

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RİZE ŞEHİR SAHİLİNDE DENİZ SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ENTERİK  
BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Biyolog Feyza ÇOLAKOĞLU**

**ŞUBAT 2007  
TRABZON**

**KARDENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RİZE ŞEHİR SAHİLİNDE DENİZ SUYUNDAN İZOLE EDİLEN ENTERİK  
BAKTERİLERDE ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN KARAKTERİZASYONU**

**Biyolog Feyza ÇOLAKOĞLU**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde**

**“Yüksek Lisans (Biyoloji) “**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.01.2007**

**Tezin Savunma Tarihi : 16.02.2007**

**Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ**

**Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU**

**Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Celal Kurtuluş BURUK**

**Enstitü Müdürü : Prof.Dr. Emin Zeki BAŞKENT**

**Trabzon 2007**

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır. Çalışmada Rize şehir sahilinde deniz suyundan izole edilen enterik bakterilerde antibiyotik direncinin karakterizasyonu yapıldı.

Tez konumu belirleyen, yöneticiliğini ve danışmanlığını üstlenen, çalışmalarım esnasında bütün güçlüklerin aşılmasında beni yönlendiren ve cesaretlendiren, her türlü desteği ve imkanı sağlayan, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e teşekkür ve şükranlarımı sunarım. Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgisi ile daima yanımda olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her türlü desteği esirgemeyen, deneyim ve bilgileri ile yanımda olan Arş. Gör. Elif SEVİM ve Arş. Gör. Ali SEVİM'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmalarım sırasında bilgisi ve dostluğu ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Pınar ATASOY' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca öğrencisi olduğum KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi'nin değerli öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemde büyük emeği olan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan, sevgi ve ilgisini hiç esirgemeyen annem ve babam başta olmak üzere aileme teşekkür ederim.

Feyza ÇOLAKOĞLU

Trabzon 2007

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Deniz Kirliliği İle İlgili Mikrobiyolojik Standartlar.....	3
1.3. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları.....	4
1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	5
1.4.1. Antibiyotik Direncinin Mikroorganizmalardaki Orijini.....	6
1.4.1.1. Genetik Olmayan Orijin.....	6
1.4.1.2. Genetik Orijin.....	7
1.4.1.2.1. Kromozomal Direnç.....	7
1.4.1.2.2. Ekstrakromozomal Direnç.....	8
1.4.1.2.2.1. Plazmidler.....	8
1.4.1.2.2.2. Transpozonlar.....	9
1.4.1.2.2.3. İntegronlar.....	10
1.4.2. Enterik Bakterilerde Antibiyotik Direnci.....	11
1.5. Yapılan Çalışmalar.....	12
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. Materyal.....	15
2.1.1. Araştırma Alanının Tanımı.....	15
2.1.2. Bakterilerin İdentifikasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar.....	15
2.2. Metod.....	19
2.2.1. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonları.....	19

2.2.1.1.	IMViC Testleri.....	20
2.2.1.1.1.	İndol Üretme Testi .....	20
2.2.1.1.2.	Metil Kırmızısı (MR) Testi.....	20
2.2.1.1.3.	Voges-Proskauer (VP) Testi .....	20
2.2.1.1.4.	Sitrat Kullanma Testi.....	21
2.2.1.2.	Kligger Iron Agar (KIA) da Üreme Özelliği .....	21
2.2.1.3.	Üre Hidroliz Testi .....	22
2.2.1.4.	Hareket Testi.....	23
2.2.2.	Enterik Bakterilerin Antibiyotik Hassasiyet Testleri.....	23
2.2.3.	Konjugasyon ile Plazmid DNA Transferi.....	24
2.2.4.	Plazmid İzolasyonu ve Transformasyon.....	26
2.2.5.	PCR'lar İçin Kalıp DNA Hazırlanması .....	26
2.2.6.	TEM Tipi $\beta$ -laktamaz Geni (TEM-1) İçin Spesifik PCR.....	26
2.2.7.	Tetrasiklin Geni İçin Spesifik PCR.....	27
2.2.7.1.	<i>tetA</i> Geni İçin Spesifik PCR .....	27
2.2.7.2.	<i>tetB</i> Geni İçin Spesifik PCR .....	27
2.2.7.3.	<i>tetC</i> Geni İçin Spesifik PCR .....	27
2.2.8.	İntegron İçin Spesifik PCR .....	28
2.2.8.1.	Sınıf-1 İntegron İçin Spesifik PCR.....	28
2.2.8.2.	Sınıf-2 İntegron İçin Spesifik PCR.....	28
2.2.9.	Agaroz Jel Elektroforezi .....	29
2.2.10.	PCR Ürünlerinin Klonlanması.....	29
2.2.11.	PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi .....	30
3.	BULGULAR.....	31
3.1.	Enterik Bakterilerin İdentifikasyonu.....	31
3.2.	Enterik Bakterilerin Antibiyotiklere Gösterdikleri Hassasiyet Sonuçları..	31
3.3.	Dirençin Konjugatif Transferi.....	33
3.4.	Dirençin Transformasyon ile Transferi.....	34
3.5.	Ampisilin Dirençli Suşlarda TEM tipi $\beta$ -laktamaz Genlerinin PCR..... ile Belirlenmesi .....	34
3.6.	Tetrasiklin Dirençli Suşlarda <i>tetA</i> , <i>tetB</i> ve <i>tetC</i> Genlerinin PCR..... ile Belirlenmesi .....	34

3.7.	Ampisilin ve Tetrasiklin Dirençli Suşlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2.....	
	İntegronlarının PCR ile Belirlenmesi.....	35
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	36
5.	ÖNERİLER.....	38
6.	KAYNAKLAR .....	39
	ÖZGEÇMİŞ	

## ÖZET

Bu çalışmada, Rize şehir sahilinde deniz suyundan izole edilen enterik bakterilerde antibiyotik direncinin karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Kasım 2005-Ocak 2006 tarihleri arasında yürütülen bu çalışmada, Rize şehir sahilinde belirlenen dokuz istasyondan alınan 27 deniz suyu numunesinde toplam koliform bakteri miktarları belirlenmiş, izole edilen enterik bakterilerin IMViC testleri ile identifikasyonu yapılmış ve belirlenen antibiyotiklere karşı gösterdikleri dirençleri belirlenmiştir.

Rize'deki deniz suyundan alınan numunelerden izole edilen 45 tane enterik bakterilerinin 11 tanesi ampisilin antibiyotiğine, 7 tanesi tetrasiklin antibiyotiğine ve 6 tanesinin diğer test edilen antibiyotiklerden bazısına dirençli olduğu görülmüştür. Direnç gözlenen enterik bakterilerin direnç profilleri PCR analizi ile incelendiğinde TEM-1  $\beta$ -laktamaz, *tetB*, Sınıf 1 ve Sınıf 2 integron taşıdıkları görülmüştür.

Yapılan çalışmalar sonucunda, çevrede antibiyotik direncinin olduğu ve bu direncin bakteriler arasında yayılabildiği belirlenmiştir. Bu sonuç halk ve çevre sağlığı açısından önem teşkil etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik Direnci, Rize, Deniz Suyu, TEM-1  $\beta$ -laktamaz, *tetB*, Sınıf 1 integron, Sınıf 2 integron

## SUMMARY

### **Characterization of Antibiotic Resistance in Enteric Bacteria Which are Isolated from Sea Water in Rize City Coast**

In this study, it was aimed to characterize antibiotic resistance in enteric bacteria which are isolated from sea water in Rize city coast.

In the study, which is validated between the dates November 2005 to January 2006, amount of total coliform bacteria determined in 27 sea water examples which are taken from nine station that are determined in Rize city coast, isolated enteric bacteria are identified with IMViC tests and their resistance are determined against certain antibiotics.

That was seen, from 45 enteric bacteria which are isolated from Rize sea water examples are resistant to, 11 of them to ampicillin, 7 of them to tetracycline and 6 of them to other tested antibiotics. When resistance profiles of resistance seen enteric bacteria are investigated, it was seen that they were carrying TEM-1  $\beta$ -lactamase, *tetB*, Class 1 and Class 2 integron.

As a result of the study, that was determined, there is antibiotic resistance in the environment and this resistance can be spread between bacteria. This result is important for public and environment health.

**Key Words:** Antibiotic resistance, Rize, Sea Water, TEM-1  $\beta$ -lactamase, *tetB*, Class 1 integron, Class 2 integron



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. PCR Analizleri.....	35
------------------------------	----

## TABLULAR DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Antibiyotiklerin ana sınıfları ve örnekleri .....	5
Tablo 2. CLSI rehberinde <i>Enterobacteriaceae</i> için zon çapları yorumlama standartları ....	24
Tablo 3. TEM-1, <i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , sınıf 1 ve sınıf 2 integronların PCR analizinde kullanılan oligonükleotidler .....	29
Tablo 4. Enterik bakterilerin antibiyogramdaki inhibisyon zon çapları .....	32
Tablo 5. Dirençli bakteri türleri ve direnç profilleri .....	33

## SEMBOLLER DİZİNİ

AK	:Amikasin
Amp	:Ampisilin
C	:Kloramfenikol
CN	:Gentamisin
K	:Kanamisin
NA	:Nalidiksik asit
S	:Streptomisin
SMZ	:Sülfametoksazol
TE	:Tetrasiklin
TMP	:Trimetoprim

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Denizlerde fekal kirlenme; yerleşim bölgelerinde kanalizasyon sularının arıtılmadan yüzeysel sularla seyrelmeye ve doğal biyolojik arıtıma bırakılması ve yine kanalizasyon sularının denizlere boşalan dere sularına karışması sonucu oluşmaktadır. Doğal su kaynaklarının, atıkların bertarafı için bu şekilde kullanılması, doğal ekosistemi ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (1).

Kirletici maddeleri taşıyan sular, direkt kanalizasyon ya da dere suları vasıtasıyla denizlere ulaşmaktadır. Kanalizasyon suları boşaltım özellikleri bakımından zaman içerisinde rastgele ve periyodik debi değişimleri göstermekle beraber sürekli boşaltım yapan kirletici kaynaklardır. Sahil kesimleri, çok geniş bir alan üzerinde denize ve dere sularına akıtılan kanalizasyon ve kıyılardaki boşaltma kanalları nedeniyle kirlenmiş durumdadır. Kara ve kıyı bölgelerindeki suların mikrobiyolojik kirlenmesinin devamlı artması insan sağlığı açısından kötü sonuçlar doğurmaktadır (2,3,4). Kanalizasyon sistemlerinin yetersizliğinden dolayı tehlikeli mikroorganizmalar doğaya dağılır ve bazı patojen mikroorganizmalar içme suyu ve yiyecek maddelerine karışır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün raporuna göre, bugün hızlı bir nüfus artışıyla birlikte kirlenmiş suların yetersiz dezenfeksiyonu bulaşıcı hastalıkların oluşması için zemin hazırlamaktadır (5). Bu nedenle su kalitesi bakteriyolojik yönden kontrol edilmelidir. Suların kirlilik kontrolünde patojen bakteriler ayrı ayrı aranmaz. Patojenlerin yerine onların varlığını gösteren indikatör bakteriler olan koliform grubu bakteriler aranır. Koliform grubu bakteriler *Enterobacteriaceae* familyası üyesidirler dolayısıyla koliform bakterilere enterik bakteriler de denilmektedir (2,3,4). Enterik bakteriler, 35<sup>0</sup>C' de inkübe edildiğinde laktozu fermente edebilen ve 48 saat içerisinde gaz üreten aerobik ve fakültatif anaerobik, Gram-negatif, spor oluşturmeyen basilleri içerir (6). Koliformların tespiti oldukça kolay ve kesindir. Bu organizmalar insanların ve sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarında bulunurlar ve dışkı ile atık sulara karışırlar. Tasfiye edilmemiş kanal suları 100 ml' de 3 milyondan fazla sayıda koliform organizma içerir (2,3,4).

İndikatör organizmalar su ortamlarında belirli sürede canlılıklarını korur ve hatta çoğalabilirler. Ayrıca bakteriler yüzmek yerine katı maddelere tutunurlar. Bunların bazı

hastalıkların yayılmasında kaynak görevi gördüğü belirtilmektedir (7). Koliform bakterilerden enteropatojenik *Escherichia coli*, gastroenteridis ve üriner sistem enfeksiyonları; *Salmonella*, tifoid ateş ve gastroenteridis; *Shigella*, basilli dizanteri; *Klebsiella*, pnemoni; *Yersinia*, veba hastalıklarına neden olurlar (8). Yüzme sporu bakımından epidemiyolojik bulgular, kirli su alanlarında yüzme sporu riskinin yutulan sulardan veya fekal parçacıklardan kaynaklandığını göstermiştir (7,9). Tıbbi uygulama, ziraat ve hayvan bakıcılığı nedeniyle çevreye giren fazla miktardaki antimikrobiyal ajan bakteri popülasyonları üzerinde seçici bir baskı oluşturmaktadır (10,11). Bu durum insan hastalıklarında etken olan bakterilerin kontrolünde problemler yaratmaktadır. Virülans faktörlerin ve antibiyotik direnç genlerinin bu bakteriler tarafından kazanılması bakteriyal hastalıklarda dünya çapında artışa neden olmaktadır (12,13).

Bakteriler onlara karşı kullanılan antibiyotiklerin aktivitesini engellemek için çeşitli yollar geliştirirler. Bu koruma mekanizmalarını kodlayan genler bakteriyal kromozomlar veya ekstrakromozomal elemanlar üzerinde bulunurlar ve vertikal gen transferi vasıtasıyla gelecek nesillere aktarılırlar. Plazmidler gibi ekstrakromozomal elemanlar horizontal gen transferi veya konjugasyon denilen gen aktarım mekanizmaları vasıtasıyla farklı taksonomik gruplar arasında paylaşılırlar (14).

Mikroorganizmalar, yaygın antibiyotik kullanımının başlamasından bu yana, karşı karşıya kaldıkları antibiyotikleri tolere etme ve bu bileşiklere karşı direnç geliştirme yeteneklerinden sorumlu farklı mekanizmalar kazanmışlardır. Antimikrobiyal direnç halk sağlığı açısından dünyada büyüyen bir tehlike oluşturmaktadır (15).

Nehirler, kıyısız bölgeler, lağım suları, yüzey suları, sedimentler, göller, lağımla kontamine olmuş deniz suları ve içme suları gibi farklı su çevrelerinde antibiyotik direncine rastlanmıştır (16,17). *Escherichia coli* bu çevrelerde fazla miktarda bulunduğu için direnç genlerinin ve vektörlerinin yayılması için baskın bir araç olarak kabul edilmektedir (18).

Antibiyotik direnç genleri ile ilgili epidemiyolojik çalışmalara bilgi zemini hazırlayacağı ve kommensal, patojenik ve çevre bakterilerinde antibiyotik direnç genlerinin izlenmesinin antibiyotik direncinin ekolojisinin anlaşılması için gerekli olduğu düşüncesi yapılan bu çalışmada; Rize şehir sahilinde deniz suyundan izole edilen enterik bakterilerde antibiyotik direncinin karakterizasyonu yapılmıştır.

## 1.2. Deniz Kirliliği ile İlgili Mikrobiyolojik Standartlar

Avrupa Çevre Meclisi (EEC, 1976) Standartlarına göre, eğlence amacı ile kullanılan sularda toplam koliform miktarı 100 ml' de 500 CFU (koloni oluşturan birim), müsaade edilen maksimum sınır 10.000 CFU/100 ml' dir. Fekal koliform miktarı 100 CFU/100 ml, müsaade edilen maksimum sınır 2000 CFU/100 ml'dir. Bu standartlara göre, fekal streptokok miktarı 100 CFU/100 ml olmalı ve hiç *Salmonella* bulunmamalıdır (1).

United States Environmental Protection Agency (USEPA) Tatlısu Kalitesi Standartlarına göre, *E. coli* miktarı 126 CFU/100 ml olarak önerilmektedir. Deniz sularında 30 günlük sürede alınan 5 örnek için enterokok sayısı 35 CFU/100 ml olmalıdır. Yalnızca örneklerin bir tanesinde bu sayı 104 CFU/100 ml enterokok olabilir (19).

Florida Sağlık Örgütü deniz suyu kalite standardına göre, toplam koliform miktarı 1000 CFU/100 ml' dir. Yalnızca bir örnekte maksimum 2400 CFU/100 ml olabilir ve alınan örneklerin %80' inde toplam koliform miktarı 1000 CFU/100 ml' den fazla olamaz. Fekal koliform miktarı 200 CFU/100 ml ve yalnızca bir örnekte 800 CFU/100 ml olabilir. Örneklerin %90' unda fekal koliform sayısı 100 ml' de 400 CFU' dan az olmalıdır (20).

Ülkemizde ise iç sularda ve denizlerde kirlenmenin önlenmesi ve su ürünlerinin korunması amacı ile 1971 yılında "1380 Sayılı Su Ürünleri Kanun ve Tüzüğü" çıkarılmıştır. Kanun, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Su Ürünleri Genel Müdürlüğü' nce yürütülmeye çalışılmaktadır. Su Ürünleri Yönetmeliği' nde sulara boşaltılacak atıklar için deşarj kriterlerine göre, kabuklu kültürünün yapıldığı ve istihsal edildiği alanlardan alınan su örneklerinin (en az 5 örnek) fekal koliform miktarı 100 ml' de 10 EMS (en muhtemel sayı) olacaktır. Alınan örneklerin %20' sinde fekal koliform miktarı 100 EMS/100 ml' yi geçememelidir. Diğer su ürünleri istihsal yerlerinde ise fekal koliform miktarı 1000 EMS/100 ml' den fazla olamaz. Kabuklularda örneklerin en az %75' inde dokuda ve intravalvular (kabuklar arası) sıvıda bulunan miktarın 100 ml' de 300 EMS' dan az olmalıdır (2).

Çevre Bakanlığı Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği' nin, eğlence amacı ile kullanılan kıyı ve deniz sularında sağlanması gereken standart değerlere göre, toplam koliform miktarı 1000 EMS/100 ml ve fekal koliform miktarı 200 EMS/100 ml olmalıdır. Yönetmeliğin kıta içi su kaynaklarının sınıflarına göre kalite kriterlerine bakıldığında; fekal koliform 10 EMS/100 ml, toplam koliform 100 EMS/100 ml olan sular I. Sınıf; fekal koliform 200 EMS/100 ml, toplam koliform 20.000 EMS/100 ml olan sular II. Sınıf; 2.000

EMS/100 ml, toplam koliform 100.000 EMS/100 ml olan sular III. Sınıf ve fekal koliform 2.000 EMS/100 ml' den fazla, toplam koliform miktarı 100.000 EMS/100 ml' den fazla olan sular IV. Sınıf sular olarak bildirilmiştir (21).

### **1.3. Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları**

Antibiyotikler, mikroorganizmaları öldüren ya da büyümelerini inhibe eden, canlı organizmalar tarafından üretilen maddelerdir (22).

Antibiyotikler konak organizmanın hücrelerinin aksine daha çok patojenik mikroorganizmaları etkileyen seçici toksik maddelerdir. Seçici toksiklik ilacın spesifik etki mekanizmasına dayanmaktadır. En seçici ajanlar, yalnızca prokaryotik hücrelerde bulunan yapıları (örneğin; hücre duvarı) ya da fonksiyonları (örneğin; folik asit sentezi) etkileyenlerdir. Az seçici antibiyotikler ise hem prokaryotik (bakteri) hem de ökaryotik hücrelerde (konak) gerekli fonksiyonlar olan protein ya da nükleik asit sentezini etkileyenlerdir (22).

Antibiyotikler kimyasal yapılarına dayanılarak sınıflandırılırlar. Her bir antibiyotik sınıfı tipik bir çekirdek yapısıyla karakterize edilir ve sınıfın çeşitli üyeleri çekirdek yapısını ikincil kimyasal yapıların ilavesiyle ya da çıkarılmasıyla ayırt edilir (22).

Antibiyotikler aynı zamanda etkili oldukları bakteri türlerinin genişliğine bağlı olarak dar, orta ya da geniş spektrumlu olarak da sınıflandırılırlar. Dar spektrumlu antibiyotikler bakterilerin sınırlı bir grubu için etkilidirler. Örneğin, penisilin sadece Gram-pozitif bakterilere etkili iken, aminoglikozidler, sülfonamidler ve trimetoprim yalnızca aerobik bakterilere karşı etkilidir. Orta spektrumlu antibiyotikler genellikle bazı Gram-negatif bakterileri türlerine karşı azaltılmış aktiviteli maddeleri içerir (örneğin; ampisilin, amoksisilin, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler). Geniş spektrumlu antibiyotikler, üçüncü kuşak sefalosporinler, tetrasiklinler ve kinolonlar gibi hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkili olan maddeleri içerirler (22).

Antibiyotikler kimyasal yapılarına bağlı olarak, bakteriyal hücrenin fonksiyonu ya da farklı yapıları üzerine bir etki uygularlar. Esas etki mekanizmaları, hücre duvar sentezinin inhibisyonu (örneğin; penisilinler ve vankomisin), hücre membran fonksiyonunun bozulması (örneğin; polimiksinler), protein sentezinin inhibisyonu (örneğin; aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, linkozamidler ve makrolidler), nükleik asit

sentezinin inhibisyonu (örneğin; kinolonlar ve rifampisin) ve metabolik antagonizim (örneğin; sülfonamidler ve trimetoprim) (22).

Tablo 1. Antibiyotiklerin ana sınıfları ve örnekleri (22).

Hücre Duvar Sentezini İnhibe Edenler	$\beta$ -laktamlar	Glikopeptidler			
	Penisilinler	Vankomisin			
	Sefalosporinler	Avoparsin			
	Karbapenemler	Teikoplanin			
Protein Sentezini İnhibe Edenler	Aminoglikozidler	Tetrasiklinler	Makrolidler	Streptograminler	Kloramfenikol
	Streptomisin	Klortetrasiklin	Eritromisin	Virginiamisin	
	Neomisin	Oksitetrasiklin	Azitromisin	Quinupristin-Dalfopristin	
	Kanamisin		Klaritromisin	Pristinamisin	
	Gentamisin				
Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler	Kinolonlar	Sülfonamidler	Rifampisin		
	Siprofloksasin	Sülfamethoksazol-Trimetoprim			
	Norfloksasin				

#### 1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Mikroorganizmalar antibiyotikleri tolere edebilmek için antibiyotiklere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Bazı mikroorganizmalar, aktif antibiyotiği parçalayan enzim üretirler. Örneğin; Stafilokok penisilin G'ye onu parçalayan  $\beta$ -laktamaz ürettiği için dirençlidir. Gram-negatif bakteriler antibiyotiği parçalayan adenilleyici, fosforilleyici ya da asetilleyici enzimler ürettikleri için aminoglikozidlere dirençlidirler ve kloramfenikol asetiltransferaz enzimi üretirler ise kloramfenikole de dirençli olurlar (23).



Bazı mikroorganizmalar, antibiyotiğe karşı olan permeabilitelerini değiştirirler. Örneğin; tetrasiklinler duyarlı bakterinin içinde birikirken, dirençli olanda birikemez. Bazı aminoglikozidlere direnç, hücrenin aktif transportunu bozan dış membran değişikliğinden dolayıdır (23).

Bazı mikroorganizmalar, antibiyotik için değişik yapısal hedef geliştirirler. Örneğin; aminoglikozidlere kromozomal direnç duyarlı organizmada bağlanma bölgesi olarak iş gören bakteriyal ribozomun 30S altbirimindeki spesifik bir proteinin değiştirilmesi ya da kaybı ile ortaya çıkar. Eritromisine dirençli organizmalar, 23S ribozomal RNA' nın metilasyonu ile sonuçlanan, ribozomun 50S altbiriminde değişmiş bir reseptöre sahiptirler. Bazı penisilinlere ve sefalosporinlere direnç, penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) değiştirilmesi ya da kaybı ile meydana gelmektedir (23).

Bazı mikroorganizmalar, antibiyotik tarafından inhibe edilen reaksiyonu atlayarak değişik metabolik yol geliştirirler. Örneğin; bazı sülfonamid dirençli bakteriler ekstrasellüler *p*-aminobenzoik asite (PABA) gereksinim duymazlar, memeli hücreleri gibi öncül formik asitten yararlanırlar (23).

Mikroorganizmalar, metabolik fonksiyonunu hala yapabilen, fakat antibiyotikten, duyarlı organizmadaki enzimden daha az etkilenen değmiş bir enzim geliştirirler. Örneğin; trimetoprim dirençli bakterilerde, dihidrofolik asit redüktaz trimetoprim duyarlı bakterilerden daha etkin şekilde inhibe edilir (23).

#### **1.4.1. Antibiyotik Direncinin Mikroorganizmalardaki Orijini**

##### **1.4.1.1. Genetik Olmayan Orijin**

Mikroorganizmanın tür özelliği olarak, antibiyotiğin hedefi olan yapıyı taşıyamaması veya antibiyotiğin yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşamamasıdır (24). Örneğin; bir streptomyces kendi antibiyotiğine karşı dirençten sorumlu genlere sahiptir, Gram-negatif bakterilerin, bazının antibiyotiklere karşı permeabilite bariyeri oluşturan bir dış membranları vardır, bazı mikroorganizmaların belirli antibiyotikler için transport sistemleri yoktur ya da mikroorganizmaların antibiyotik için uygun hedefi olmayabilir (25).

Bakterinin aktif replikasyonu genellikle çoğu antibiyotik etkisi için gereklidir. Bundan dolayı metabolik olarak inaktif olan mikroorganizmalar antibiyotiklere fenotipik olarak dirençli olabilirler. Bununla birlikte, bu mikroorganizmaların jenerasyonları

tamamen duyarlıdır. Örneğin; mikobakteri infeksiyonu konağın savunma sistemi tarafından engellenmelerine ve çoğalamamalarına rağmen genellikle dokularda hayatta kalırlar. Bazı inatçı organizmalar tedaviye dirençlidirler ve antibiyotikler ile yok edilemezler (23).

Mikroorganizmalar, birkaç jenerasyon sonra bir antibiyotik için spesifik hedef yapıyı kaybedebilirler ve böylece dirençli olabilirler. Örneğin; penisilin duyarlı organizmalar penisiline maruz kaldıklarında hücre duvarı olmayan L-formlarına dönüşebilirler, hücre duvarları olmadığından hücre duvarı inhibitörü antibiyotiklere dirençli olurlar ve birkaç jenerasyon boyunca böyle kalabilirler. Bu organizmalar hücre duvar üretimine devam ederek bakteriyal öncüllerinin formuna döndüklerinde, yeniden penisiline duyarlı olurlar (23).

#### **1.4.1.2. Genetik Orijin**

Mikroorganizmaların genetik özelliklerindeki değişimlerden dolayı önceden duyarlı olduğu bir antibiyotikten etkilenmemesidir (24). Bu tip direnç bakteriyal genomdaki değişikliklerin sonucudur. Bu yolla bakteriler daha önceden duyarlı oldukları antibiyotiklere direnç kazanabilirler (25). Genetik orijinli direnç kromozom ve ekstrakromozomal elemanların kontrolü altındadır.

##### **1.4.1.2.1. Kromozomal Direnç**

Belirli bir antibiyotiğe duyarlılığı kontrol eden lokusta kendiliğinden mutasyonun bir sonucu olarak gelişir. Antibiyotiğin varlığı duyarlı organizmaları baskılamak için seçici mekanizma olarak iş görür ve antibiyotik dirençli mutantların büyümesini destekler. Kendiliğinden mutasyonlar  $10^{-7}$ - $10^{-12}$  frekans ile meydana gelirler ve buna göre belli bir hastada klinik antibiyotik direncinin görülmesinin nadir nedenlerinden biridir. Bununla birlikte, rifampisine dirençli kromozomal mutantlar yüksek frekansla ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$ ) görülür. Bu nedenle, bakteriyal infeksiyonun rifampisin ile tedavisi genellikle başarısız olur. Kromozomal mutantlar bir antibiyotiğin yapısal reseptöründeki değişiklik avantajı ile dirençlidirler. Yapısal proteinin gen kontrolündeki mutasyon streptomisine direnç ile sonuçlanır. Bakteriyal kromozomun dar bir bölgesi eritromisin, linkomisin ve aminoglikozidi içeren bazı antibiyotik reseptörlerini kodlayan yapısal genleri içerir.

Mutasyonlar, aynı zamanda bazı mutantları  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dirençli yapan PBP'lerin kaybı ile de sonuçlanabilir (23).

#### **1.4.1.2.2. Ekstrakromozomal Direnç**

Bakteriler, ekstrakromozomal elemanlar adı verilen plazmidler ve bu plazmidler ya da kromozomlar üzerinde bulunan, onlara yeni antibiyotik direnç genlerini kazandıran, hareketli genetik elemanlar olan transpozonlar ve integronlar ile antibiyotiklere ekstrakromozomal direnç göstermektedirler.

##### **1.4.1.2.2.1. Plazmidler**

Bakteri plazmidleri süper katlanmalara sahip oldukları için sıkı ve sağlam yapılı, dairesel DNA molekülleridir. Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak kendilerini replikasyon ile çoğaltabilirler. Kromozomdan farklı olarak plazmidler, genel olarak bakteriyal büyüme için gerekli fonksiyonları kodlamazlar, fakat antibiyotik direnci, ağır metal direnci, metabolik fonksiyonlar ya da virulans faktörlerinin, toksinlerin üretimi gibi belirli şartlar altında öneme sahip, konak hücrenin fizyolojisini etkileyen fonksiyonları ve kendi hayat siklusları için gerekli fonksiyonları kodlarlar (22).

Bazı plazmidler, üzerlerinde replikasyonları için gerekli olan replikasyon orijinini, kendilerini bir bakteriden bir başka bakteriye aktarmak için yaptıkları konjugasyonda gerekli olan ve transferlerinden sorumlu olan genler ile konjugasyonda transferin gerçekleştiği transfer orijinini bulundurlar. Plazmidler, transpozon ve integron adı verilen hareketli genetik elemanlar ile kazandıkları antibiyotik direnç genlerini de taşırlar (26).

Enterik bakterilerde görülen bazı plazmidler, bir ya da daha fazla antibiyotiğe ve ağır metale karşı direnç için genler taşıyan, direnç plazmidleri adı verilen R-plazmidleridir (26). R-plazmidleri, lağım, dere, içme ve deniz suyundan izole edilen çoğu Gram-negatif bakteride tanımlanmıştır ve bazı faktörlerin bu organizmaların suda hayatta kalmasını etkilediği savunulmuştur. Yüzey sularında dirençli bakterilerin artan frekansı, duyarlı bakterilere R-plazmidlerinin transferinin sonucudur. Bazı çevrelerde, R-plazmidlerinin yayılımı 1 dk.' dan daha kısa sürede meydana gelir ve direnç bakteriler arasında hızlıca yayılır. Böylece, bir mikroorganizma antibiyotik direncinin artan düzeyi ve geniş

spektrumuyla sonuçlanan farklı R-plazmidlerinin kombinasyonlarını ya da aynısının çeşitli kopyalarını taşıyabilir (27). R-plazmidleri ilk kez Japonya’ da, *Shigella*’ nın sebep olduğu dizanteride keşfedilmiştir. Bu plazmidlerin bağırsak florasındaki *Escherichia coli*’ ye ve diğer bakterilere transfer edildiği görülmüştür (26). Direnç plazmidleri, diğer duyarlı bakterilere genellikle transformasyon ve konjugasyon adı verilen gen aktarım mekanizmaları ile geçerek direnç gen paketini aktarır ve böylece direncin yayılmasına neden olur (28).

Antibiyotik direnç geni taşıyan plazmidler normal bağırsak florasının çoğu Gram-negatif bakterilerinde görülmektedir. Özellikle hastanede yatan hastalarda antibiyotiklerin bol miktarda kullanımı, bağırsak florasındaki antibiyotiğe duyarlı organizmaların baskılanmasını sağlar ve *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* gibi antibiyotik dirençli bakterilerin büyümesini ve devamlılığını kolaylaştırır. Hastanelerin kapalı ortamları, personel arasında bazı dirençli organizmaların yayılmasını kolaylaştırır (23).

#### 1.4.1.2.2.2. Transpozonlar

Direnç plazmidleri keşfedildiğinde, tek bir ekstrakromozomal elemanın bir çok antibiyotik direnç genini nasıl taşıdığı hakkında pek çok spekülasyon yapılmaktaydı. Bir plazmid üzerinde yalnızca bağımsız replikasyonu için genler bulunuyor ise eğer bu plazmid antibiyotik dirençli bir konakta bulunuyorsa, konağın kromozomundan direnç genlerini toplar. Kendini bir başka konağa aktarırsa, yeni konak için bu plazmidi kazanmak bir avantaj olur. Plazmid konak değiştirerek, daha fazla direnç geni toplar. Bu yüzden direnç plazmidlerinin çoğu orijinal bir plazmidten türemişler fakat, farklı kombinasyonlarda direnç genleri taşırlar (26).

Birbirine benzemeyen plazmidler aynı direnç genlerini, bağımsız olarak toplayabilirler. Bu durum bazı genlerin yaygın olduğunu göstermektedir. En dikkati çeken direnç geni, penisilinleri parçalayan TEM tipi  $\beta$ -laktamaz kodlayan genlerdir. Bu gen *Enterobacteriaceae* familyası üyesi bakterilerde, plazmidle taşınan, en sık rastlanan direnç genidir. TEM tipi  $\beta$ -laktamazların yaygınlığının sebebi bir plazmidten diğerine hareket edebilen, transpozon adı verilen hareketli genetik elemanların keşfedilmesiyle anlaşıldı (26). Transpozonlar bir DNA molekülünden diğerine (kromozomdan plazmide, plazmidten kromozoma) geçebilen DNA dizileridir. Plazmidten farklı, kendilerini

bağımsız olarak replikasyonla çoğaltamamalarıdır. Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin ve trimetoprim antibiyotiklerine karşı direnç gelişiminden sorumludurlar. Özellikle çok kısa süre içerisinde çoğul ilaç dirençli kökenlerin ortaya çıkıp yayılmasında transpozonların rolü vardır (28).

En basit transpozon olan Tn3 5000 baz çiftinden (bç) oluşur ve her bir ucunda kısa (38 bç) ters tekrar dizileri vardır. Tn3 transpozonu üzerinde, transpozonun transpozisyonundan (rekombinasyon ile gerçekleşir) sorumlu olan, transpozas olarak bilinen TnpA proteinini kodlayan, *tnpA* geni, represör olan ve aynı zamanda transpozisyonun resolüsyon olarak bilinen safhasında görevli, TnpR proteinini kodlayan, *tnpR* geni bulunur. Tn3 transpozonu üzerinde aynı zamanda, TEM tipi  $\beta$ -laktamaz kodlayan, ampisilin direnç geni olan *bla* geni vardır. Tn3 transpozonunun, transpozisyonu replikatiftir. Transpozisyon sonunda Tn3' ün hem verici hem de alıcı molekülde bir kopyası bulunur (26).

Bazı transpozisyon yapabilen elemanlar, Tn3' ten daha karmaşıktır. Kompozit transpozonlar olarak bilinen bu elemanlardaki direnç genlerinin etrafını iki kopya insersiyon dizisi (IS) elemanları sarar. Bu IS elemanları, plazmidler gibi bağımsız bulunmazlar fakat plazmid ya da kromozom gibi diğer DNA moleküllerinin bir parçası olarak bulunurlar. IS elemanlarının insersiyon ile girdikleri geni inaktive etmek dışında hücrenin fenotipik özelliğine herhangi bir etkileri yoktur. Örneğin; tetrasiklin direnç transpozonu olan Tn10, 9300 bç uzunluktadır ve ortasında tetrasiklin direnç geni ve bu genin iki yanına bağlı, karşı karşıya duran, transpozas geni içeren IS elemanları vardır. Tn10' daki IS elemanlarından biri defektiftir. Tn10 transpozonu üzerinde, genellikle enterik bakterilerde tetrasiklin antibiyotiğine direnç kodlayan *tetB* genini taşır. Tn10 transpozonunun, transpozisyonu non-replikatifdir. Tn10, verici molekülde kopyasını bırakmaksızın alıcı moleküle kendini transpoze eder (26).

#### 1.4.1.2.2.3. İntegronlar

İntegronlar 1980' lerin ortalarında keşfedilmiştir ve çeşitli enterik bakterilerde, antibiyotik direnç geni kodlayan genleri bölgeye spesifik rekombinasyon ile yakalama yeteneğine sahip hareketli DNA elemanlarıdır. İntegronlar tarafından yakalanan bu genlere gen kasetleri denir. Gen kasetleri küçük, serbest, halkasal, 59-baz elemanı (59-be) adı

verilen rekombinasyon bölgesi ve tek bir genden oluşan hareketli genetik elemanlardır. İntegronlarda, hiç bulunmadığı gibi 100 tane de gen kaseti bulunabilir (29).

İntegronlar üç farklı bileşenden oluşurlar. Birincisi, integras enzimini (IntI) kodlayan integras genidir (*intI*). IntI enzimi, integronun ikinci bileşeni olan rekombinasyon bölgesinde (*attI*) gen kasetlerinin bölgeye spesifik insersiyonundan ve eksizyonundan sorumludur. Üçüncü bileşen, *attI* bölgesine kaset girdiğinde kasete bağlı genlerin ekspresyonunu kolaylaştıran promotördür ( $P_{ant}$ ). İntegronda integras geninin promotörü olan bir başka promotör ( $P_{int}$ ) daha vardır (29).

*intI* gen dizisine göre tanımlanmış çeşitli integron sınıfları vardır. Bunların üç tanesi iyi karakterize edilmiştir. Sınıf 1 integronlar klinik izolatlarda yaygındırlar ve araya giren değişken bölgeyi çevreleyen iki tane korunmuş bölgeden (5'CS ve 3'CS) oluşmuştur. *attI* bölgesine integre olan değişken bölge antibiyotik direnci için gen kasetleri taşır. Gen kasetlerinin ekspresyonu  $P_{ant}$  promotörünün kontrolü altındadır. Sınıf 1 integronun 5'CS bölgesi, gen kasetlerinin bölgeye spesifik girişinden ve çıkışından sorumlu olan tip 1 integras proteini kodlayan *intI1* genini, *attI* ve  $P_{ant}$  promotörünü çerir. 3'CS bölgesi ise sülfonamidlere direnç oluşturan *sulI* genini, tersiyer amonyum bileşiklerine direnç oluşturan *qacEAI* genini ve fonksiyonu bilinmeyen bir gen içeren bir açık okuma çerçevesi içerir. Sınıf 2 integronların yapısı sınıf 1 integronlara benzemektedir ancak tek farkı tip 2 integras proteinini kodlayan *intI2* geninin 3'CS bölgesinde bulunmasıdır. Sınıf 3 integron *intI1* integrasına benzeyen *intI3* putatif integrasından dolayı farklılık gösterir (29). Sınıf 4 integron ise *Vibrio cholerae* genomunda lokalize olmuş ayırt edici bir integron sınıfıdır, antibiyotik direnci ile ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir (30). *V. cholerae* genomundaki diziler ile *Pseudomonas*' tan izole edilen karbapenisilinaz CARB-4 kodlayan antibiyotik direnç geni ile birlikte bulunan *blaP3* integronundaki 59- baz elementi arasında %90 oranında dizi benzerliği bulunmuştur, bu diziler integronlara olan benzerliklerinden dolayı sınıf 4 integron olarak kabul edilmektedirler (31).

#### 1.4.2. Enterik Bakterilerde Antibiyotik Direnci

Toplumdan izole edilen *E. coli* kökenlerinde ampisiline %30-60, kotrimoksazole %20-50 oranlarında direnç bildirilmekte, aminoglikozidler ve diğer antibiyotiklere de değişik direnç oranları rapor edilmektedir. Özellikle hastane enfeksiyonlarından soyutlanan *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Proteus* kökenlerinde de çoğul ilaç direnci

bildirilmektedir. *Klebsiella* kökenlerinde geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (GSBL) enzimlerine sık olarak rastlanmakta ve yeni doğan servisleri ile yoğun bakım ünitelerinde salgınlara neden olmaktadır (28).

Özellikle *Salmonella typhimurium* olmak üzere non-tifoid *Salmonella* suşlarında ampisiline, kloramfenikole, seftriaksona, tetrasikline, kotrimoksazole karşı direnç bildirilmektedir. Kinolon ve imipenem direnci bulunmamaktadır. Yapılan bir araştırmada, İstanbul’ da üç hastanede salgına neden olan ve tek klondan kaynaklanan çoğul ilaç dirençli ve PER-1 adı verilen GSBL enzimi salgılayan bir *S. typhimurium* salgını saptanmıştır (28).

Dünyanın her tarafında *Shigella* kökenlerinin yaklaşık yarısında çoğul ilaç direnci bildirilmektedir. Yapılan bir araştırmada, ampisilin, sulbaktam/ampisilin, kotrimoksazol, tetrasiklin ve kloramfenikol direncine rastlanmıştır. Kinolon ve imipenem direnci yoktur. İlk olarak, 1996 yılında kinolona dirençli sadece bir *Shigella* kökeni izole edilmiştir (28).

Seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı direnç gelişimi artan sayıdaki geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (GSBL)’ lara bağlıdır. *Enterobacteriaceae*’ de GSBL görülme sıklığı dünyada %74 olarak bildirilmektedir. Ülkemizde ise bu oran *E. coli*’ de %14.7, *Klebsiella*’ da %53.3’ tür (32).

*Enterobacteriaceae*’ de klinik izolatlarda karbapenem direnci nadirdir. İmipenemin yaygın kullanımına karşın direnç oranının %5’ in altında olduğu görülmektedir (32).

### 1.5. Yapılan Çalışmalar

Su çevrelerindeki fekal kirlenme; yerleşim alanlarındaki yoğun nüfus artışı, atıkların bilinçsizce bertarafı, yetersiz ve eksik kanalizasyon sistemleri gibi birçok faktörden dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Kanalizasyon atıkları artılmadan denizlere boşaltılmakta bu da doğal ekosistemi ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (1). Kanalizasyon atıkları yüksek oranda organik, inorganik maddeleri, patojen kommensal ve çevresel bakterileri içerir (33). Tıbbi uygulamalar, ziraat ve hayvan bakıcılığı nedeniyle çevreye giren antimikrobiyal ajanlar, bu patojen mikroorganizmalarla karşılaşılır (11,12). Antimikrobiyal maddelerin yoğun biçimde kullanımı antibiyotik direncinin gözlenmesinde ve gelişmesinde çok önemlidir. Non-patojenik çoğul ilaç dirençli bağırsak bakterileri muhtemelen antibiyotik direncinin en önemli kaynağıdır ve bu çoğul ilaç direnci hayvan orijinli bağırsak bakterilerinden insan bağırsaklarına kolonize olabilirler. Bakteriler bu

kolaylığı kendi kendilerine transfer olabilen plazmidler, konjugatif transpozonlar ve integronlarla horizontal gen transferi sayesinde kazanırlar. Bu mekanizmada doğada ve su çevrelerinde dirençli bakterilerin yayılımına neden olur (34). Deniz suyunun kontaminasyonu, antibiyotik direnç genleri ve bu genlerin konjugatif transferi üzerine yapılan pek çok çalışma vardır.

Niemi ve ark. (1983); deniz suyu, yüzey suları ve lağım sularındaki fekal kirlenmeyi ve kirlenmeye neden olan bakterilerdeki streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, ampisilin ve sülfonamidlere karşı dirençliliklerini incelemişlerdir. İzolatlar arasındaki dirençli suşların oranı kirlilik seviyesi ya da su kaynağına bağlı açık bir ilişki olmaksızın su örnekleri arasında önemli ölçüde farklılık bulmuşlardır. Çoğul direncin ortalama frekansı toplam direncin yüksek olduğu aynı örneklerde her zaman yüksek olmadığını rapor etmişlerdir. Türlerin içeriği farklı su örneklerinde yüksek derecede farklıdır. Su örneklerindeki ampisilin direncinin oranı ve *Klebsiella* türlerinin nispi frekansı arasında önemli bir ilişki gözlenmiştir. Direnç üzerine sucul çevre ve kaynaklarından etkilenen fekal koliformların tür içeriğinin önemi kaydedilmiştir (35).

Arvanitidou ve ark. (1997); Yunanistan' da yaptıkları bir çalışmada belli bölgelerdeki yüzey sularında 79 *Salmonella* suşu izole etmişler, bu suşların 20 farklı antibiyotiğe (ampisilin, apramisin, kloramfenikol, sefuroksim, sefalotin, siprofloksasin, kolistin, nitrofurantoin, gentamisin, kanamisin, nalidiksik asit, streptomisin, spektinomisin, sulfafarazol, tetrasiklin, tikarsilin, tobramisin, trimetoprim, amikasin ve amoksisilin klavulonik asit) karşı dirençliliklerini incelemişlerdir. İzole edilen suşların 19 (%24,1) tanesinin bir ya da daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduklarını saptamışlardır. Streptomisin direnci en yaygın direnç bulunurken, suşların tümü amoksisilin klavulonik asit, sefuroksim, siprofloksasin, amikasin ve apramisine hassas bulunmuşlardır. Dirençli suşların 5 (%26,3) tanesi alıcı *E. coli* suşuna direnç markıklarını transfer etmişlerdir. Transfer edilebilen direnç, ampisilin, tikarsilin, gentamisin, tobramisin, spektinomisin, kanamisin, tetrasiklin ve kloramfenikol olarak saptanmıştır. Bunun yanında streptomisin direncinin transfer edilemediği gösterilmiştir (27).

Kelch ve ark. (1978); körfez ve nehirlerden izole edilen Gram-negatif bakterilerinin kloramfenikol, streptomisin, ampisilin, tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin, neomisin, nitrofurazon, nalidiksik asit, kanamisin ve penisiline karşı dirençlilikleri araştırmışlardır. Körfezden izole edilen fekal koliformların, akarsulardan izole edilenlere göre daha fazla dirence sahip olduklarını bulmuşlardır. Farklı cinslerdeki Gram-negatif bakterilerin



antibiyotik dirençlerinin sıkı ilişkili olduğunu ve muhtemelen aynı çevreyi paylaşan bakterilerin antibiyotik direnci için aynı yolu paylaştıklarını göstermişlerdir (36).

Schwartz ve ark. (2003); hastane ve belediye atık su sistemleri, içme suyu ve yüzey suyunu; enterokok, stafilokok, heterotrofik ve Enterobacteriaceae bakterilerini indikadör organizma olarak kullanarak antibiyotik dirençli bakterileri ve onların direnç genlerini araştırmışlardır. Antibiyogram ile vankomisin dirençli enterokok belirlemişler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)' nu içeren moleküler biyoloji metodlarıyla *vanA* direnç genini belirlemişlerdir. *vanA* genini yalnızca atık su biyofilmlerinde değil aynı zamanda enterokok bulunmayan içmeye suyu biyofilmlerinde de bulmuşlardır, bu da içme suyu bakterilerine muhtemel gen transferini göstermiştir (37).

Boon ve ark. (1999); güney doğu Avustralya' da, Victoria' da nehirlerden, rezervuarlardan ve kanalizasyon arıtım tesisatlarından izole edilen doğal ve fekal bakterilerin antibiyotik direncini incelemişlerdir. Doğal heterotrofik bakterilerdeki, ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, nalidiksik asit, neomisin ve streptomisin direncinin sıklığının güney doğu Avustralya' da Yara Nehri boyunca belli bölgelerden izole edilen *Escherichia coli*' den fazla olduğunu göstermişlerdir. Doğal ve fekal bakteriler arasında tetrasiklin direncinin sıklığı bakımından önemli bir farklılık görememişlerdir. Her iki grup bakterinin de penisiline tamamen dirençli olduğunu görmüşlerdir. Yukarıdaki bölgelerden (kırsal) izole edilen *E. coli*' nin aşağıdaki bölgelerden (kentsel) izole edilenlerden daha az direnç sıklığı gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Bu bulgulardan, bakteriyolojik su kalite parametresi olarak antibiyotik direncinin kullanılabileceğini düşünmüşlerdir (89).

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Araştırma Alanının Tanımı

Çalışmada Rize ili sahilinde deniz suyundan Kasım 2000-Ağustos 2001 tarihleri arasında alınmış numunelerden izole edilen ve derin dondurucuda gliserol stokta saklanan enterik bakterilerin identifikasyonu yapılmış ve belirli antibiyotiklere karşı gösterdikleri dirençleri karakterize edilmeye çalışılmıştır.

#### 2.1.2. Bakterilerin İdentifikasyonu İçin Kullanılan Besiyerleri ve Ayıraçlar

##### İndol Test Besiyeri

Pepton	2 gr
Sodyum klorür (NaCl)	0.5 gr
Distile su	100 ml
Final pH	7.1

Pepton ve NaCl tartılıp 100 ml distile suda çözülür. Besiyeri tüplere 2 ml olacak şekilde dağıtılır, 1.1 atm basınçta, 121 °C' de, 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur ve kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

##### Kovaks Ayırıcı (İndol Ayırıcı)

Saf amil ya da izoamil alkol	150 ml
<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldehit	10 gr
Konsantre hidroklorik asit (HCl)	50 ml

İzoamil alkol ve *p*-Dimetilaminobenzaldehit konsantre HCl' de çözülür. Buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

**Luria Bertani (LB) Sıvı Besiyeri**

Tripton	% 1
Maya özütü	0.5 gr
NaCl	0.5 gr
Distile su	100 ml
Final pH	7.4

Tripton, maya özütü, NaCl tartılıp 100 ml distile suda çözülür. Besiyeri pH' sı konsantre sodyum hidroksit (NaOH) ile ayarlanır ve besiyeri tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılıp, 1.1 atm, 121 °C' de, 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur.

**Hareket Test Besiyeri**

Sığır eti özütü	3 gr
Pepton	10 gr
NaCl	5 gr
Agar	4 gr
Distile su	1000 ml
Final pH	7.3

Sığır eti özütü, pepton, NaCl, agar tartılıp 1000 ml distile su içerisinde 95 °C' de çözülür. Besiyeri tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılır ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur.

**Metil Kırmızısı (MR) Besiyeri**

Polipepton	7 gr
Glukoz	5 gr
Dipotasyumfosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5 gr
Distile su	1000 ml
Final pH	6.9

Polipepton, glukoz,  $K_2HPO_4$  tartılıp 1000 ml distile suda çözülür. Besiyeri tüplere 4 ml olacak şekilde dağıtılır ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur. Buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

Metil Kırmızısı (MR) Ayıracı

Metil kırmızısı	0.1 gr
% 95' lik etil alkol	300 ml
Distile su	200 ml

Metil kırmızısı tartılıp ve etil alkolde çözülür. Daha sonra üzerine 200 ml distile su ilave edilir ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

Voges-Proskauer (VP) Besiyeri

Voges-Proskauer (VP) besiyeri metil kırmızısı besiyerinin aynısıdır. Organizma metil kırmızısı besiyerine inoküle edilir ve inkübasyondan sonra temiz tüpe bu kültürden 1 ml alınıp VP ayıraçları ilave edilir.

Voges-Proskauer (VP) Ayıracı

Ayıraç: % 5  $\alpha$ -naftol, renk arttırıcı

$\alpha$ -naftol	5 gr
Etil alkol	100 ml

$\alpha$ -naftol tartılıp 100 ml etil alkol içerisinde çözülür ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

Ayıraç: % 40 potasyum hidroksit (KOH), oksitleyici

KOH	40 gr
Distile su	100 ml

KOH tartılıp 100 ml distile su içerisinde çözülür ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

#### Kligler Iron Agar (KIA) Besiyeri

Üretici firmanın (Merck, Almanya) önerileri doğrultusunda toz halindeki besiyerinden 52 gr tartılıp 1000 ml distile su içerisinde, 95 °C' de çözülür. Tüplere 6 ml olacak şekilde dağıtılır ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur. Buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

#### Sitrat Agar Besiyeri

Üretici firmanın (Merck, Almanya) önerileri doğrultusunda toz halindeki besiyerinden 22.5 gr tartılıp 1000 ml distile su içerisinde, 95 °C' de çözülür. Tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılır ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur. Buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

#### Üre Agar Besiyeri

Üretici firmanın (Merck, Almanya) önerileri doğrultusunda toz halindeki üre agar besiyerinden 21 gr tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözülür ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur. Otoklavlandıktan sonra 40-45 °C' ye soğutulan besiyerine ısı ile sterilizasyonda bozulduğu için filtre ile steril edilmiş % 40' lık üre solüsyonundan ilave edilir. Hazırlanan besiyeri önceden steril edilmiş petri plaklarına dökülür ve +4 °C' de muhafaza edilir.

#### Mueller Hinton Agar (MHA) Besiyeri

Üretici firmanın (Merck, Almanya) önerileri doğrultusunda toz halindeki besiyerinden 21 gr tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözülür ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur. Steril olan besiyeri önceden steril edilmiş petri plaklarına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülür ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

#### Eosine Methylene Blue (EMB) Agar Besiyeri

Üretici firmanın (Merck, Almanya) önerileri doğrultusunda toz halindeki besiyerinden 36 gr tartılıp 1000 ml distile su içerisinde çözülür ve 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur. Steril olan besiyeri önceden steril edilmiş petri

plaklarına her birinde 10-15 ml olacak şekilde dökülür ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

#### Minimal Medyum (5xM9 Medium)

Disodyumhidrojenfosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	% 3
Potasyumdihidrojenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	% 1.5
Amonyum klorür (NH <sub>4</sub> Cl)	% 0.5
NaCl	% 0.25
Distile su	100 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaCl tartılıp 100 ml distile su içerisinde çözülür, 1.1 atm, 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyona tabi tutulur ve oda sıcaklığında saklanır.

#### Minimal Agar

Minimal agar yapmak için (1 lt için) 800 ml distile suya 15 gr agar ilave edilip, otoklavda steril edilir. Agar karışımı 45-50 °C' ye soğutulur ve aynı sıcaklığa ayarlanmış 200 ml 5xM9 minimal medyum eklenir, iyice homojenize etmek için karıştırılır. Karbon kaynağı olarak % 0.2 (v/v) glukoz solüsyonu ilave edilir ve organizmanın oksotrof olduğu ve filtreye steril edilmiş amino asit solüsyonlarından 20 µg/ml olacak şekilde ilave edilir. Daha önceden steril edilmiş petri plaklarına dökülür ve buzdolabında +4 °C' de muhafaza edilir.

## 2.2. Metod

### 2.2.1. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonları

Kasım 2000-Ağustos 2001 tarihleri arasında deniz suyundan izole edilen ve derin dondurucuda saklanan suşların taze EMB agar besiyerine aseptik şartlar altında çizgi ekimleri yapıldı. İnkübatörde atmosferik ortamda, 37°C' de 18-24 saat üretilip, saflaştırıldıktan sonra indol üretme, metil kırmızısı (MR), Voges-Proskauer (VP), sitrat kullanma testi (IMViC), katalaz, oksidaz, üre hidroliz testi, hareket testi, Kligler Iron Agar (KIA) da üreme özellikleri belirlendi. Test sonuçları, *Bergey's Manual of Systematic*

*Bacteriology*' de (39) belirtilen biyokimyasal yöntemlere dayalı kriterlere göre değerlendirilerek, enterik bakterilerin tür identifikasyonları yapıldı.

### **2.2.1.1. IMViC Testleri**

#### **2.2.1.1.1. İndol Üretme Testi**

Testin amacı, triptofan aminoasitinden indol maddesinin üretildiğinin tesbitidir. İndol üretimi bakterinin triptofanaz enzimi ürettiğini göstermektedir. Triptofanaz enzimi pridoksal fosfat koenzimi varlığında triptofanı indol, pirüvik asit ve amonyağa deamine eder. Kovaks ayırıcı eklendiğinde aldehit ile kombine olup kültür yüzeyinde kırmızı renkli bir kompleks olarak birikir (40).

EMB agarda saf olarak üretilen testi yapılacak bakterilerden 1-2 koloni 2 ml indol buyyona ekildi ve atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edildi. Kültüre 0.5 ml Kovaks ayırıcı damlatıldı, yüzeyde kırmızı halka oluşanlar indol pozitif, renk oluşmayanlar ise indol negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış *Escherichia coli* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu kullanıldı.

#### **2.2.1.1.2. Metil Kırmızısı (MR) Testi**

Testin amacı, indikatör bir besiyerinde glukozun karışık asit fermentasyonu sonucu asidik bir pH değişikliğini göstermektir. *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler Embden-Meyerhof-Parnas biyokimyasal yolu ile glukozu pirüvik asite dönüştürür. Pirüvik asit metabolizması laktik, asetik, formik ve süksinik asit gibi karışık asitlerin oluşmasını sağlar. Ortam pH'sı yaklaşık 4,4' e düşer. Metil kırmızısı ayırıcı bu pH'da kırmızı renklidir (40).

Yarım ml MR-VP buyyona testi yapılacak bakteri ilave edildi ve atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edildi. Kültüre 2 damla metil kırmızısı damlatıldı. Ayırıcının rengi kırmızı kalınca pozitif, sarıya dönünce negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu kullanıldı.

### 2.2.1.1.3. Voges-Proskauer (VP) Testi

Testin amacı, butilen glikol fermentasyon yolu ile bakterilerin glukozu fermente ederek butilen glikol oluşumunun bir ara ürünü olan asetoin üretiminin belirlenmesidir. Asetoin üretim yolunu seçen organizmalar fazla miktarda butilen glikol, etanol, asetoin ve organik asitler gibi nötral ürünler üretirler. Atmosferik ortamda ve KOH varlığında asetoin maddesi kırmızı renkli diasetile oksitlenir,  $\alpha$ -naftol reaksiyonu hızlandırır (40).

Yarım ml MR-VP buyyona testi yapılacak bakteriden ilave edildi ve atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edildi. Kültüre 3 damla % 40' lık KOH damlatıldıktan sonra 6 damla  $\alpha$ -naftol solüsyonu damlatıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve havaya maruz kalmaları için kapakları açılarak 10-15 dk. beklendi. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu kullanıldı.

### 2.2.1.1.4. Sitrat Kullanma Testi

Testin amacı, bakterilerin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanma yeteneklerinin belirlenmesidir. Organizmalar sitratı hücre içine alan permeaz ve parçalayan enzim olan sitrat liyaza sahipse Simmon's sitrat agarda alkali bir reaksiyon oluşturur. Besiyerinde bulunan bromtimol mavisi ayracının yeşil rengi maviye döner (40).

Yatık olarak tüplerde katılaştırılmış olan yeşil renkli Simmon's sitrat agar (pH 7,0) yüzeyine testi yapılacak bakteri kolonisi öze yardımıyla yayılarak ekim yapıldı. Ağır inokülüm yanlış pozitif sonuç verebileceğinden dolayı az sayıda bakteri ekilmeye dikkat edilmeli. Tüp kapağı gevşek olarak kapatılıp atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edildi. Koyu prusya mavisi pozitif olarak, besiyerinin normal rengi olan yeşil renk değişmemiş ise negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp. suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu kullanıldı.



### 2.2.1.2. Kligler Iron Agar (KIA) da Üreme Özelliği

Testin amacı, genel olarak Gram negatif çomak bakterilerin, bu besiyerindeki karbohidrat fermentasyonunun şeklini, gaz üretilip üretilmediğini ve hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluşturup oluşturmadıklarının belirlenmesidir. KIA besiyeri, %1 laktoz ve % 0,1 glukoz gibi iki karbohidrat içerir. Bazı organizmalar KIA besiyerinde üredikleri zaman glukoz ve laktozun her ikisini veya sadece birini fermentasyona uğrattırır. Fermentasyon, aerobik (besiyerinin yüzeyi) veya anaerobik (besiyerinin dip kısmı) olarak gerçekleşebilir. KIA testinde üç farklı fermentasyon şekli belirlenebilir. Bunlar sadece glukoz fermentasyonu, glukoz ve laktoz fermentasyonu ve ne glukoz ne de laktoz fermentasyonunun olmasıdır. KIA testi iki çeşit gazın üretiminin tesbiti için de kullanılır. Bunlar karbohidrat metabolizmasının son ürünü olan CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S gazlarıdır. H<sub>2</sub>S renksiz bir gazdır. Bunu tesbit etmek için besiyerine indikatör olarak demir sülfat ilave edilmiştir. Aynı zamanda besiyeri içerisinde sülfat kaynağı olarak da sodyum tiyosülfat bulunur. Bazı bakteriler bu sülfattan H<sub>2</sub>S oluşumunu sağlar, oluşan H<sub>2</sub>S ortamda mevcut olan demir sülfat ile reaksiyona girerek siyah bir çökelek oluşturur. CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub> üretilirse besiyeri parçalanıp ayrılır ve agar içerisinde gaz kabarcıkları oluşur (40).

Aseptik şartlar altında, bakteri kolonisinden öze ile alınarak yatık olarak tüplerde katılaştırılmış olan soğan kabuğu rengindeki KIA besiyeri yüzeyine zig zaglar çizerek ve dip kısmına batırılarak ekim yapılır. Tüp kapağı gevşek olarak kapatılıp atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edilir. Yalnız dipte asit yani sarı renk, yatık yüzeyde kırmızı renk görünümü glukoz fermentasyonunu, hem dipte hem de yatık yüzeyde asit yani sarı renk görünümü glukoz ve laktoz fermentasyonunu, besiyerinin renginin değişmemesi ise fermentasyon olmadığını gösterir.

### 2.2.1.3. Üre Hidroliz Testi

Ürenin hidroliz edilip edilmediğini gösterir. Üreaz enzimine sahip *Enterobacteriaceae* üyesi bakteriler ortamdaki üreyi hidroliz ederek amonyak ve karbondioksit üretirler. Amonyak ortamın pH' sını alkalileştirirler. Besiyerindeki turuncu olan fenol kırmızısının rengi pembeye dönüşür (40).

Test için Christensen urea agar kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan besiyerine, sıcaklığa dayanmaması nedeniyle 0,45µm por açıklığına sahip

bakteriyolojik filtreden süzülerek steril edilen % 40' lık üre eklendi ve besiyeri steril petri plaklarına döküldü. Testi yapılacak organizma besiyerine ekildi, atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edildi. Besiyeri renginin pembe olması pozitif sonuç, değişmemesi negatif sonuç olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella pneumoniae* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu kullanıldı.

#### 2.2.1.4. Hareket Testi

Testin amacı, bakterilerin hareketli olup olmadığının yarı katı besiyerindeki üremelerine bakılarak belirlenmesidir.

İncelenecek bakterilerin saf kültürlerinden, iğne öze ile alınarak dik olarak hazırlanmış hareket besiyerine batırma ekim yöntemiyle ekimleri yapıldı. Kültürler atmosferik ortamda, 25°C' de 24-72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Yarı katı agar da ekim çizgisi boyunca yayılma şeklinde gözlenen üreme hareket pozitif olarak değerlendirildi. Sadece ekim çizgisinde gözlenen üreme hareket negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *K. pneumoniae* suşu kullanıldı.

#### 2.2.2. Enterik Bakterilerin Antibiyotik Hassasiyet Testleri

Antibiyotik hassasiyet testleri *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* (41) kriterlerine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve değerlendirildi.

Bu çalışmada  $\beta$ -laktam inhibitörü olarak, ampisilin (Amp, 10 $\mu$ g); aminoglikozid grubundan, amikasin (AK, 30 $\mu$ g), streptomisin (S, 10 $\mu$ g), kanamisin (K, 30 $\mu$ g), gentamisin (CN, 10 $\mu$ g); kinolon grubundan, nalidiksik asit (NA,30 $\mu$ g); sülfonamid grubundan, sülfametoksazol (SMZ, 100 $\mu$ g); tetrasiklin (TE, 30 $\mu$ g); kloramfenikol (C, 30 $\mu$ g); trimetoprim (TMP, 5 $\mu$ g) antibiyotik diskleri kullanıldı.

Derin dondurucuda saklanan suşlar disk difüzyon metodu ile antibiyotik hassasiyet testleri yapılmak üzere logaritmik üreme fazına kadar LB sıvı besiyerinde üretildiler ve steril distile su veya steril serum fizyolojik kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklık serisine uyacak şekilde sulandırıldı. Bu bulanıklık düzeyinde yaklaşık olarak  $1,5 \times 10^8$  bakteri/ml bakteri bulunduğu varsayıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan ve steril

cam petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller Hinton Agar (MHA) (pH 7,2-7,4) besiyerinin yüzeyi kurutuldu. Ucu pamuklu steril bir eküvyon çubuğu, bulanıklığı ayarlanmış kültüre batırılıp MHA besiyeri yüzeyine ekim yapılmadık yer bırakılmayacak şekilde yayıldı. Ekim yapıldıktan sonra besiyerinin yüzeyi tekrar kurutuldu. Dört derece sıcaklıkta saklanmakta olan antibiyotik diskleri alınarak agar yüzeyine temas edecek şekilde ve disk aralarında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirildi. Çapı 150 mm'lik plaklara en fazla 12 disk, 100 mm'lik plaklara en fazla 5 disk yerleştirildi. Disklerin yerleştirilmesinden 15 dk. sonra plaklar kapakları alta gelecek şekilde 35°C' ye ayarlanmış etüve koyuldu. Kültürler 16-18 saat atmosferik ortamda inkübe edildikten sonra değerlendirildi.

Çıplak göz ile değerlendirilerek tam inhibisyon zonunun gözle görüldüğü alanın çapı (disk çapı dahil) bir cetvel yardımıyla ölçüldü. İnhibisyon sınırı, çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edildi. Ölçülen zon çapları CLSI kitapçığındaki *Enterobacteriaceae* ile ilgili tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "hassas", "orta derecede hassas", veya "dirençli" olarak değerlendirildi. *Enterobacteriaceae* ile ilgili değerler Tablo 2'de gösterilmektedir. CLSI kriterlerine uyularak kullanılan MHA, antibiyotik disklerin kullanılabilirliğini ve yapılan deneyin geçerliliğini göstermek için kontrol bakteri olarak *E. coli* ATTC 25922 suşu kullanıldı. Ayrıca konjugasyonda alıcı hücre olarak kullanılan *E. coli* J53-2, kullanılan bütün antibiyotiklere hassas olduğu için ikinci bir kontrol suş olarak seçildi.

Tablo 2. CLSI rehberinde *Enterobacteriaceae* için zon çapları yorumlama standartları (41).

Antibiyotik İlaç	Disk İçeriği	Zon Çapı (Yaklaşık mm)		
		R (Dirençli)	I(Orta Hassas)	S (Hassas)
Ampisilin	10 µg	≤13	14-16	≥ 17
Tetrasiklin	30 µg	≤14	15-18	≥ 19
Kloramfenikol	30 µg	≤12	13-17	≥ 18
Nalidiksik asit	30 µg	≤13	14-18	≥ 19
Gentamisin	10 µg	≤12	13-14	≥ 15
Kanamisin	30 µg	≤13	14-17	≥ 18
Streptomisin	10 µg	≤11	12-14	≥ 15
Amikasin	30 µg	≤14	15-16	≥ 17
Trimetoprim	5 µg	≤10	11-15	≥ 16
Sulfametoksazol	100 µg	≤12	13-16	≥ 17

### 2.2.3. Konjugasyon ile Plazmid DNA Transferi

Plazmid transfer deneylerinde verici hücre olarak, kullanılan bütün antibiyotiklere dirençli enterik bakteri suşları; alıcı hücre olarak, *E. coli* K-12 J53-2 (Lac<sup>+</sup> met pro Rif<sup>r</sup>) suşu kullanıldı. Konjugasyon deneyleri Rice ve ark.'nın (42) tariflerini modifiye eden Özgümmüş'ün (43) kullandığı metod ile yapıldı. Konjugasyon için verici ve alıcı hücreler antibiyotik içermeyen 3 ml LB buyyona eşit miktarda inoküle edildiler. Çalkalayıcılı inkübatörde atmosferik ortamda, 37°C' de 18-24 saat atmosferik ortamda üretildiler. Verici ve alıcı hücreleri içeren kültürler eşit hacimde (1:1) karıştırıldıktan sonra atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat sallanmadan etüvde inkübe edildiler.

Transkonjugantların seleksiyonu için alıcı hücre *E. coli* K-12 J53-2' nin dirençli olduğu rifampisin (150µg/ml) ve verici hücrenin dirençli olduğu antibiyotiğin eklenmiş olduğu EMB agar yüzeyine konjugasyon karışımının 10<sup>-1</sup> dilüsyonundan 100 µl damlatıldı, steril cam baget yardımıyla agar yüzeyine iyice yayılarak ekildi, atmosferik ortamda, 35°C' de 18-24 saat inkübe edildi. Metalik yeşil röfleli koloniler fenotipik olarak transkonjugant olarak varsayıldı ve yukarıdaki antibiyotikleri içeren EMB agara pasajlandılar. Yine aynı fenotipte üreyen bakteri kolonilerinin aşağıda ifade edilen dört farklı içeriğe sahip selektif agarlara replika ekimleri yapıldı:

Agar 1: Alıcı hücre olan *E. coli* K-12 J53-2' nin oksotrof olduğu metionin ve prolin aminoasitlerinden yalnızca birini içeren minimal agar plağı.

Agar 2: 150µg/ml rifampisin ve verici hücrenin dirençli olduğu antibiyotiği içeren EMB agar plağı.

Agar 3: 150µg/ml rifampisin içeren EMB agar plağı.

Agar 4: Verici hücrenin dirençli olduğu antibiyotiği içeren EMB agar plağı.

Agar 1' de üremeyen, agar 2, 3, ve 4' te üreyen, fenotipik olarak metalik yeşil röfleli kolonilerin transkonjugant olduğuna karar verildi. Transkonjugantlardan plazmid DNA' ları izole edilerek plazmid transferi doğrulandı. Konjugasyon etkinliğinin hesap edilmesinde gereken canlı verici hücre sayısının bulunması için önceden 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> ve 10<sup>-7</sup> dilüsyonları yapılarak 100 µl' si LB agar yüzeyine damlatıldı ve steril cam baget yardımı ile iyice yayılarak ekildi. Üreyen bakteri kolonileri sayılarak bulunan değer, ekilen miktar (ml) ile sulandırım katsayısı çarpımına aşağıdaki formül kullanılarak oranlandı ve canlı bakteri sayısı belirlendi.

*Canlı Bakteri Sayısı (ml'de) = Agar Koloni Sayısı / Ekilen Miktar (ml) x Sulandırım Katsayısı*

Verici suşların konjugasyon etkinliğinin hesabı için ilk izolasyon plaklarındaki transkonjugant kolonileri sayıldı ve mililitredeki transkonjugant sayısı hesaplanarak verici hücre kültürlerinin mililitresindeki hücre sayısına, aşağıdaki formül kullanılarak oranlandı:

*Konjugasyon Etkinliği = Transkonjugant Sayısı (ml' de) / Verici Hücre Sayısı (ml' de)*

#### **2.2.4. Plazmid İzolasyonu ve Transformasyon**

Plazmid purifikasyon işlemleri alkali lizis yöntemi ile yapıldı (44). İzole edilen plazmidler soğuk CaCl<sub>2</sub> ortamında kompetan hale getirilen *E. coli* K-12 JM109 (*recA*<sup>-</sup>) hücrelerine ısı şoku ile veya elektroporator yardımıyla transform edildi. Transformasyon deneyleri non-konjugatif ya da mobilize edilebilir R-plazmid varlığının belirlenmesi için yapıldı. Transformasyon karışımı hem bakterilerin dirençli olduğu antibiyotikleri hem de orijinal suşun dirençli olduğu antibiyotiği içeren selektif LB agar plaklarına ayrı ayrı ekildi, dirence neden olan plazmidi taşıyan transformantlar seçildi. Elde edilen *E. coli* JM109 transformantları derin dondurucuda, %20 gliserollü ortamda stoklandı. Daha sonra transformantlardan tekrar plazmid izolasyonu yapıldı, orijinal suşun taşıdığı plazmidlerle agaroz jel elektroforezinde karşılaştırıldılar.

#### **2.2.5. PCR'lar İçin Kalıp DNA Hazırlanması**

Protokollerde tarif edildiği gibi (45), PCR için kullanılacak kalıp DNA izolasyonu için bakteri suşları seçici antibiyotiği içeren 3-4 ml LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve bir gece 37°C'de sallayıcı inkübatörde üretildi. Kültürün 200 µl'si 800 µl steril distile su ile karıştırdı. Hücreler 10 dk kaynatılarak lizise uğratıldı. Bu lizis karışımı, 13.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Süpernatant PCR'larda kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı.

### 2.2.6. TEM Tipi $\beta$ -laktamaz Geni (TEM-1) İçin Spesifik PCR

Standart PCR'lar 50  $\mu$ l hacimde yapıldı. Elli mikrolitre 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl, %1 Triton X-100), 30  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l 10X deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 5  $\mu$ l her bir primer stoku (25 pmol/ $\mu$ l), 378  $\mu$ l steril deiyonize su, 2 U *Taq* DNA polimeraz ve 2  $\mu$ l kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için siklüs şartları: 10 dk 94°C (başlangıç denatürasyonu), 2 dk 94°C (26 siklus), 30 sn 54°C (primerlerin bağlanması), 2 dk 72°C (ilk sentez) ve 7 dk 72°C (son sentez) (46).

TEM-1 geninin PCR' da kullanılan intragenik oligonükleotid primerleri Tablo 3' de gösterilmiştir (46).

### 2.2.7. Tetrasiklin Geni İçin Spesifik PCR

#### 2.2.7.1. *tetA* Geni İçin Spesifik PCR

Standart PCR'lar 50  $\mu$ l hacimde yapıldı. Elli mikrolitre 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl, %1 Triton X-100), 30  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l 10X deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 10  $\mu$ l her bir primer stoku (25 pmol/ $\mu$ l), 368  $\mu$ l steril deiyonize su, 2 U *Taq* DNA polimeraz ve 2  $\mu$ l kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için siklüs şartları: 5 dk 95°C (başlangıç denatürasyonu), 3 sn 95°C (23 siklus), 30 sn 62°C (primerlerin bağlanması), 45 sn 72°C (ilk sentez) ve 7 dk 72°C (son sentez) (47).

*tetA* geninin (917bp) PCR'da kullanılan oligonükleotid primerleri Tablo 3' de gösterilmiştir (48).

#### 2.2.7.2. *tetB* Geni İçin Spesifik PCR

Standart PCR'lar 50  $\mu$ l hacimde yapıldı. Elli mikrolitre 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl, %1 Triton X-100), 30  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l 10X deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 10  $\mu$ l her bir primer stoku (25 pmol/ $\mu$ l), 368  $\mu$ l steril deiyonize su, 2 U *Taq* DNA polimeraz ve 2  $\mu$ l kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için siklüs şartları: 5 dk

95°C (başlangıç denatürasyonu), 30 sn 95°C (25 siklus), 30 sn 57°C (primerlerin bağlanması), 20 sn 72°C (ilk sentez) ve 7 dk 72°C (son sentez) (47).

*tetB* geninin PCR'da kullanılan oligonükleotid primerleri Tablo 3' de gösterilmiştir (48).

### 2.2.7.3. *tetC* Geni İçin Spesifik PCR

Standart PCR'lar 50 µl hacimde yapıldı. Elli mikrolitre 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl, %1 Triton X-100), 30 µl MgCl<sub>2</sub>, 10 µl 10X deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 10 µl her bir primer stoku (25 pmol/µl), 368 µl steril deiyonize su, 2 U *Taq* DNA polimeraz ve 2 µl kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için siklus şartları: 5 dk 95°C (başlangıç denatürasyonu), 30 sn 95°C (25 siklus), 30 sn 57°C (primerlerin bağlanması), 20 sn 72°C (ilk sentez) ve 7 dk 72°C (son sentez) (47).

*tetC* geninin (569bp) PCR'da kullanılan oligonükleotid primerleri Tablo 3' de gösterilmiştir (48).

### 2.2.8. İntegron İçin Spesifik PCR

#### 2.2.8.1. Sınıf 1 İntegron İçin Spesifik PCR

Standart PCR'lar 50 µl hacimde yapıldı. Beş mikrolitre 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, %1 Triton X-100), 5 µl 10X deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2 µl her bir primer stoku (25 pmol/µl), 34 µl steril deiyonize su, 1 U *Taq* DNA polimeraz ve 1 µl kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için siklus şartları: 5 dk 96°C, 1 dk 55°C, 3 dk 70°C (bir siklus); 15 sn 96°C, 30 sn 55°C, 3 dk 70°C (24 siklus) ve son sentez 5 dk 70°C (bir siklus) (49).

Sınıf 1 integronun PCR' da kullanılan korunmuş bölge primerleri Tablo3' de gösterilmiştir (45).

### 2.2.8.2. Sınıf 2 İntegron İçin Spesifik PCR

Standart PCR'lar 50 µl hacimde yapıldı. Beş mikrolitre 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, %1 Triton X-100), 5 µl 10X deoksinükleotid trifosfat karışımı (her biri 2 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP), 2 µl her bir primer stoku (25 pmol/µl), 34 µl steril deiyonize su, 1 U *Taq* DNA polimeraz ve 1 µl kalıp DNA olarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Amplifikasyon için siklus şartları: 5 dk 96°C, 1 dk 55°C, 3 dk 70°C (bir siklus); 15 sn 96°C, 30 sn 55°C, 3 dk 70°C (24 siklus) ve son sentez 5 dk 70°C (bir siklus) (50).

Sınıf 2 integronun PCR' da kullanılan korunmuş bölge primerleri Tablo 3' de gösterilmiştir (51).

Tablo 3. TEM-1, *tetA*, *tetB*, *tetC*, sınıf 1 ve sınıf 2 integronların PCR analizinde kullanılan oligonükleotidler

Gen	Primer	Nükleotid Dizisi	Referans
TEM-1	OT-1	5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTTA-3'	Arlet ve ark. (46)
	OT-2	5'-TAATTGTTGCCGGGAAGCTA-3'	Arlet ve ark. (46)
<i>tetA</i>	Primer-1	5'-GTAATTCTGAGCACTGTCGC-3'	Aarestrup ve ark. (48)
	Primer-2	5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	Aarestrup ve ark. (48)
<i>tetB</i>	Primer-1	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3'	Aarestrup ve ark. (48)
	Primer-2	5'-ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	Aarestrup ve ark. (48)
<i>tetC</i>	Primer-1	5'-GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC-3'	Aarestrup ve ark. (48)
	Primer-2	5'-CCTCTTGCGGGAATCGTCC-3'	Aarestrup ve ark. (48)
Sınıf 1 İntegron	5'-CS	5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3'	Levesque ve ark. (45)
	3'-CS	5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	Levesque ve ark. (45)
Sınıf 2 İntegron	hep 51	5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3'	White ve ark. (51)
	hep 74	5'-CGGGATCCCGGACGGATGCACGAT TTGTA-3'	White ve ark. (51)

### 2.2.9. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Agaroz jel elektrofrezisi protokollerde tarif edilen yöntemler kullanılarak yapıldı (44). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünleri için %1-2 yoğunlukta olacak şekilde



agaroz jel hazırlandı. Yaklaşık 45-55°C soğuması sağlandıktan sonra jele 0,5 µg/ml etidyum bromür (EtBr) ilave edildi. Plazmid DNA örneklerinden 10 µl alınarak yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi ve 120 Volt doğru akımda yürütüldü. Ultraviyole ışığı altında plazmid DNA bantları gözlemlendi.

### 2.2.10. PCR Ürünlerinin Klonlanması

TEM-tipi β-laktamaz tam geni OT-3 (5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3') ve OT-4 (5'-CAATGCTTAATCAGTGAGG-3') primerleri kullanılarak çoğaltıldı (52).

Tam genlerin çoğaltıldığı PCR ürünleri, pGEM-T klonlama vektörüne üretici firmanın (Promega, USA) önerileri doğrultusunda ligasyonu sağlandı ve *E. coli* K-12 JM 101 (*recA*<sup>+</sup>) kompetan hücrelerine elektroporatör ile transform edildi. Transformasyon sonrası hücreler, ampisilin, IPTG (Isopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid) ve X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) içeren seçici LB agar ekilerek mavi/beyaz koloni oluşumuna bakıldı ve beyaz kolonilerden plazmid izole edilerek pozitif klonlar belirlendi (44). İzole edilen bu plazmidler *Eco* RI restriksiyon enzimi ile kesilerek ayrıca doğrulandı. Pozitif olduğu doğrulanan plazmidleri içeren rekombinant hücreler tekrar büyütüldü plazmid DNA purifikasyon kiti (Promega, USA) kullanıldı DNA dizi analizi için tekrar izole edildi.

### 2.2.11. PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi

PCR ürünlerinin dizi analizi için, bu ürünleri içeren rekombinant plazmidler *Macrogen* (Kore) firmasına gönderildi universal primerler yardımı ile dizi analizi yapıldı.

Elde edilen dizi analizi, genlere ait daha önce tanımlanan dizi analizi verileri ile karşılaştırılarak benzerlik oranları belirlendi. Bu amaçla, *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) web sitesinde kullanıma bedava olan BLAST araştırma programı içindeki ileri QBLAST sistemi, *European Bioinformatics Institute* web sitesindeki CLUSTALW, *University of British Columbia Bioinformatics Centre* web sitesindeki CLUSTALX, gibi programlardan yararlandı. Bu sayede denizlerdeki *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilerin direnç genlerinin profili, yapısı ve genetik haritası çıkarıldı.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmada Rize şehir sahilinde, Kasım 2000-Ağustos 2001 tarihleri arasında alınmış olan deniz suyu örneklerinden yine bu tarihlerde izole edilen ve derin dondurucuda stoklanan enterik bakterilerin identifikasyonu yapılmıştır ve 10 tane farklı antibiyotiğe karşı göstermiş oldukları antibiyotik dirençleri karakterize edilmiştir.

#### 3.1. Enterik Bakterilerin İdentifikasyonu

Enterik bakterilerin identifikasyonu için, IMViC testleri kullanılmıştır. Tür identifikasyonları *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*' de (39) belirtilen biyokimyasal yöntemlere dayalı kriterlere göre değerlendirildi.

Yapılan değerlendirmelere göre toplam 52 adet bakterinin 39 tanesi *Escherichia coli*, 2 tanesi *Enterobacter cloacae*, 1 tanesi *Citrobacter diversus*, 1 tanesi *Citrobacter koserii*, 1 tanesi *Klebsiella pneumoniae*, 7 tanesi non-fermentatif Gram-negatif bakteri ve 1 tanesi ise IMViC testlerine göre tiplendirilememiştir.

#### 3.2. Enterik Bakterilerin Antibiyotiklere Gösterdikleri Hassasiyet Sonuçları

İdentifikasyonu yapılmış *Enterobacteriaceae* familyasına ait 45 adet bakterinin 10 farklı antibiyotiğe karşı gösterdikleri hassasiyetleri disk difüzyon metodu kullanılarak belirlenmiştir. Enterik bakterilere karşı, kullanılan antibiyotiklerin oluşturdukları inhibisyon zon çapları Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. Enterik bakterilerin antibiyogramdaki inhibisyon zon çapları

Bakteri No	AMP mm	TE mm	C mm	NA mm	CN mm	K mm	S mm	AK mm	TMP mm	SMZ mm
D1	13	26	30	22	21	24	17	26	30	24
D2	22	24	26	25	21	22	16	25	25	17
D3	0	0	25	24	20	21	17	22	23	16
D4	22	23	26	25	20	20	16	23	27	15
D5	22	24	25	28	20	23	19	26	24	14
D6	23	23	26	26	19	21	17	22	27	22
D7	19	22	25	24	20	21	16	23	23	16

Tablo 4' ün devamı

D8	0	0	0	24	19	20	15	22	22	0
D9	0	0	0	24	19	20	15	23	24	0
D10	21	23	28	25	20	22	16	24	26	20
D11	13	21	27	25	20	21	17	23	24	14
D12	12	24	27	26	22	24	18	26	28	21
D13	0	0	24	24	18	20	14	23	25	18
D14	23	23	24	25	19	20	16	22	24	19
D15	22	22	24	27	19	21	18	24	26	21
D16	22	21	24	23	19	21	19	22	23	18
D17	20	20	25	24	19	20	16	22	22	16
D18	21	26	30	26	21	22	19	24	29	22
D19	21	0	23	29	19	22	16	24	24	17
D20	0	0	27	26	21	23	8	24	0	0
D21	17	24	26	26	21	21	16	23	25	16
D22	23	25	26	26	20	23	17	26	30	21
D23	27	28	24	0	24	26	21	30	31	25
D24	20	21	23	26	18	18	14	20	26	20
D25	21	24	25	25	18	20	15	21	25	16
D26	0	25	25	23	20	22	17	23	21	13
D27	24	25	27	27	23	25	17	28	28	22
D28	23	25	25	28	18	21	16	24	27	18
D29	23	25	30	32	23	25	21	26	26	16
D30	22	26	25	26	20	22	18	24	26	19
D31	21	24	24	26	18	22	16	22	28	20
D32	23	23	24	27	18	20	16	21	23	16
D33	21	22	23	24	18	20	16	22	25	16
D34	20	22	24	26	17	18	15	21	21	10
D35	17	22	22	22	19	22	16	24	25	15
D36	22	23	24	25	19	21	17	24	24	17
D37	0	19	23	25	20	22	18	22	25	21
D38	10	26	27	25	20	22	19	24	30	23
D39	21	22	26	26	20	24	16	25	21	14
D40	25	24	25	27	19	23	19	25	27	17
D41	22	24	26	29	19	19	16	21	24	12
D42	23	22	26	25	18	19	15	21	25	16
D43	19	0	25	24	20	20	11	23	22	14
D44	20	20	22	22	20	21	15	22	22	15
D45	20	23	24	25	20	22	16	24	25	16

AMP: Ampisilin, TE: Tetrasiklin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, S: Streptomisin, AK: Amikasin, TMP: Trimetoprim, SMZ: Sülfametoksazol.

Okunan inhibisyon zonu sonuçlarına göre 45 tane bakteriden 14 tanesinin test edilen antibiyotiklerden en az birine dirençli olduğu görüldü.

Tablo 5. Dirençli bakteri türleri ve direnç profilleri

Bakteri No	Bakteri Türü	Direnç Profili
D1	<i>E. coli</i>	AMP
D3	<i>E. coli</i>	AMP, TE
D7	<i>E. coli</i>	AMP, TE, C, SMZ
D8	<i>E. coli</i>	AMP, TE, C, SMZ
D11	<i>C. diversus</i>	AMP
D12	<i>E. coli</i>	AMP
D13	<i>E. coli</i>	AMP, TE, S
D19	<i>E. coli</i>	TE
D20	<i>E. coli</i>	AMP, TE, K, TMP, SMZ
D23	Tiplendirilemedi	NA
D26	<i>K. pneumoniae</i>	AMP
D37	<i>E. cloacae</i>	AMP
D38	<i>C. koserii</i>	AMP
D43	<i>E. coli</i>	TE, AK

AMP: Ampisilin, TE: Tetrasiklin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, K: Kanamisin, S: Streptomisin, AK: Amikasin, TMP: Trimetoprim, SMZ: Sülfametoksazol.

### 3.3. Direncin Konjugatif Transferi

Antibiyotiklere dirençli olduğu gözlenen 14 enterik bakteri suşunun direnç genlerinin aktarılabilirliği konjugasyon deneyi ile araştırıldı. Deney sonuçlarına göre, sadece D1 ve D12 numaralı enterik bakterilerde, ampisilin antibiyotiği konjugasyonunda pozitif sonuç gözlenirken, diğer enterik bakterilerde konjugasyon deneylerinde pozitif sonuç gözlenmemiştir.

Sınıf 1 integronun belirlendiği D8 numaralı suş ile Sınıf 2 integronun belirlendiği D20 numaralı suşlarda konjugasyon deneyinin pozitif sonuç vermemesi bu integronların kromozomal kökenli olduğunu göstermektedir.

### 3.4. Direncin Transformasyon ile Transferi

Antibiyotiklere dirençli olan 14 enterik bakteri suşunun direnç genlerinin aktarılabilişliği transformasyon deneyi ile araştırıldı. Bu deney sonucuna göre, D3 ve D13 numaralı enterik bakterilerin tetrasiklin antibiyotiği transformasyonu pozitif sonuç verirken, diğer enterik bakterilerde pozitif sonuç gözlenmemiştir.

### 3.5. Ampisilin Dirençli Suşlarda TEM tipi $\beta$ -laktamaz Genlerinin PCR ve Dizi Analizi ile Belirlenmesi

Ampisilin dirençli görülen 11 enterik bakteri suşunda Tablo 3' de belirtilen primerler ile PCR analizi yapıldı ve yalnızca D3 numaralı enterik bakteride  $\beta$ -laktamaz geni belirlenmiştir.

Yapılan dizi analizi ile bu genin TEM tipi  $\beta$ -laktamaz geni olduğu belirlenmiştir.

TEM-1 tam geninin (569bp) PCR ürünleri % 1,5' luk agaroz jel hazırlanarak elektroforeze tabi tutuldu ve jel fotoğraflandı (Şekil.1).

### 3.6. Tetrasiklin Dirençli Suşlarda *tetA*, *tetB* ve *tetC* Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

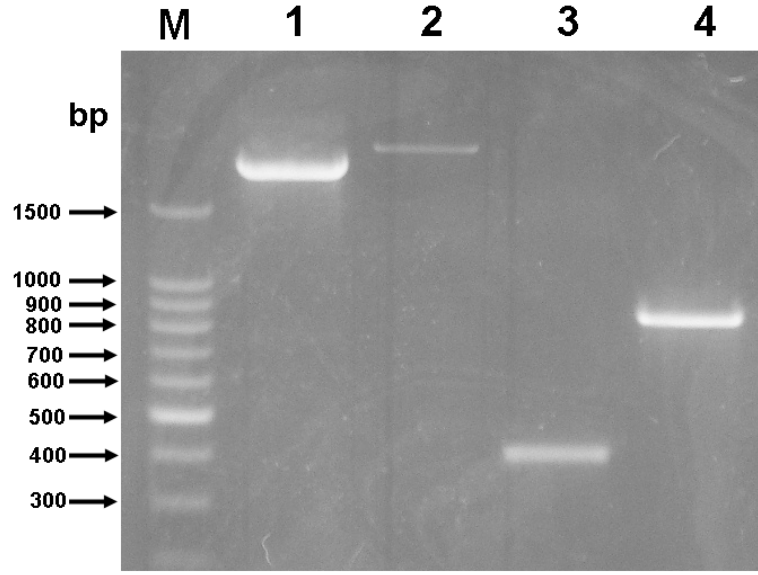
Tetrasikline dirençli 7 enterik bakteri suşunda Tablo 3' de belirtilen primerler kullanılarak *tetA*, *tetB* ve *tetC* genlerinin PCR analizi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Analiz sonucunda bu 7 enterik bakteri suşunda yalnızca *tetB* geni belirlendi.

*tetB* geninin (375bp) PCR ürünleri % 1,5' luk agaroz jel hazırlanarak elektroforeze tabi tutuldu ve jel fotoğraflandı (Şekil.1).

### 3.7. Ampisilin ve Tetrasiklin Dirençli Suşlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronlarının PCR ile Belirlenmesi

Ampisilin ve tetrasikline dirençli görülen 13 enterik bakteri suşunda Tablo 3' de belirtilen primerler ile PCR analizi yapıldı, yalnızca D8 numaralı enterik bakteride Sınıf 1 integron ve yalnızca D20 numaralı enterik bakteride Sınıf 2 integron belirlenmiştir.

Sınıf 1 ve Sınıf 2 integronun PCR ürünleri % 1,5' luk agaroz jel hazırlanarak elektroforeze tabi tutuldu ve jel fotoğraflandı (Şekil.1).



Şekil 1. PCR analizleri. **M**, 100bp DNA Ladder (Promega, ABD); **1**, Sınıf 1 integron (*E. coli* D8); **2**, Sınıf 2 integron (*E. coli* D20); **3**, *tet(B)* ampikon (*E. coli* D7); **4**, *bla*<sub>TEM-1</sub> ampikon (*E. coli* D3)

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Kanalizasyon suları, besin maddeleri ve mikroorganizmalar bakımından zengindir dolayısıyla deniz ortamına boşaltıldıkları zaman fekal kirlenmeye sebep olarak doğal ekosistemi bozarlar. Yoğun yerleşim bölgelerinde bu kirlilik fazladır ve insanların denizlerden faydalanabilirliğini azaltır. Kanalizasyonlar ile denizlere ulaşan patojenler; insanlara yüzme, dalma ve benzeri sportif amaçlar için denizler kullanılırken direkt olarak bulaşabildiği gibi, kontamine olmuş deniz ürünlerinin tüketimi ile de bulaşabilir. Bunun yanında akarsularda fekal kirlenmeye neden olan bakteriler bir çok antibiyotiğe karşı dirençli olup, deniz suyu gibi elverişli bir ortamda kendisinde bulunan direnç genlerini diğer bakterilere aktarmaktadır. Bu gibi nedenlerden dolayı, doğal bir kaynak olarak pek çok kullanımı olan denizlerin kalitesinin saptanması ve kontrolü önemlidir.

Bu çalışmada, Rize şehir sahilinde Kasım 2000-Ağustos 2001 tarihleri arasında deniz suyundan izole edilen ve derin dondurucuda saklanan bakteriler tiplendirilmiş ve antibiyotik dirençleri karakterize edilmeye çalışılmıştır.

Su kaynaklarında fekal atıkların bulunması gelişmemiş ülkelerde olduğu kadar gelişmiş ülkelerde de artan bir sorundur (53). Su ortamlarında antibiyotik dirençli patojen bakterilerin varlığının artması bu problemi daha karmaşık bir hale sokmuştur. Çevredeki antibiyotik varlığının artması, belirli bakteriler ve genotipleri üzerine bir baskı uygulamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki; antibiyotik direncinin yayılımı ile antibiyotiklerin endüstriyel kullanımlarının artması arasında pozitif bir korelasyon vardır (54).

Çalışmada Rize şehir sahilinde deniz suyundan izole edilen enterik bakterilerde antibiyotik dirençlerini karakterize etmek için farklı gruplara ait 10 tane antibiyotik kullanılmıştır.  $\beta$ -laktamlardan ampisilin; aminoglikozidlerden amikasin, streptomisin, gentamisin, kanamisin; kloramfenikol, nalidiksik asit, tetrasiklin, trimetoprim ve sulfametaksazol antibiyotiklerinin aktarılabirliği test edilmiştir.

Antibiyoqramları sonucunda direnç gözlenen enterik bakterilerin, direnç genlerini aktarılabir elemanlar olan plazmidler ile taşıyıp taşımadıklarını göstermek için konjugasyon ve transformasyon deneyleri yapıldı. Konjugasyon deneyi sonucunda D1 ve D12 numaralı enterik bakterilerde yalnızca ampisilin antibiyotiği konjugasyonunda pozitif sonuç gözlenirken diğer enterik bakterilerde pozitif sonuç gözlenmedi. Transformasyon

deneyi sonuçlarında ise yalnızca D3 ve D13 numaralı enterik bakterilerde tetrasiklin antibiyotiği transformasyonu pozitif sonuç verdi.

$\beta$ -laktamaz enzimleri kromozomal ya da plazmid aracılı olabilirler. Plazmid orijinli  $\beta$ -laktamazlar bir çok Gram-negatif bakteride sıklıkla bulunmaktadır. Bunlardan en sık rastlanılanı TEM tipi  $\beta$ -laktamazlardır (50). Çalışmada ampisilin direnci gözlenen 11 adet enterik bakteride TEM tipi  $\beta$ -laktamazların belirlenmesi için yapılan PCR analizi sonucunda yalnızca D3 numaralı enterik bakteride TEM tipi  $\beta$ -laktamaz geni pozitif olarak belirlenmiştir.

Çalışmada tetrasiklin direnci görülen 7 enterik bakteri suşunda, enterik bakterilerde sıklıkla rastlanan tetrasiklin direnç genleri olan *tetA*, *tetB* ve *tetC* genleri PCR analizi ile belirlenmeye çalışıldı. Bu PCR sonucunda tetrasiklin dirençli enterik bakterilerin hepsinde *tetB* geni pozitif olarak gözlemlendi.

Ekstrakromozomal elemanlar olan plazmidlere direnç genlerini taşıyan hareketli genetik elemanlar olan integronlar da enterik bakteriler arasında direncin yayılmasında etkilidirler. Antibiyogram sonucunda direnç gözlenen 14 enterik bakteri suşunda Sınıf 1 ve Sınıf 2 integronlarının varlığı PCR analizi ile belirlenmeye çalışıldı. PCR sonucunda enterik bakterilerden yalnızca D8 numaralı suşta Sınıf 1 integron belirlenirken, Sınıf 2 integron yalnızca D20 numaralı suşta belirlendi.

PCR analizleri sonucunda belirlenen TEM-1, *tetB*, Sınıf 1 ve Sınıf 2 direnç genlerinin dizi analizleri yapıldı ve gen yapıları belirlendi. Böylece denizlerde *Enterobacteriaceae* familyasına ait bireylerin bu genlerde taşıdıkları direnç profilleri, yapıları ve genetik haritaları çıkarıldı.



## 5. ÖNERİLER

Denizler besin açısından büyük bir potansiyele sahip olup, önemli besin kaynaklarından biridir. İnsanlık için doğal dengenin korunması, doğadan yararlanma ve doğayı koruma bilincinin yaygınlaştırılması oldukça önemlidir. Denizlerde; nehirlerle gelen kirleticiler, artan kentleşme, yoğun tarım faaliyetleri suyun zararlı maddelerle ve mikroorganizmalar ile kirlenmesi ileride onarımı imkansız zararlara neden olmaktadır.

Karadeniz, çevresinde bulunan ülkelerin atıklarını içinde toplayan havza görevi görmektedir. Kanalizasyon sularının Karadeniz'e akışı mikrobiyolojik kirlilikle sonuçlanır. Bu nedenle denizlerde meydana gelen kirliliğin kontrolü ve izlenmesi çevre ve halk sağlığı, kıyı sularının halk sağlığı ve biyolojik çeşitliliğin korunması açısından önemlidir.

Denizlerde fekal kirlenmenin önlenmesi için kanalizasyon atık sularının dere ve denizlere verilmesinin önlenmesi gerekmektedir. Bunun için arıtma tesisi olmayan fabrikaların ve belediyelerin modern arıtma tesisi kurması, kurulu olan arıtma tesislerinin tam verimle çalıştırılmasının denetlenmesi yapılmalıdır.

Antibiyotik direncinin önlenmesi için risk faktörlerinin doğruluk ve açıklıkla belirlenmesi gerekmektedir. Sık, devamlı ve tekrarlayan gereksiz antibiyotik uygulamaları ve en önemlisi profilaktik uygulamalar, tarımda ve hayvancılıkta yoğun ve gelişigüzel antibiyotik kullanımı direncin ortaya çıkmasına yol açan faktörlerdendir. Bu şekilde yoğun ve gereksiz antibiyotik kullanımının bir an önce önüne geçilmeli, toplum bilinçlendirilmeli, bu konudaki eğitim çalışmaları yaygınlaştırılmalı ve bir diğer taraftan da ilaç endüstrisinin yanlış ilaç pazarlama uygulamaları düzeltilmelidir.

Doğaya salınan antibiyotik maddelerin seçici baskısı, bakteriler arasında direnç genlerinin ortaya çıkması ve doğal ya da patojen bakteriler arasında yayılımına sebep olmaktadır. Deniz gibi rekreasyon amacı ile kullanılan sular, düzenli olarak mevcut bakteriler yönünden ve bu bakterilerin potansiyel direnç taşıyıcılıkları bakımından incelenirse halk sağlığı, bilimsel araştırmalara katkısı, riskin değerlendirilmesi ve takibi açısından faydalı olacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

1. İleri, R., Çevre Biyoteknolojisi, Değişim Yayınları, Adapazarı, 2000.
2. Yaramaz, Ö., Çevre ve Su Kirliliği, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No: 42, İzmir, 1992.
3. Url-1: <http://www.pws.com.tr/sontr/tr/icme.htm>, İçme Suları, 21 Mart 2006.
4. Muslu, Y., Atık Suların Arıtılması, İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, İstanbul, 1996.
5. Tibbetts, J., Environmental Health Perspectives, Water World, 108, (2000) 2, 55-59.
6. Sargeant, D., Fecal Contamination Source Identification Methods in Surface Water, Washington State Department of Ecology, 1999.
7. Akman, Y., Ketenoğlu, O., Evren, H., Kurt, L. ve Düzenli, S., Çevre Kirliliği ve Çevre Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara, 2000.
8. Eja, M. E., Etok, A. C., Asikong, E. B., Mbotto, I. C. ve Arikpo, E. G., Incidence of Enteric Bacterial Pathogens in Water Found at the Bottom of Commercial Freezers in Calabar, Southeastern Nigeria, Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 37, 2 (2006).
9. American Public Health Association, Standard Methods for The Examination Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington DC., 1995.
10. Harword, V.J., Butler, J., Parrish, D. ve Wagner, V., Isolation of Fecal Coliform Bacteria from The Diamondback Terrapin, Appl. Environ. Microbiol., 65 (1999), 865-867.
11. Col, N.F. ve O'Connor, R.W., Estimating Worldwide Current Antibiotic Usage: Report of Task Force I, Rev. Infect. Dis., 9 (1987), 232-243.
12. DuPont, H.L., ve Steele, J.H., Use of Antimicrobial Agents in Animal Feeds: Implications for Human Health, Rev. Infect. Dis., 9 (1987), 447-460.
13. Lederberg, J., Shope, RE., Oaks, S.C., Jr., Emerging Infections: Microbial Threats to Health in The United States, National Academy Press., Washington, DC., 1992.
14. Tomasz, A., Multiple-Antibiotic-Resistant Pathogenic Bacteria: a Report on The Rockefeller University Workshop, Eng.J.Med., 330 (1994), 1247-1251.

15. Pan American Health Organisation, Leading Causes of Mortality on the United States-Mexico Border, 20, 2 (1999).
16. Mezrioui, N. ve Baleux, B., Resistance Patterns of *E. coli* Strains Isolated From Domestic Sewage before and after Treatment in Both Aerobic Lagoon and Activated Sludge, Water Resources, 28, 11 (1994), 2399-2406.
17. Morse, A. ve Jackson A., Fate of a Representative Pharmaceutical in the Environment, Texas Water Resources Institute, Texas Tech. University Pres, 2003.
18. Tauxe, R.V., Emerging Food Borne Diseases: an Evolving Public Health Challenge, Emerg. Infect. Dis., 3 (1997), 425-434
19. Dufour, A.P., Ericksen, T.H., Ballentine, R.K., Cabelli, V.J., Goldberg, M. ve Fox, W.E., Bacteriological Ambient Water Quality Criteria for Marine and Fresh Recreational Waters, Ambient Water Quality Criteria for Bacteria, EPA 44075-84-002, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1986.
20. Griffin, D.W., Gibson III, C.J., Lipp, E.K., Riley, K., Paul III, J.H. ve Rose, J.B., Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcriptase PCR and of Microbial Indicators by Standard Methods in The Cannals of The Florida Keys, Appl. Environ. Microbiol., 65, 9, (1999) 4118-4125.
21. Anon; Çevre Bakanlığı Mevzuatı II, Çevre Bakanlığı Araştırma Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı, Ankara, 1995.
22. Gangle, B.J., Sources and Occurence of Antibiotic Resistance in The Environment, Master of Science, University of Maryland, Baltimore, USA 2005.
23. Howard, S., Gold, M.D., Robert, C. ve Moellering, JR., M.D., Antimicrobial-Drug Resistance, The New England Journal of Medicine, 335, 19, (1996).
24. A. Yüce, Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları, Klimik Dergisi, 14, 2, (2001).
25. G. Tanır ve N. Göl, Antibiyotik Direnci, Klimik Dergisi, 12, 2, (1999).
26. Dale, J.W. ve Park, S.F., Molecular Genetics of Bacteria, Fourth Edition, Wiley Co., U.K., 2004.
27. Arvanitidou, M., Tsakris, A., Constantinidis, T. C. ve Katsouyannopoulos, V. C., Transferable Antibiotic Resistance Among Salmonella Strains Isolated from Surface Waters, Water. Res., 31,5 (1997), 1112-1116.
28. R. Öztürk, Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik İlaçlara Karşı Direnç Gelişmesi ve Günümüzde Direnç Durumu, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 1997.
29. Roy, P.H., Integrons: Novel Mobile Genetic Elements Mediating Antibiotic Resistance in Enterobacteria and Pseudomonas. APUA Newsletter, 13, 3, 4-6.

30. White, P. A., Mciver, C. J. ve Rawlinson, W., Integrons and Gene Cassettes in The *Enterobacteriaceae* , Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45,9 (2001), 2658-2661.
31. Mazel, D., Dychinco, B., Webb, A. V. ve Davies, J., A Distinctive Class of Integron in The *Vibrio cholerae* Genome, Science, 280, (1998), 605.
32. Durupınar B., Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler, Klimik Dergisi, 14, 2, (2001).
33. Saye, D.J. ve Miller, R.V., Gene Transfer in The Environment. Levy, S.B. & Miller, R.V. (eds), 223-259, McGraw-Hill, New York, 1989.
34. Oppegaard, H., Steinum, T.M., ve Wasteson, Y., Horizontal Transfer of a Multi-Drug Resistance Plasmid between Coliform Bacteria of Human and Bovine Origin in a farm Environment, Appl. Environ. Microbiol., 67,8 (2001), 3732-3734.
35. Niemi, M., Sibakov, M. ve Niemala, S., Antibiotic Resistance Among Different Species of Fecal Coliforms Isolated from Water Sample, Appl. Environ. Microbiol., 45,1 (1983), 79-83.
36. Kelch, W.J. ve Lee, J.S., Antibiotic Resistance Patterns of Gram Negative Bacteria Isolated from Environmental Sources, Appl. Environ. Microbiol., (1978).
37. Scwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. ve Obst, U., Detection on Antibiotic-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water, and Drinking Water Biofilms, FEMS Microbiology Ecology, 43, (2003), 325-335.
38. Boon P. I.ve Cattanach M., Antibiotic Resistance of Native and Feacal Bacteria Isolated from Rivers, Reservoirs and Sewage Treatment Facilities in Victoria, South Eastern Australia, Letters in Applied Microbiology, 28, (1999), 164-168.
39. Brenner, D.J.: Facultatively Anaerobic Gram-Negative Rods in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1 (N.R. Krieg and J.G. Holt ends.) Williams & Wilkins Baltimore, pp.408-516, 1986.
40. Yu, P.K.W. ve Washington, J.A. : Identification of Aerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria, Section 4.2, pp.131-250. In : Washington, J.A. :Labrotory Procedures in Clinical Microbiology. 2nd. ed., Springer-Verlag, New York, 1985.
41. Clinical and Labratory Standarts Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests. Approval Standard, M100-S15, Wayne, PA: CLSI, 2005.
42. Rice, L.B., Willey, S.H., Papanicolaou, G.A., Medeiros, A.A., Eliopoulos, G.M., Moellering Jr., R.C. ve Jacoby, G.A., Outbreak of Ceftazidime Resistance Caused by Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases at Massachusetts Chronic Care Facility. Antimicrob. Agents Chemoter. 34, (1990), 2193-2199.

43. Özgümüş, O.B., Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterik Bakterilerde Plazmidle Kodlanan TEM ve SHV-Tipi  $\beta$ -laktamaz Genlerinin Moleküler Epidemiolojisi, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, 2001.
44. Ausubel, F.M., Brient, R. ve Kingston R.E., Short Protocols in Molecular Biology, 2nd ed. New York: John Willey and Sons, 1995.
45. Levesgue, C., Piche, L., Larose, C. ve Roy, P.H., PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. Antimicrob. Agents Chemoter. 39 (1995), 185-191.
46. Arlet, G. ve Philippon, A., Construction by Polimerase Chain Reaction and Use of Intragenic DNA Probes for Three Main Types of Transferable  $\beta$ -Lactamases (TEM, SHV, CARB). FEMS Microbiol Letts , 82, (1991), 19-26.
47. Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E. ve Dalsgaard, A., Distribution and in-vitro Transfer of Tetracycline Resistance Determinants in Clinical and Aquatic Acinetobacter Strains. The Pathological Society of Great Britain and Ireland, 49, (2000), 929-936.
48. Aarestrup, F. M., Lertworapreecha, M., Evans, M. C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R. S., ve Wegener, H. C., Antimicrobial Susceptibility and Occurrence of Resistance Genes Among Salmonella enterica serovar Weltevreden from Different Countries. J. Antimicrob. Chemoter. 52, (2003), 715–718.
49. Rosser, S.J. ve Young, H-K., Identification and Characterization of Class I Integrons in Bacteria from an Aquatic Environment. J. Antimicrob. Chemoter. 44, (1999), 11-18.
50. Roe, M.T., Vega, E. ve Pillai S.D. Antimicrobial Resistance Markers of Class 1 and Class 2 Integron-Bearing *Escherichia coli* from Irrigation Water and Sediments. Emerging Infectious Diseases, 9, 7, (2003).
51. White P.A., McIver C.J. ve Rawlinson W.D., Integrons and Gene Cassettes in The *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemoter, 45, (2001), 2658–61.
52. Arlet, G., Brami G., Décrè D., Flippo A., Gaillot O., Lagrange P. H. ve Philippon A., Molecular Characterisation by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of TEM  $\beta$ -Lactamases. FEMS Microbiol. Lett., 134, (1995), 203-208.
53. Asm Colloquium Report, Antimicrobial Resistance, An Ecological Perspective, American Society for Microbiology, Washington, DC, 1-14, 1999.
54. Lin, J., Biyela, P.T., ve Puckree, T., Antibiotic Resistance Profiles of Environmental Isolates from Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA), Water SA, 30, (2004).

## **ÖZGEÇMİŞ**

1982 yılında Rize’de doğdu. İlk ve ortaokulu Rize Çay İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini Rize Fener Lisesi’nde tamamladı. 2000 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2004 yılında aynı fakülteden Biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.