



Giresun (Karadeniz) Kıyı Şeridinden İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Antibiyotik Direnç Düzeylerinin Belirlenmesi

Tamer Akkan*, Cengiz Mutlu

Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hidrobiyoloji Anabilim Dalı, 28200 Giresun, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Geliş 05 Nisan 2016
Kabul 25 Mayıs 2016
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

Anahtar Kelimeler:

Enterobacteriaceae
Su Kalitesi
Antibiyotik
Dirençlilik
Giresun

*Sorumlu Yazar:

E-mail: biyoloji@yahoo.com

Ö Z E T

Giresun (Karadeniz) kıyı şeridi boyunca gerçekleştirilen bu çalışmada deniz suyundan izole edilen 200 adet *Enterobacteriaceae* izolatının 9 farklı antibiyotiğe karşı dirençliliği agar difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri sırasıyla; Eritromisin (E): %82, Sefazolin (CZ): %46,50, Sefotaksim (CTX): %50,50, Amikasin (AK): %41,50, Nalidiksik asit (NA): %34,50, Tetrasiklin (TE): %30,50, Kloramfenikol (C): %36,50, Sefuroksim (CXM): %35,50 ve Amfisilin (AM): %15,50 olarak saptanmıştır. Çalışma sonucunda 2 izolatın tüm antibiyotiklere karşı dirençli, 5 izolatın ise hassas olduğu tespit edilmiş olup tüm izolatların %91'inin çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) değerinin 0,2'den daha yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, Giresun kıyı şeridinin bakteriyolojik kalitesinin hijyen ve sanitasyonu sağlanamadığından yöre halkı için bir tehlike oluşturabileceği belirlenmiştir.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 4(8): 646-650, 2016

Determination of Antibiotics Resistance Levels in *Enterobacteriaceae* Isolated from Giresun Coasts

ARTICLE INFO

Article history:
Received 05 April 2016
Accepted 25 May 2016
Available online, ISSN: 2148-127X

Keywords:

Enterobacteriaceae
Water Quality
Antibiotic
Resistance
Giresun

*Corresponding Author:

E-mail: biyoloji@yahoo.com

ABSTRACT

In this study the resistance of 200 *Enterobacteriaceae* isolates recovered from seawater in Giresun Coasts (Black Sea) to 9 different antibiotics was investigated by agar diffusion methods. Antibiotic resistance levels of isolates was determined respectively, Erythromycin (E): 82%, Cefazolin (CZ): 46.50%, Cefotaxime (CTX): 50.50%, Amikacin (AK): 41.50%, Nalidixic acid (NA): 34.50%, Tetracycline (TE): 30.50%, Chloramphenicol (C): 36.50%, Cefuroxime (CXM): 35.50% and Ampicillin (AM): 15.50%. It was found that 2 isolates resistant to all antibiotics, 5 isolates sensitive and 91% of all isolates multiple antibiotic resistance (MAR) index values were higher than 0.2. It was concluded that bacteriological quality in Giresun coastal area could cause public health problems due to the not provided necessary hygiene and sanitation.

Giriş

Kıyısız alanlar; tarih boyunca birçok medeniyette artan nüfus oranı ve ekolojik baskılara en fazla maruz kalan bölgeler olup kendilerine özgü doğal ortam koşulları nedeniyle insanlar tarafından tercih edilmektedirler. Yapısı itibarı ile bu alanlar endüstriyel atıklara ilaveten özellikle kanalizasyon atık sularıyla kirlenebilir, hatta hastane atıklarının da bulunduğu farklı nitelikteki kirleticilerin deniz ortamına bulaşması halinde ciddi sağlık sorunlarına maruz kalabilir (Akkan ve ark., 2011). Günümüzde su kaynaklarındaki en önemli sağlık sorunlarından biri olarak florada yer alan bakterilerdeki antibiyotik dirençliliğindeki artışır (Akkan ve ark., 2015). Ekolojik çalışmalar antibiyotik ve metal dirençliliklerinin

evrensel bir önem içerdiğini göstermektedir (Hassen ve ark., 1998; Benka-Coker ve Ekundayo, 1998; Ansari ve Malik, 2007). Plazmidlerin bakterilerde antibiyotiklere ve ağır metallere karşı dirençlilikleri etkilediği bilinmektedir (Smith ve ark., 1993; Sobecky, 1999). Çoklu antibiyotik dirençliliği taşıyan sucul bakteriler dünyanın birçok bölgesinde önem taşımaktadır. Bununla birlikte birçok sucul bakterinin ciddi hastalıklara yol açtığı bilinmesi nedeniyle bilimsel araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Calomiris ve ark., 1984; Messi ve ark., 2005; Lobova ve ark., 2008).

Ülkemizin de dâhil olduğu gelişmekte olan ülkelerde farklı nitelikteki evsel ve endüstriyel atıkların doğrudan

veya dolaylı yollar ile sucul kütlelerde son bulunduğu bilinmektedir. Özellikle kıyıda yerleşim gösteren illerimizin atık suları, denizel ortamlara deşarj edilmektedir. Dolayısıyla niteliği değişken olan kirleticilerin sucul ekosistemlere geçişi ve birikimi söz konusudur (Uncumusaoglu ve ark., 2012). Son yıllarda bilinçsiz antibiyotik tüketiminin artması sağaltımda bakterilere karşı olumsuz sonuçların alınmasına neden olmuştur. Bu sebeple insanların ilişki halinde bulunduğu çevredeki bakteriyel floranın mevcut antibiyotik dirençlilik profillerinin bilinmesi halk sağlığı için büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmanın amacı Giresun kıyı sularındaki doğal *Enterobacteriaceae* florası elemanlarının antibiyotik dirençlilik düzeylerini belirlemek ve deniz suyunun bakteriyolojik kalitesi hakkında ön bilgi edinmektedir.

Materyal ve Metot

Örneklerinin Toplanması ve Bakteri İzolasyonu

Giresun il merkezinde kıyı şeridi boyunca farklı noktalarda; deniz yüzeyinin 20 cm aşağısından 250 mL'lik steril bakteriyolojik su numune şişesi kullanılarak, 3 bölgede yer alan birden fazla noktadan deniz suyu örnekleri alınmış (Şekil 1) ve soğuk zincir korunarak 4 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir (APHA, 1992). Tüm bu örnekleme işlemleri 2014 yılı boyunca gerçekleştirilmiştir. İl merkezinin doğu kısmında yer alan istasyon; çöp depolama sahası ile hastane atıklarının deniz suyuna deşarj edildiği alana, batı kısmında yer alan istasyonlar ise, yaz aylarında yoğun rekreasyonel faaliyetlerin gerçekleştiği alanlara karşılık gelmektedir.

Uygun şartlarda toplanan numunelerden; 1 ml su örneği alınarak steril saf su içerisinde seri sulandırma ile EMB agarda (Merck) petriye yayma tekniği kullanılarak Gr (-) suşlarının izolasyonu yapılmıştır. Rastgele seçilen

izolatların; fenotipik özellikleri, Gram boyamaları, oksidaz ve katalaz reaksiyonları, hareketlilik, OF glikoz ve jelatini eritme testleri yapılarak toplam 200 adet *Enterobacteriaceae* suşlarının izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Cowan, 1974; Lemos ve ark., 1985).

Antibiyotik Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi

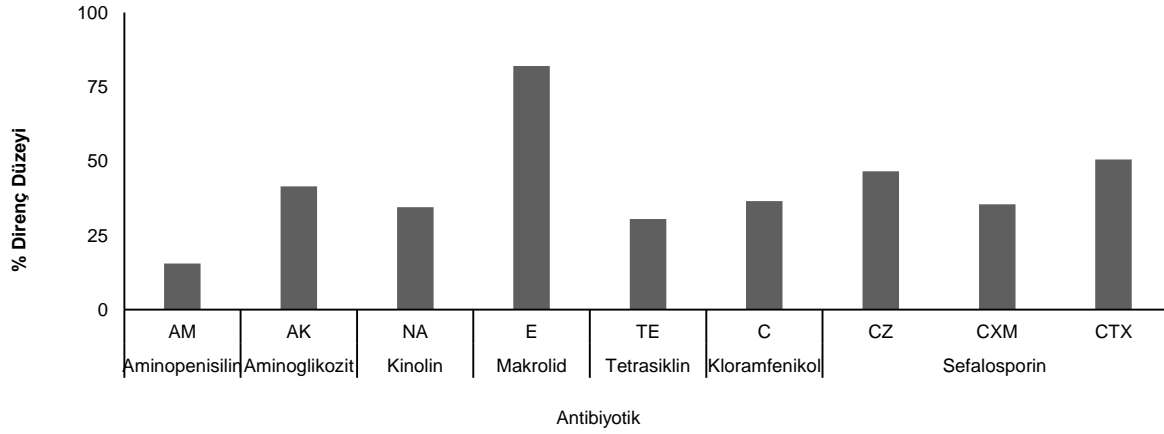
Hassasiyet testleri agar disk difüzyon testi kullanılarak yapılmıştır (Bauer et al., 1966). Yedi grubu temsil eden 9 ticari antibiyotik diski Mueller-Hinton Agar (Merck) kullanılarak denenmiştir. Bu antibiyotikler ve doz miktarları; amfisilin (AM, 10µg), tetrasiklin (TE, 30 µg), sefazolin (CZ, 30µg), sefuroksim (CXA, 30 µg), amikasin (AK, 30µg), eritromisin (E, 15µg), sefotaksim (CTX, 30µg), streptomisin (S, 10µg) ve nalidiksik asit (NA, 30µg). Antibakteriyel etkinin doğrulanması için referans suş olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır (NCCLS, 1997). Ayrıca, izolatların çoklu antibiyotik direnç (ÇAD) indeks değerleri Krumberman (1985)'a göre hesaplanmıştır.

Bulgular

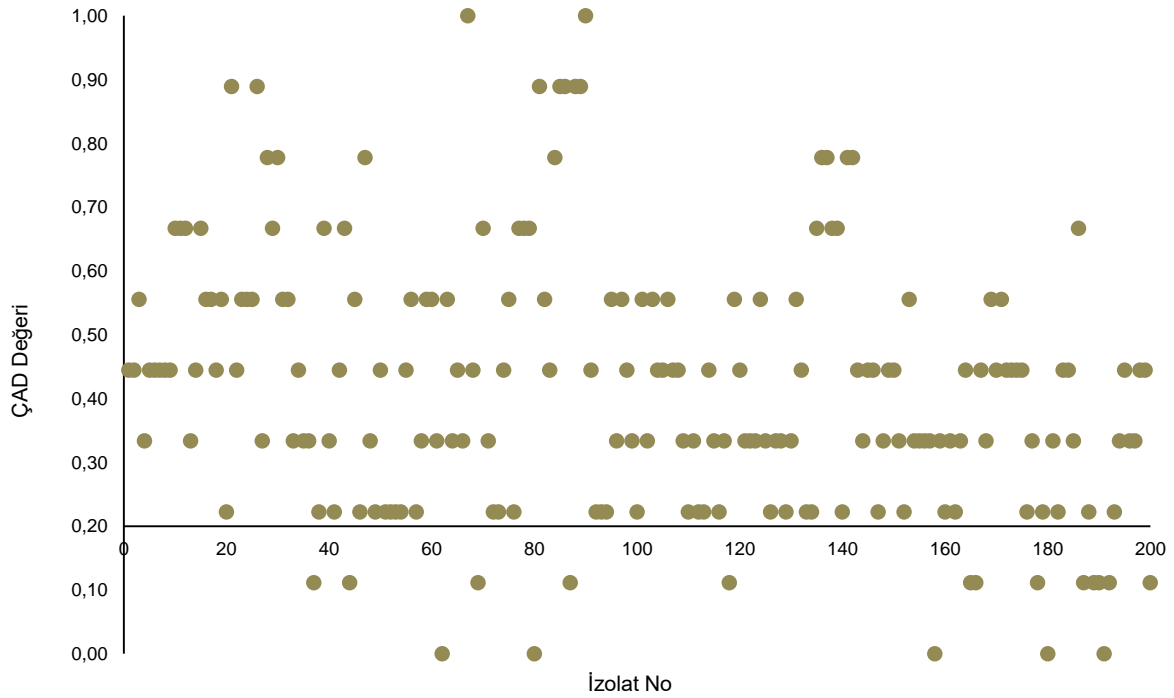
Giresun kıyı hattı deniz suyundan selektif şekilde toplamda 200 *Enterobacteriaceae* izolatu elde edilmiş ve bu izolatların 9 farklı ticari antibiyotiğe karşı dirençlilik profilleri çıkartılmıştır (Şekil 2-3). Genel olarak dirençlilik oranları; E: %82, CZ: %46,50, CTX: %50,50, AK: %41,50, NA: %34,50, TE: %30,50, C: %36,50, CXM: %35,50 ve AM: %15,50 olarak saptanmıştır (Şekil 2). Bununla birlikte 182 izolatu ÇAD referans değerini aştığı tespit edilmiştir (Şekil 3). Ayrıca çalışma süresince elde edilen suşlardan 5 tanesi tüm antibiyotiklere karşı hassas iken 2 tanesinde direnç saptanmıştır (Tablo 1).



Şekil 1 Çalışma Alanı (Google Earth)



Şekil 2 İzolatların % Antibiyotik Direnç Düzeyleri



Şekil 3 İzolatların ÇAD Değerleri

Tartışma ve Sonuç

Mudryk ve ark. (2010) tarafından Baltık Denizi'nin güney kıyılarında yapılan benzer çalışmada deniz suyundan elde edilen 49 izolatın 19 tanesinin test edilen tüm antibiyotiklere karşı hassas olduğu, geriye kalan 30 izolatın da en az 1 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca dirençli bulunan 30 izolatın antibiyotik dirençlilik düzeyleri; AM: %12, C: %8,3, CIP: %4,2, E: %6,3 ve CXM: %8,3'dir. Matyar ve ark. (2010) İskenderun Körfezi deniz suyu izolatlarındaki antibiyotik dirençliliklerini *Aeromonas* suşlarında; CZ: %66,6, ZOX: %50, CXM: %55, FEP: %43,3, *Pseudomonas* suşlarında; CZ: %84,8, ZOX: %12,3, CXM: %71,7 ve FEP: %8,7 olarak tespit etmişlerdir. İskenderun Organize Sanayi Bölgesi civarındaki deniz suyundan izole edilen Gr (-) bakterilerden yüksek düzeyde direnç görülen bazılarındaki oran; E: %94,4, AM: %72,7, S: %68,3, CZ: %64,6, CB: %57,1 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca tüm izolatların %94,9'unun ÇAD referans değerini aştığı belirlenmiştir (Akkan ve ark., 2013). Sipahi ve ark. (2013)

Giresun il merkezinde tüketime sunulan bazı balıklardaki antibiyotik dirençlilik düzeylerini; E: %85,07, CZ: %79,85, CTX: %78,36, CXA: %71,64, NA: %60,45, AM: %58,96, AK: %53,73, TE: %47,76 ve S: %17,91 olarak rapor etmiş ve tüm izolatların %88,05'inin ÇAD referansını aştığını belirtmişlerdir. Akkan ve ark. (2015), balık çiftliklerinin yerleşim gösterdiği deniz suyundan izole ettikleri bakterilerin %96'sında E'ye, %89'unda S'ye, %87'sinde CZ'ye, %83'ünde AM'ye, %77'sinde NA, CB ve SXT'ye, %76'sında TE'ye karşı dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca tüm izolatların %79'unun ÇAD referansını aştığı tespit edilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında; Giresun kıyı şeridi deniz suyundan izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarındaki antibiyotik direnç düzeylerinin diğer çalışmalarda olduğu gibi yüksek seviyede seyrettiği görülmüştür. Yine ortamdaki kontaminasyonun en önemli göstergesi olan ÇAD değerinin, literatür verilerine oranla %91 gibi oldukça yüksek değer gösterdiği tespit edilmiştir.

Tablo 1 İzolatlardaki Antibiyotik Direnç Düzeyi

Antibiyotik Sayısı	Dirençli İzolat Sayısı
0	5
1	13
2	35
3	44
4	44
5	27
6	15
7	8
8	7
9	2

Çalışmada izole edilen toplam bakterilerin 5'i hariç geriye kalanlarının 1 ya da daha fazla sayıda antibiyotiğe dirençli olması bakteriler arasındaki dirençliliğin yayıldığına göstergesi olabilir. Son yıllarda su ortamında bakterilerin direnç durumlarını araştırmak amacı ile bazı tatlı su (*Tilapia mossambica* (Peters, 1852) ve *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758)) ve deniz balık türleri (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758 ve *Liza ramada* (Risso, 1827)) üzerine geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin izolasyonunu takiben, dirençliliğin bakteriler arasındaki transferi ile ilgili çok sayıda araştırma mevcuttur ve yapılan çalışmalarda bakteriler arasında atık sularda plazmid transferinin gerçekleşebileceği tespit edilmiştir (Karayakar ve Ay, 2006; Mach ve Grimes, 1982; Matyar ve ark., 2004; Radu ve ark., 2003). Plazmid transferinin gerçekleşmesi ile bakteriler arasında antibiyotiklere olan dirençliliğin yaygınlaşarak oldukça önemli sorunlara neden olması ise kaçınılmazdır. Dolayısıyla, çalışma alanımızdaki yüksek antibiyotik dirençliliğinin bakteriler arasında yayılması durumunda ciddi sağlık problemlerinin meydana gelebileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir.

Kıyı şeridinden izole edilen bakterilerin antibiyotik profillerinin yüksek seviyede çıkması deniz suyunun bakteriyolojik kirlilik düzeyinin yüksek olduğunu göstergesi olarak açıklanabilir. Deniz ve deniz kıyıları hassas ekosistemler olup korunması gereken alanlar olarak bilinmektedir (Mach ve Grimes, 1982). Ancak ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerin farklı nitelikteki evsel ve endüstriyel atıkları doğrudan veya dolaylı yollar ile bir şekilde sucul kütlelerde sonlanmaktadır. Özellikle kıyısız alanda yerleşim gösteren illerimizin atık suları, denizel ortamlara deşarj edilmektedir. Dolayısıyla niteliği değişken olan kirleticilerin sucul ekosistemlere geçişi ve birikimi söz konusudur.

Sonuç olarak, Giresun kıyı hattının yoğun miktarda antimikrobiyal ajanlara maruz kaldığı, izole edilen bakterilerin %97,5'inin en az 1 antibiyotiğe karşı dirençli olduğu görülmektedir. İzolatlardaki dirençlilik düzeyinin yüksek oluşu hem sucul ekosistemdeki canlılar hem de insan sağlığı açısından ciddi sorunlar oluşturabilir. Mevcut bulgular ışığında kıyısız alanlarımızın bakteriyolojik analizlerinin gerçekleştirilerek bir bilgi bankası oluşturulması ve artan antibiyotik dirençliliğinin önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınması gerektiğini ifade edilebilir. Aksi takdirde, plazmidler aracılığı ile bakteriler arasında dirençliliğin yayılması halinde ilerleyen zamanlarda geri dönüşü olmayan ekosistem hasarları ve tedaviye cevap vermeyen bakteriyel kökenli

enfeksiyon hastalıklarının yayılması, halk sağlığı açısından tehlikeli ve kaçınılmaz bir duruma neden olabilir.

Teşekkür

Bu çalışmanın bir kısmına maddi yönden destek sağlayan GRU BAP Birimine teşekkür ederiz (FEN-BAP-A-220413-40).

Kaynaklar

- Akkan T, Kaya A, Dinçer S. 2011. Hastane Atık Sularıyla Kontamine Edilen Deniz Suyundan İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Sefalosporin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Düzeyleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 4(1):18-21, DOI:10.5222/TMCD.2011.018.
- Akkan T, Kaya A, Dinçer S. 2013. Antibiotic Levels and Heavy Metal Resistance in Gram Negative Bacteria Isolated from Seawater, Iskenderun Organized Industrial Zone. Journal of Applied Biological Sciences. 7(1):10-14.
- Akkan T, Kaya A, Dinçer S. 2015. Balık Çiftliklerinin Ekolojik Tahribatına Bir Örnek: Bakterilerdeki Antibiyotik Dirençliliğine Etkileri, Iskenderun Körfezi, Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi. 6(1):20-27.
- Ansari Mİ, Malik A. 2007. Biosorption of Nickel and Cadmium by Metal Resistant Bacterial Isolates from Agricultural Soil Irrigated with Industrial Wastewater, Bioresource Technology. 98(16):3149-3153, DOI:10.1016/j.biortech.2006.10.008.
- APHA. 1992. Microbial Examination in Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD, Editors. pp.9.1-9.147. American Public Health Association Washington DC.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology, 45:493-496.
- Benka-Coker MO, Ekundayo JA. 1998. Effects of Heavy Metals on Growth of Species of Micrococcus and Pseudomonas in a Crude Oil/Mineral Salts Medium, Bioresource Technology. 66:241-245, DOI:10.1016/S0960-8524(98)00057-1.
- Calomiris JJ, Armstrong JL, Seidler RJ, 1984. Association of Metal Tolerance with Multiple Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from Drinking Water, Applied and Environmental Microbiology. 47:1238-1242.
- Cowan ST. 1974. Cowan and Stell's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd ed. Cambridge University Pres. 238 pp.
- Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boundabous A. 1998. Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*, Bioresource Technology. 65:73-82, DOI:10.1016/S0960-8524(98)00011-X.
- Karayakar F, Ay Ö. 2006. Mersin Balıkçı Barınaklarından Yakalanan *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)'dan İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Grubu Bakterilerin Bazı III. Kuşak Sefalosporinlere Karşı Plazmid Kökenli Dirençliliğinin Saptanması. Çev-Kor Ekoloji Dergisi. 15(59):32-36.
- Krumperman PH. 1985. Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. Applied and Environmental Microbiology. 46:165-170.
- Lemos ML, Toranzo AE, Barja JL. 1985. Antibiotic Activity of Epiphytic Bacteria Isolated from Intertidal Seaweeds. Microbial Ecology. 11:149-163.
- Lobova TI, Barkhatov YV, Salamantina OV, Popova LY. 2008. Multiple Antibiotic Resistance of Heterotrophic Bacteria in the Littoral Zone of Lake Shira as an Indicator of Human Impact on the Ecosystem. Microbiological Research. 163:152-160, doi:10.1016/j.micres.2006.03.014.

- Mach PA, Grimes DJ. 1982. R Plasmid Transfer in a Wastewater Treatment Plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 44:1395-1403.
- Matyar F, Dinçer S, Kaya A, Çolak Ö. 2004. Prevalence and Resistance to Antibiotics in Gram Negative Bacteria Isolated From Retail Fish in Turkey. *Annals of Microbiology*. 54(2):151-160.
- Matyar F, Akkan T, Uçak Y, Eraslan B. 2010. Aeromonas and Pseudomonas: Antibiotic and Heavy Metal Resistance Species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environmental Monitoring and Assessment (EMAS)*. 167:309-320, DOI: 10.1007/s10661-009-1051-1.
- Messi P, Guerrieri E, Bondi M. 2005. Antibiotic Resistance and Antibacterial Activity in Heterotrophic Bacteria of Mineral Water Origin. *Science of the Total Environment*. 346:213-219, DOI:10.1016/j.scitotenv.2004.12.005.
- Mudryk Z, Perlinski P, Skórczewski P. 2010. Detection of Antibiotic Resistant Bacteria Inhabiting the Sand of Non-Recreational Marine Beach, *Marine Pollution Bulletin*. 60,207-214, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2009.09.025.
- NCCLS. 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standards M2-A6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 6th edn., NCCLS., Wayne, Pennsylvania.
- Radu S, Ahmad N, Ling FH, Reezal A. 2003. Prevalence and Resistance to Antibiotics for Aeromonas Species From Retail Fish In Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*. 81:261-266, DOI:10.1016/S0168-1605(02)00228-3.
- Sipahi N, Mutlu C, Akkan T. 2013. Giresun İlinde Tüketime Sunulan Bazı Balıklardan İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri. *Gıda*. 38(6):343-349, DOI: 10.5505/gida.2013.55264.
- Smith JJ, Howington JP, McFeter GA. 1993. Plasmid Maintenance and Expression in *Escherichia coli* Exposed to the Antarctic Marine Environment, *Antarctic Journal of the United States*. 28:123-124.
- Sobecky PA. 1999. Plasmid Ecology of Marine Sediment Microbial Communities, *Hydrobiologia*. 401, 9-18.
- Uncumusaoğlu AA, Gürkan Ş, Özkan EY, Büyükişık HB. 2012. A preliminary Research on Heavy Metals Accumulated in Liver and Muscle Tissue of Seahorse (*Hippocampus hippocampus*) Caught from Tirebolu Coasts (Giresun, Eastern Black Sea). *Fresenius Environmental Bulletin*. 21 (11b). 3418-3420.