975. The feeding biology of *Hydrobia ventrosa*. II. Allocation of the components of the carbon-budget and the significance of the secretion of dissolved organic materials. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 19:243-256.
- Krovacek K., A.Faris, W.Anne, I. Mansson, 1987. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* to fish cells and to mucus-coated glass slides. *FEMS Microbiology Letters*, 42: 85-89.
- NCIMB 1994. National Collections of Industrial and Marine Bacteria Catalogue, pp:266.
- Peduzzi P. and G.J. Herndl. 1991. Mucus trails in the rocky intertidal: a highly active microenvironment. *Mar. Ecol. Prog. Series*, 75: 267-274.
- Powell, J. L. and M. G. Lautit. 1990. Isolation and characterization of *Vibrio anguillarum* from selected marine sites in New Zealand. *New Zealand J. Mar. Freshwater Res.*, 24: 267-273.
- Smith A.M. 1992. Alteration between attachment mechanism by limpets in the field. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 160: 205-220.
- Smith A.M and Morin M.C. 2002. Biochemical differences between trail mucus and adhesive mucus from marsh periwinkle snails. *Biol. Bull.* 203: 338-346.
- Smith A.M., Quick T.J., St. Peter R.L. 1999. Differences in the composition of adhesive and non-adhesive mucus from the limpet *Lottia limatula*. *Biol. Bull.* 196: 34-44.
- Yan Q., M. Zhao, X. Wang, W. Zou and C. Chen. 2010. Adhesion mechanism of *Vibrio fluvialis* to skin mucus of *Epinephelus awoara*. *Chinese J. Oceanol. and Limnol.* 28: 260-266.