

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İZMİT KÖRFEZİNDE DENİZ KİRLENMESİNE
SEBEP OLAN *E.coli* VARLIĞI VE KÖRFEZDEN İZOLE
EDİLEN *E.coli*'LERDE R PLAZMİDLERİNE BAĞLI
“BULAŞICI TİPTE ANTİBİYOTİK DİRENÇ”
ÖZELLİĞİNİN ARANMASI

Hasibe CİNGİLLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Abdülkadir AKÇİN

66013

GEBZE
1997

Bu tez çalışması, G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.06.1997 tarih ve 97/14 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından Biyoloji... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir

JURİ

UYE
(Tez Danışmanı)

Prof.Dr.Abdülkadir AKÇİN



UYE

: Prof.Dr.Sabri SÜMER



UYE

: Prof.Dr.Yavuz SEZEN



ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
05/07/1997... tarih ve 97/12 sayılı kararı

İmza / Mühür



ÖZET

Bu çalışmada İzmit Körfezi'ndeki 9 istasyondan alınan 23 deniz suyu örneğinden izole edilen ve körfezde kirliliğe neden olan koliformlardan 8 *E.coli* suşu antibiyotiklere karşı çoklu dirençlilik ve bulaşıcı tipte plazmid "R faktörü" taşıma özellikleri yönünden incelenmiştir.

Patojen *E.coli* suşlarının örneklerden izolasyonu ve identifikasyonu klasik metodlarla yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metoduna göre gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen patojen *E.coli* suşlarının antibiyotiklere dirençlilikleri *Tetracylin* için %50, *Sulbactam/Ampicillin* için %62.5, *Penicillin* için %62.5, *Gentamicin* için %50, *Amikacin* için %12.5, *Chloramphenicol* için %37.5, *Cefoperozone* için %25, *Kanamycine* için %37.5, *Trimethoprim+Sulphametoxazole* için %62.5 olarak tesbit edilmiştir.

Bu çalışma, İzmit Körfezi'ndeki kirlenmenin ve kirlilik indikatörü olan koliform varlığının önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir. Ayrıca su kaynaklı ve patojen olan *E.coli* suşlarının en az 2 antibiyotiğe birden çoklu direnç taşıdıkları ve bu dirençlilik durumlarını R plazmidleri ile aktarabilme yeteneğinde oldukları isbat edilmiştir. Koliform bakterilerde çoklu dirençliliği sağlayan R plazmidlerinin varlığı da saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları, günümüzde hekimleri en çok düşündüren sorunlardan biri haline gelen İzmit Körfezi'ndeki *E.coli* suşlarının direnç modelinin tanıtılmasında etkili olabilecektir.

SUMMARY

In this study, the samples which were isolated from the twenty-three seawater samples taken from 9 chosen sites in the Gulf of İzmit, and 8 *E.coli* coliforms which is one of the pollutants of the Gulf, have been studied with respect to their resistance to antibiotics and their carrier properties of Contagious Type Plasmids "R" factor.

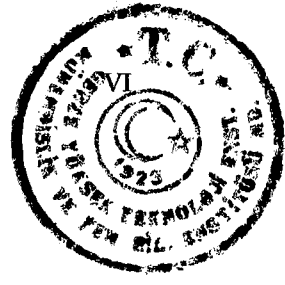
The pathojenic *E.coli* samples were isolated and identified by use of classic methods. Sensitivity tests for antibiotics were conducted according to the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method.

The *E.coli* which were isolated were tested for resistance to antibiotics and the following resistance rates were seen: %50 resistance to *Tetracycline*, %62.5 for *Sulbactam/Ampicillin*, %62.5 for *Penicillin*, %50 for *Gentamicin*, %12.5 for *Amikacin*, %37.5 for *Chloramphenicol*, %25 for *Cefoperozone*, %37.5 for *Kanamycin*, %62.5 for *Trimethoprim + Sulphamethoxazole*.

This study demonstrates the great dimensions of water pollution in the Gulf of İzmit by these pollution indicators, the presence of coliforms. Furthermore, *E.coli* which is water based, has been proven to be highly resistant to at least 2 antibiotics and to be able to transfer this resistance to R plasmids.

In coliform bacteria the presence of high resistance provider R plasmids have been found.

This study will effectively and the understanding of the resistance models of the *E.coli* found at the Gulf of İzmit, which is one the major concerns of medical scientists today.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince yapıcı incelemeleri ve bilimsel katkıları ile bana yön veren Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Rektör Yardımcısı saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Abdülkadir AKÇİN'e,

Pratik ve teorik çalışmalarım sırasında her zaman bilgi ve yardımları ile bu tez çalışmasının tamamlanmasında büyük emeği geçen değerli insan Dr.Kemal Naci KIRCA'ya,

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı Öğretim Üyelerine,

Konya Halk Sağlığı Laboratuvarındaki Doktor ve Teknisyen arkadaşlarıma,

E.coli K12 suşunun temininde yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyelerine,

Şekillerin çizim ve yazımında yardımcı olan Ragıp GÜMÜŞCAN'a,

Kütüphane imkanlarından yararlandığım TÜBİTAK-MAM'a,

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgememiş olan saygıdeğer Babama, Anneme, ve Kardeşlerime teşekkür ederim.

Tez çalışmasının tamamlanması sırasında her zaman sabırlı ve hoşgörülü olan Anneme ayrıca minnet duygularımı ifade eder,

Araştırmayı maddi açıdan destekleyen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Araştırma Fonu kurumuna da teşekkür ederim.

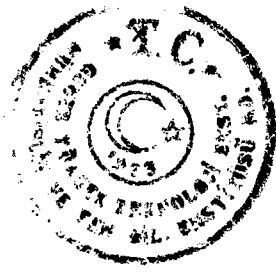
İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET.....	İV
SUMMARY.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	İX
ŞEKİLLER.....	XI
ÇİZELGELER.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. KONU İLE İLGİLİ KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Genel Bilgiler.....	3
2.2. Konjugasyon.....	6
2.3. Antibiyotiklere Direnç Olayı.....	8
2.3.1. Antibiyotiklerin Gerek Bakterinin Üremesini ve Gelişmesini Önlemesi Gerekse Bakteriyi Öldürme Mekanizmaları.....	9
2.4. R Faktörleri (Direnç Plazmidleri).....	11
2.5. R ₂₂₂ Plazmidi ve Delta Faktörü (Δ).....	13
2.6. R Plazmidlerinin Kökeni.....	14
2.7. R Plazmidlerinin Aranması.....	15
2.8. Esherichia.....	16
2.8.1. E.coli.....	16

2.9. Plazmid-Epizom.....	16
2.10 .Koliform Tanımı.....	18
2.10.1. Total Koliformlar.....	19
2.10.2. Fekal Koliformlar.....	19
2.11. Endikatör Kaynaklar.....	19
3. MATERYAL VE METOD.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Metod.....	22
3.2.1. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Total Koliform Tayini.....	22
3.2.2. E.coli'lerin İzolasyonu.....	26
3.2.3. Konjugasyon Deneyinin yapılışı.....	30
4. BULGULAR.....	33
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	37
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

RTF	Resistance Transfer Factor
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
F	Fertilite Faktörü
TF	Transfer Faktör
R	Plazmid
Δ	Delta
HFTS	High Frequency of Transfer
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
h	Saat
μm	Mikrometre
Gr(-)	Gram negatif
Gr(+)	Gram pozitif
Col	Kolisin
ml	Mililitre
S	Hassas
R	Dirençli
Nal ^r	Nalidiscic Acid'e Dirençli
Ch ^r	Chloramphenicol'e Dirençli
lac(-)	Laktozu Fermentlemeyen
lac(+)	Laktozu Fermentleyen
D-2	2. Dilüsyon

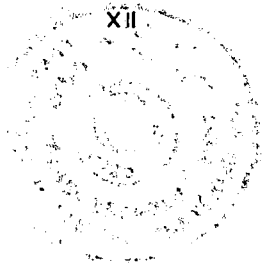


MF	Membran Filtre
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
KOH	Potasyum Hidroksit
cm ³	Santimetreküp
SAM	Sulbactam / Ampiciline
P	Penicillin
CN	Gentamicin
AK	Amicasin
NA	Nalidiscic Acid
C	Chloramphenicol
CEP	Cefoperozone
K	Kanamycin
SXT	Trimethoprim-Sulfamethoxazole
T	Tetracycline
mcg	Yoğunluk
mm	Milimetre
DST	Adi Agar Besiyeri
ET	Enterotoksijenik
E.coli	Esherichia coli
θ	Menfi
NaCl	Sodyum Klorür
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat



ŞEKİLLER

ŞEKİL	SAYFA
2.2. Konjugasyon.....	6
2.4. Sınıf I'e Ait Çembersel Bir R Plazmidinin Yapısı ve Oluşumu.....	12
2.4.1. Sınıf II'ye Ait Bir R Plazmidinin Bir Bakteri Hücresi İçinde Ayrı Ayrı Parçalar Halindeki Görünümü.....	12
2.5.1. R ₂₂₂ Bileşik Plazmidinin Transdüksiyon Bulgularından Yararlanılarak Hazırlanmış olan Çembersel Gen-Bağlantı Haritası.....	13
3.1. İzmit Körfezinde Numune Alınan İstasyonların Haritası.....	21
3.2.3. R Plazmidini Alan Bir E.coli K12'nin Antibiyogramı	32



ÇİZELGELER

ÇİZELGE	SAYFA
3.1. İzmit Körfezinde Numune Alınan İstasyonlar.....	20
3.2. Antibiyotik Disklerin İnhibisyon Alan Standartları.....	30
4.3. E.coli Suşlarının Soyutlandığı Kaynaklar.....	33
4.4. Kullanılan 8 E.coli Suşunun Antibiyogram Sonuçları.....	34
4.4.1. E.coli K12'nin Antibiyogramı.....	34
4.4.2. R Plazmidini Alan E.coli K12'nin Antibiyogramı.....	34
4.5. İzole Edilen E.coli Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık ve Dirençlilikleri.....	35
4.6. İzole Edilen E.coli Suşlarının Çoğul Antibiyotik Dirençliliklerine Göre Gruplandırılması.....	35
4.7. Konjugasyona Tabii Tutulmuş Verici ve Alıcı Suşlar ile Yapılan R Faktörü Aktarım Sonuçları.....	36
4.8. R Plazmid Aktaran E.coli Suşlarının Antibiyogram Sonuçları.....	36

1. GİRİŞ

Çeşitli antimikrobik ajanlara karşı, dirençliliğin invitro olarak enterik bakteriler arasında aktarılabileceği, ilk olarak Japonya'da gerçekleştirilmiştir. Ochiai ve Akiba (1959) izole ettikleri *Shigella flexneri* suşlarının büyük bir kısmının, 4 antibiyotiğe birden dirençli olduklarını, bu suşların aynı hastalardan izole edilen *E.coli* 'lerle aynı antibiyotik direnç modeline sahip olduklarını görmüşler ve bu direncin bir bakteriden diğerine geçmiş olabileceğini düşünerek, antibiyotik direncin blok olarak aktarılabileceğini isbat etmişlerdir.

Yapılan araştırmalar, bu bulaşıcı direnç özelliğinin bakteri kromozomu üzerindeki direnç genlerinden tamamen bağımsız olarak bakteri stoplazmasında bulunan ve Resistance Factor "R" faktörü denilen küçük bir dairesel DNA elementi ile ilişkili olduğunu göstermiştir."R" faktörü (Transfer faktör) Resistance determinantlarından yapılmış olup, aynı anda 7 antibiyotiğe direnç özelliğini birlikte aktaran konjugasyon ve nadiren transdüksiyon yolu ile duyarlı bakterilere taşınmaktadır (Akman, 1983).

"R" faktörü taşıyan bakteriler "R⁺ bakteriler" direnç genlerinin hepsini bir dakika gibi kısa bir süre içinde "R⁻ duyarlı bakterilere" geçirebilmekte, bu bulaşma sadece Gram(-) bakteriler arasında mümkün olabilmektedir. Antibiyotiklere olan dirençliliğin yanısıra plazmidler diye tanımlanan ekstrakromozomal genetik elementler bazı toksik ağır metal iyonları olan arsenik, civa, kobalt, nikel, gümüş ve tellurium tuzlarına karşı da dirençliliği sağlayan genleri taşımaktadırlar (Anderson, 1973 ve Akman, 1982).

Ağır metaller, bilhassa endüstri bölgelerinde çevreyi kirleten en önemli atıklar olup, bu toksik ağır metal bileşikleri yüzeysel sularda, nehir, göl ve deniz sedimentlerinde bulunmaktadır (Barth, 1965 ve İzgür 1981). Özellikle son yıllarda göl, nehir gibi yerlerde doğal ve yapay yollarla atıksuların arındırılması işlemleri sırasında ağır metallerin bakteriler tarafından biyolojik transformasyona uğratılarak toksik metal bileşiklerine dönüştürüldükleri de açıklanmıştır (Akman, 1979).

Ayrıca, antibiyotik ve metal dirençliliği fenomenlerinin birbirleriyle ilişkili olduğu, kontrolsüz olarak gerek tedavi ve gerekse fizyolojik amaçlarla kullanılan antibiyotiklerden ziyade, çevreyi kirleten metal kontaminantların, dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (İzgür, 1983).

Direnç aktarımı hem *invivo*, hem de *invitro* şartlarda meydana gelmesine rağmen, *invitro* şartlarda daha çabuk gerçekleşmektedir. "R" faktörünün, enfekte insan barsağı içinde enterik patojenlere transfer edilebilmesi önemlidir. Daha önemlisi ise; insan barsağında zararsız olan dirençli bakterilerin diğer organlarda enfeksiyona yol açabilmeleridir (Çetinkaya, 1973).

Bu nedenle, insan sağlığının doğal koruyucuları olan antikorlar gibi, doğanın koruyucu antikorları olan bazı mikroorganizmalar da, kirliliğin olduğu bölgelerde ortaya çıkıp yoğunlaşmakta ve onları yok etmeye çalışmaktadır. Teknolojik atıklar, başta üzerinde yaşadığımız ve gıda gereksinimimizin hemen hemen tamamını sağladığımız toprak olmak üzere, denizler, göller, akarsular ve yeraltı su kaynaklarını sürekli kirletmektedir. Bu kirliliklere bağlı olarak yeni hastalıklar ortaya çıkmakta veya var olan bazı hastalıkların da etkinliği artmaktadır (Bilim ve Teknik Dergisi, 1991).

Mikrobiyolojik kirlenmeye neden olan patojenik mikroorganizmaların tümünü ayrı ayrı tesbit etmek pratik açıdan çok zor olmaktadır. Bununla birlikte, kirlenmenin boyutu patojenik mikroorganizmaların indikatörü sayılan koliform bakterilerin konsantrasyonunu tesbit etmekle yapılmaktadır. Patojenik mikroorganizmaların konsantrasyonu ise, atıksuların deniz suyu içerisinde seyrelmesi ile giderek azalmaktadır.

Bu çalışmada, İzmit körfezindeki çeşitli bölgelerden alınan deniz suyu örneklerinden izole edilen *E.coli* suşlarının bazı antibiyotiklere dirençliliğinin saptanması ve bu dirençliliğin "R" faktörleriyle, "R" plazmidleriyle ilişkisinin araştırılması ve aynı örneklerde koliform bakterileri varlığının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Körfezden izole edilen koliform bakterilerden olan *E.coli*'lerde direnç aktarımı, birden çok antibiyotiğe karşı direnç sağlayan ve bu direnç genlerini ihtiva eden "R" plazmidleri ile olmaktadır. Böylece, herhangi bir antibiyotiğe karşı direnç göstermeyen ve duyarlı olan bakteri bu yolla dirençli hale gelmiştir. Tüm ilaçlara karşı hassas olan ve normal barsak florasında bulunan *E.coli*'ye "R" faktörünün diğer Gram(-) bakterilerden konjugasyonla aktarımı da mümkün olmaktadır. Bu durum, sudan insana geçen ve gastrointestinal sistemde bazı hastalıklara neden olan bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan etkili antibiyotiklerin tesbitinde ikinci önemli unsur oluşturmaktadır.

Ayrıca bu çalışmayla, konjugasyon sonucu oluşan yeni rekombinant türün etkili olduğu ve farklılık gösterdiği antibiyotikleri de belirlemeyi amaçladık.

2. KONU İLE İLGİLİ KAYNAK ARAŞTIRMASI

İzmit Körfezinde Deniz Kirlenmesine sebep olan *E.coli* varlığı ve Körfezden izole edilen *E.coli*'lerde R plazmidlerine bağlı, "Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç" özelliğinin aranması ile ilgili kaynaklar aşağıda 11 başlık altında incelenmiştir.

2.1. Genel Bilgiler

Eski Çinli'lerin, M.Ö.2500 yıllarında çiban, fronkül, abse gibi lokal hastalıkların sağıtımında çeşitli bitki ve mantarlardan elde ettikleri küflerden yararlandıklarına ilişkin belgeler vardır. Küflerle bakteriler arasındaki antogonizma ilk kez, Pasteur ve Jouberte tarafından ortaya konulmuştur. Bu antogonizmanın sağıtımında kullanılabilceğini ilk kez Duchesne önermiştir. Weigert (1875) anilin ile bakterileri boyamış ve daha sonra da Ehrlich (1885) lökositlerin çeşitli türlerinin, boyaları değişik şekilde aldıklarını göstererek kimyasal ajanların bakterilere karşı selektif etkileri olduğunu kanıtlamıştır (Akman, 1976 ve Çetin, 1973).

Enfeksiyon hastalıklarının sağıtımında kullanılan kimyasal ilaçlar çağı olan, kemoterapi çağı, Paul Ehrlich'in (1885) çalışmalarıyla başlamıştır. Bu araştırmacı, mikroorganizmalar üzerinde çok küçük konsantrasyonlarıyla bile zararlı etki gösteren, buna karşın insan veya hayvan organizmasına karşı toksik etkileri bulunmayan ve tıp alanında sağıtım amacıyla kullanılan kimyasal maddelere "Kemoterapötik veya Antimikrobik Ajanlar" adını vermiştir.

19. yüzyıl sonlarında Paul Ehrlich (1965), bakteriyolojide değişik amaçlarla kullanılan boya maddelerinin antiseptik aktivite gösterdiklerini gözledi. İlk sistemik modern kemoterapötikler olan, Tripan mavisi, Atoksil, Triparsamid ve Salvarsan gibi ilaçları bulmuştur. Bakteri enfeksiyonlarının sistemik olarak verilen kemoterapötiklerle sağıtımını Domagk (1932) tarafından bir azo boyası olan Prontosil'in sıçanlarda deneysel olarak *Streptokok* enfeksiyonlarına karşı etkinliğinin bulunması ile başlamıştır. Trefouel (1937) Prontosil'in vücutta esas etkin bileşik olan *Sulfanilamid'e* dönüşmesi suretiyle etkin hale geldiği, antibakteriyel etkisi çok daha güçlü ve toksisitesi düşük olan Sulfanilamidlerin yapılmasına yol açtığını saptamıştır

Oxford'da Florey'in (1939) başkanlık ettiği bir grup araştırmacı ve Fleming (1929) bazı *Stafilokok* suşlarına antibiyozis gösterdiği saptanan bir yeşil küf mantarı olan *Penicillium notatum* kültürlerinden elde ettikleri ilk antibiyotik olan *Penicillin*'i kemoterapiye soktular. Takibeden yıllarda çeşitli bakterileri, aktinomisetleri, fungusları içine alan binlerce mikroorganizma türü üzerinde yapılan çalışmalar, farklı etki spektrumlarına sahip birçok antibiyotiğin bulunmasına neden olmuştur (Kayaalp, 1978).

Önceden, antibiyotikler kemoterapötiklerden ayrı bir grup olarak nitelendirilmekteydi, bugün ise sentez yoluyla elde edilmesiyle kaynağa ilişkin farklılık ortamdan kalkmış ve bu nedenle antibiyotikler, kemoterapötikler içinde değerlendirilmiştir (Aydın, 1978).

Son yıllarda yapılan araştırmalarla, mikroorganizmaların çeşitli antibiyotiklere karşı direnç kazandığı ortaya konulmuştur. Antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların, hayvanlardan hayvanlara veya hayvanlardan insanlara geçebileceği ve antibiyotiklere direnç özelliklerini "*plazmid*" adı verilen ekstrakromozomal genetik elementler yardımıyla bir bakteriden diğer bakteriye aktarılabilceğinin anlaşılması ile insan ve hayvanlardaki bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotiklerin dikkatli kullanılması ve seçilmesi gerektiği belirtilmiştir. Antibiyotiklere direncin yanısıra, endüstriyel atıkların önemli bir bölümünü oluşturan ağır metal tuzlarına karşı da dirençli suşların olduğu bilinmektedir (Barkay, 1985).

Mikroorganizmalarda meydana gelen dirençlilik; yanlış antibiyotik seçimi, yetersiz süre ve dozda kullanımı, mikroorganizma tarafından sentezlenen ve antibiyotiğin parçalanmasına yol ačan enzimler, hücre zarının geçirgenliğinin değişmesi, mikroorganizmanın yapı birimlerinde oluşan değişiklik, kimyasal reaksiyonların basamaklarında oluşan farklılık, enzimlerin bloke edilmesi veya bazı enzimlerin dışardan hazır alınması gibi faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Oluřan bu dirençlilik kromozomal, ekstrakromozomal ve çapraz dirençlilik olarak sınıflandırılmaktadır.

Bir mikroorganizma, antibiyotiklere karşı ya spontan mutasyonla veya seleksiyonla dirençli hale gelebilir. Dirençli bir bakteriden duyarlı bir bakteriye genetik bilginin nakledilmesiyle de direnç özelliği kazanılabilir. Mutasyonel veya kromozomal dirençlilik halinde, kemoterapötik maddenin etkisiyle veya etkisi olmadan bir bakteri geninin bozulması ya da yerinin değişmesi sözkonusudur. Bu direnç türünde bakterinin bazı antibiyotiklerle karşılaşmış olma zorunluluğu yoktur. Dirençlilik her ilaç ve bakteriye göre değişen özellikler gösterir.



Kromozomal genlere bağı dirençlilik, bir mutasyon sonucu ortaya çıkabileceği gibi, diğr mutant bakterilerden konjugasyon, transdüksiyon veya transformasyon yoluyla aktarılan kromozom parçası üzerindeki, mutant genlerin bakteri kromozomuna bağlanması ile de oluşabilir (Dökmeci, 1979).

Genel olarak, antibiyotiklere dirençli suş oranlarındaki artıştan sorumlu olan, tüm bakteri toplumlarında, doğal olarak antibiyotiklere dirençli bireylerin bulunması; kullanılmaya başlanan her yeni antibiyotiğe karşı duyarlı olan bakterilerin ölmesi, üremelerinin önlenmesi, buna karşılık dirençli bireylerin çoğalma olanağı bularak, bir süre sonra toplumda egemen duruma gelmesidir. Burada dirençli mutantlar seleksiyona uğramış olup, bu tip direnç özelliği kromozom üzerindeki genler tarafından yönetilmektedir (Bilgehan, 1984 ve Ertong, 1983).

Kazanılmış dirençlilik halinde, kemoterapötik ilaç bakteri ile ilk temas ettiğinde, ilaç bakteriye karşı etkilidir. Ancak tekrarlanan temaslardan sonra, bakteride ilacın antibakteriyel etkisine karşı bir dirençlilik gelişir. Bu nedenle başlangıçta çok küçük dozlarda bir bakteriyi etkileyebilen bir antibiyotik kısa veya uzun bir süre sonra o bakteriye etkisiz hale gelebilir.

Dirençlilik, bakterinin kemoterapötiklerle invitro koşullar altında karşılaşmasıyla gelişebileceği gibi, invivo koşullarda karşılaşmasıyla da gelişebilir. Bir kemoterapötik çeşidine karşı duyarlılığını kaybeden bir bakteri türü, buna yakın kimyasal yapıda olan veya benzer etki mekanizmasına sahip bulunan diğr bir kemoterapötiğe karşı da dirençlilik kazanabilir. Bu olaya çapraz dirençlilik denir. Kromozom dışında bulunan ve plazmid adı verilen küçük DNA yapılarına bağı genler tarafından yönetilen, bir bakteriden diğrine bir bulaşıcı etken gibi kolayca bulaşabilen bu direnç tipi, günümüzde insan sağlığı ve tedavi edici hekimlik açısından büyük bir tehlike haline gelmiştir. "R faktörleri" ya da "RTF faktörleri" denilen bu plazmidler tarafından yönetilen direncin en önemli özellikleri şöyle özetlenebilir.

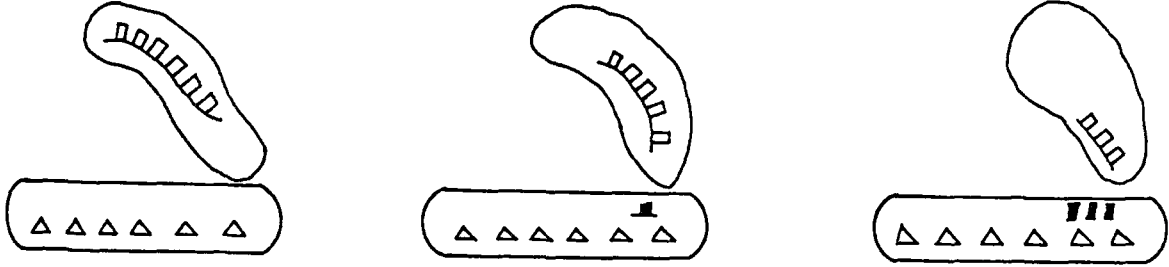
1. Bu tip direnç, genellikle birden fazla antibiyotiğe karşı oluşmaktadır. Tek bir R faktörü, çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç özelliğini blok halinde taşıyabilmekte ve bir bakteriden diğrine bulaştırabilmektedir.

2. Bulaştırma çoğunlukla konjugasyon yolu ile olmakta, 1 dakika gibi çok kısa bir süre içinde tamamlanabilmekte, bir bakteri toplumu 50 dakika da tüm antibiyotiklere dirençli hale gelebilmektedir.

3. Bu bulaşma, Enterobacteriaceae familyası içinde bir bakteri türünden diğrine örneğin, *E.coli*'den *Salmonella* ya da *Shigella*'lara; bir *Salmonella*'dan bir *Proteus* ya da *E.coli* veya *Shigella*'ya olabilmektedir (Akn, 1982).

2.2. Konjugasyon

Dirençliliğin bulunduğu hücreden, hassas hücreye nakli için, dirençli ve hassas hücrelerin temas etmeleri gerektiği bir başka deyişle dirençliliğin konjugasyonla aktarıldığı sonucuna 1960 yılında varılmıştır. Bakteriler arasında direkt temas ve köprü oluşması suretiyle verici DNA segmentleri alıcı hücrelere geçmektedirler. Böylece genetik materyalin transferi için F faktörü denen ve birleşmeyi sağlayan bir seksüel pili gerekir. F⁺ bakteriden F⁻ bakteriye bu pili aracılığıyla plazmid aktarılır (Şekil 2.2.).



Şekil: 2.2. KONJUGASYON

Konjugasyon olayı, *Esheria*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia* ve kesin olmamakla birlikte *Streptomyces* türlerinde saptanabilmiştir. Gram(+) bakterilerde yüzey katlarının yapısındaki farklılıktan dolayı konjugasyon yolu ile genetik madde aktarımı olmaz, sadece Gr(-) enterik bakteriler de konjugasyonla gen aktarımı sağlar (Mitsunashi, 1960).

Konjugasyon yapan bakteriler arasında genetik madde aktarımı daima belirli bir bakteri hücrelerinden diğerine doğru olmakta ve olay bu bakımdan yüksek canlılardaki cinsel birleşmeye benzemektedir. Yani, konjugasyon karışımlarındaki bazı bakteri hücreleri daima erkek karakterlerini korumakta ve bu yeteneklerini kalıtsal bir özellik olarak yeni kuşaklarında da sürdürmekte olup, konjugasyon esnasında genomlarının bir bölümünü karşı hücrelere aktarmaktadırlar. Bu konuda yapılan ilk çalışmada, dizanteri salgınında aynı antibiyotiklere çoklu direnç gösteren *E.coli* ve *Shigella* basilleri aynı hastada bulunmuş olup bu çoklu direncin *E.coli*'lerden *Shigella*'ya plazmidler ile aktarıldığı tesbit edilmiştir.

Konjugasyon esnasında, verici hücrelerden alıcı hücelere sadece genetik maddeler (F faktörü ve kromozomal DNA) transfer edilmektedir. Olayda, stoplazma maddeleri alıcılara geçmemektedir. Vejetatif fajların, enzimlerin, enzim substratlarının ya da enzimlerin ön maddelerinin konjugasyon esnasında karşı hücelere geçtikleri belirtilmiştir. Görülüyor ki, konjugasyon bir kanaldan geliş güzel bir madde akışı değil, DNA'ya özgü çok seçici bir işlemdir.

Bakteri hücrelerini konjugasyon yapmaya yönelten genetik elementlere, genel olarak "seks faktörleri, fertilitate etkenleri veya transfer elementleri" denilmektedir. Bunlar, bakteri hücreleri içinde bağımsız elementler halinde bulunabildikleri gibi, bazı plazmidlerin bir parçaları olarak da varlıklarını sürdürebilirler (Arda, 1978).

Bu gibi genetik elementler, içinde buldukları hücelerin F pilusları yapmasını, R plazmidleri gibi elementlerin konjugasyonla karşı hücelere geçmesini sağlarlar. Transfer elementini içeren plazmidlerin konjugasyonla bakteriler arası transferinde, aktarım esnasında plazmidin kopyası oluşmakta, oluşan polinükleotid iplikçiklerinden birisi karşı hücreye geçmektedir. Aktarım olayı devam ederken, hem verici hemde alıcı hücre içinde DNA iplikçiklerini tamamlayıcı yapıda olan yeni polinükleotid iplikçikleri sentezlenir. Aktarım biter bitmez oluşan bu yeni ve çift iplikçikli DNA molekülleri "ligaz" enziminin etkisiyle genellikle çembersel bir biçim alırlar. Bu olayda, hiçbir stoplazma bölümü ya da hücre içi elementi alıcı hücreye geçmez, konjugasyon olayının bitimini takiben hüceler birbirinden ayrılırlar, bu şekilde aynı plazmidin iki eş kopyasını içeren, iki bakteri hücresi oluşmuş olur (Akman, 1983 ve Aydın, 1978).

Diğer hüceler daima dişi davranışı göstermekle birlikte, kromozom segmentlerini başka hücelere aktaramazlar, sadece verici durumdaki bakterilerden genetik maddeleri alabilirler. Yani bakterilerdeki konjugasyon olayında cinsel bir kutuplaşma veya cinsel bakımdan bir farklılık sözkonusudur. Bakteriler arasındaki çaprazlama olaylarının sonunda yenibileşen bireylerin oluşması için atasal hücelerden sadece dişi durumda olanların canlı kalması gerekmektedir, yüksek canlılarda olduğu gibi erkek hücrenin konjugasyondan sonra ölmesi zigot oluşumunu etkilememektedir.

Verici ve alıcı olarak davranan bakteriler arasında yapı, yüzey ve antijenite özellikleri bakımından belirli farklar olduğuna inanılıyor. Yüzey yapıları arasındaki farklar, özellikle erkek hücelerde F- pilus denilen özgül uzantıların bulunması ve bunlar dişi hüceleri hiç etkilemeyen erkek hücelere özgü RNA fajlarına duyarlı oldukları için kolayca isbatlanabilmiştir (Bilgehan, 1987).

Erkek hücelere özgü fajlar, bir bakteri hücrelerinin erkek davranışlı olduğunu gösterme de yararlı olurlar, bu gibi fajlar sadece erkek bakterilerle birlikte ekildiklerinde plaklar oluştururlar, dişi hücelere özgü olan fajlar ise, sadece alıcı suşları etkilerler ve bu suşlar üzerinde plak oluşturabilirler. *E.coli*'lerdeki cinsel farklılığın ilginç bir yönü erkeklik özelliğinin hüceler içinde bulunan ve F faktörü denilen bir genetik elementle ilişkili olmasıdır. İçlerinde F faktörü bulunan hüceler konjugasyonda erkek olarak davranırlar; bu faktörü içermeyen bakteriler ise dişi bakterilerdir.



E. coli K12 suşu prototrof bir bakteridir. Üremesi için, üreme faktörüne ihtiyaç duymaz. Sadece su, mineraller ve karbonhidrat içeren besiyerlerinde bütün enzimlerini, vitaminlerini ve proteinlerini sentezleyerek üreyebilir (Bilgehan, 1987).

E. coli K12'nin F faktörü yaklaşık olarak *E. coli* kromozomunun 1/50'si kadar uzunlukta, molekül ağırlığı 5×10^7 Dalton olan küçük, çift sarmallı DNA'dan yapılmış çembersel bir yapıdır. *E. coli*'lerde kromozomal bilgilerin naklini sağladığı tesbit edilen F (Fertility-Dölleyicilik) faktörünün, çoklu dirençliliğin naklinde rol oynayıp oynamadığını cevaplamak için Mitsuhashi ve ark. (1960) F⁻ (fertilite faktörü taşımayan) ve çoklu dirençlilik taşıyan *E. coli*'lerle, F⁻ ve bu ilaçlara hassas *E. coli*'ler kullanarak bir seri deneyler yaptılar. Bu deneyler sonunda çoklu dirençliliğin F⁻ hücreler arasında nakledilebildiği saptanarak, bu naklin F faktörünün varlığına bağlı olmadan yapılabildiği tesbit edilmiştir

Watanabe ve Fukusawa (1961) *E. coli K12*'nin değişik mutantlarını kullanarak yaptıkları deneylerde, dirençliliğin kromozomal işaretlerden bağımsız olarak hücreler arasında nakledildiğini gösterdiler ve yine bu deneylerde nakil olayının hücrelerin üreme hızını etkilemediği ve dirençliliğin epizomal bir yapı tarafından sağlandığı belirlenmiştir. Bakteri DNA'sına entegre halde bulunan yapılara epizom ve serbest halde bulunanlara ise plazmid adını vermişlerdir. Aynı araştırmacılar, R plazmidleri üzerlerinde ilaçlara karşı direnç genleri taşıyan ve böylece buldukları mikroorganizmaya, o ilaca karşı dirençli olma özelliği kazandıran elementler olarak tanımlamaktadırlar. Plazmidler, bir bakteriden diğerine çeşitli yollarla geçebilirler. Bu yollar genellikle Gram(-) bakteriler için konjugasyon ve Gram(+) bakteriler için transdüksiyon yöntemlerinden oluşmuştur.

2.3. Antibiyotiklere Direnç Olayı

Antibiyotiklerin tedavide kullanılmasından sonra direnç sorunu ortaya çıkmıştır. Bu konuda ilk bulgu, 1940 yılında *Penisillin*'e dirençli suşların bulunması ile olmuştur. Daha sonra *Sulfonamid*'lerin etkinliklerini kaybettikleri gözlenmiştir. 1950'lerden sonra *Sulfonamidler*'in yerine kullanılan *Tetracycline*, *Chloramphenicol* ve *Streptomisin* zamanla etkinliklerini kaybetmişlerdir. Örneğin; *Oksitetracycline* direnç kazanan bir bakteri bu maddeye benzer kimyasal yapıda olan *Tetracycline*, *Clortetracycline* ve *dimetilclortetracycline* karşıda direnç kazanabilir. *Tetracyclin*'lere direnç kazanmış Gr(-) bakteriler genellikle *Chloramphenicol* antibiyotiğine de direnç gösterirler (Akman, 1976).

Gr(-) bakterilerde ve yeni çalışmalara göre bazı Gr(+) bakterilerde, kromozomal dirençlilikten ayrı olarak değişik bir direnç oluşum mekanizmasının varlığı bilinmektedir. Bu tip dirençlilik kromozoma bağlı mutasyonel dirençlilikten

farklı olarak, bakteriler arasında bulaşarak yayılmaktadır. Bazı bakteri türleri, belirli bir ilaca karşı doğal olarak dirençli olabilirler. Bu doğal dirençlilik olayı, fenotipik dirençlilik veya adaptasyon olarak tanımlanabilir. Metabolik bakımdan aktif olmayan bir hücre metabolik faaliyetleri engellenmediğinden antibakteriyel etki gösteren ilaçların etkisinden korunmuş olacaktır. Nitekim *Penisillin*'in etki gösterebilmesi için bakterilerin bölünmesi şarttır (Berkman, 1981).

2.3.1. Antibiyotiklerin, gerek bakterinin üremesini ve gelişmesini önlemesi, gerekse bakteriyi öldürmesi şu mekanizmalarla olmaktadır.

2.3.1.1. Bakteri hücre duvarının sentezini önlemek ve litik enzimleri aktive etmek suretiyle etki

Bakteri hücresi, tüm hücrelerde bulunan (lipoprotein yapısındaki) stoplazma membranına ilave olarak bu membranın dış yüzünü örten rijid bir hücre duvarına sahiptir. Bu sertlik, mürein denilen peptidoglikan veya mukopeptid yapısında bir maddenin bulunması ile ilgilidir.

Hücre duvarındaki mürein incelendiğinde; yapıtaşları birbiri ile tam olarak birleşmiş olduğundan, hücreyi çevreleyen dev bir molekül biçiminde görülür. Bu sert hücre duvarı tabakasına, mürein kesesi (mürein sacculus) denir. Mürein molekülü, N-asetil glukozamin, N-asetil muramik asit, amino şekerlerinden ve muramik aside bağlı bir peptid zincirinden yapılmıştır. Peptid zinciri genellikle D-alanin, D-glütamik asit, Lizin veya di-amino pimelik asidin D ve L şekillerinden meydana gelmiştir. Bazı türler de glisin, serin, ornitin veya aspartik asit'de mevcuttur. Hücre duvarı, bakteriyi dış etkilere ve iç ozmotik basınca karşı korur. Gram(+) bakterilerde; hücre duvarının %50-90'ı mukopeptid'den Gram(-) bakterilerde ise; sadece %5-10'u mukopeptid'den yapılmıştır. Hücre duvarı, hücrenin ozmotik dayanıklılığını sağladığından Gr(+) bakterilerin ozmotik basıncından daha azdır. Gram(+) bakterilerin hücre duvarında ayrıca, polisakkaritler ve teikoik asitler de vardır. Protein, ancak kapsül içinde veya ince bir kapsül tabakası halinde M protein olarak bulunur. Bazı antibiyotikler, bakteri hücre duvarının sentezi ile ilgili biyokimyasal reaksiyonları bozarlar. Böylece hücre duvarı oluşamayacağı için bakteri hücresi ölür. Bu tip ilaçlar, gelişmesini tamamlamış bakteriler üzerinde etkisizdirler. Çünkü bunlarda bakteri duvarı zaten oluşmuş durumdadır. Bu ilaçlar, özellikle gelişmekte ve üremekte olan bakteriler üzerinde bakterisid etki gösterirler. *Penicillin* ve *Sefalosporinler*; hücre duvarı sentezinde transpeptidasyonu önlerler. Hidrolitik enzimleri indükleyerek, hücre duvarını parçalarlar. *Sikloserin*, *Bacitrasin* ve *Vancomisin* hücre membranını tahrip ederek peptidoglikan prekürsörlerinin sentezini engellerler.

2.3.1.2. Stoplazma membranının permeabilitesini artırmak suretiyle etki

Stoplazma membranı, ozmotik bir engel görevi yapar. Bakteri için gerekli maddeler, bu ortamdan pasif difüzyon veya aktif taşıma suretiyle alınırlar. Deterjan özelliğine sahip yüzeyde aktif antibiyotikler stoplazma membranının permeabilitesini artırarak, stoplazma içerisindeki fonksiyonel önemi bulunan bileşiklerin hücreden dışarı sızmalarına neden olurlar. Böylece bakterisid etki gösterirler. *Polymyxin-B*, *Gramisidin*, *Amfoterisin B* ve *Nistatin* bu tipe örnektir. Hücre membranının trilaminer yapısına entegre olarak geçirgenliğini bozarlar.

2.3.1.3. Hücre içinde, ribozomlarda protein sentezini inhibe etmek suretiyle etki

Bu tür ilaçların antibakteriyel spektrumları genellikle geniştir. Çoğu bakteriyostatik olup, Gram(-) ve Gram(+) mikroorganizmaların gelişmesini engellerler. Bazıları ise bakterisid etki yapabilirler.

Antibiyotikler, protein sentezi veya mRNA'nın deşifre edilmesi olayı ile ilgili çeşitli kademeleri bozabilirler. Böylece bakteri hücresi için gerekli olan proteinlerin ve enzimlerin sentezini engellerler. Bu ilaçların ribozomlardaki etki biçimleri şu şekildedir:

- a. Aminoasitlerin aktivasyonu yani tRNA'ya bağlanmasını inhibe edebilirler.
- b. mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını veya aminoasil-RNA kompleksinin, ribozom-mRNA kompleksine bağlanmasını inhibe edebilirler.
- c. Peptidil transferaz etkinliğini azaltarak aminoasitlerin tRNA'dan büyüyen peptid zincirine aktarılmasını inhibe edebilirler.
- d. mRNA üzerindeki kodonların tRNA'lar tarafından yanlış deşifre edilmesine neden olabilirler.

2.3.1.4. Genetik materyal içinde DNA sentezinin veya DNA kontrolü altında yapılan RNA sentezinin bozulması ile oluşan etki

Bu gruptaki ilaçların bir kısmı memeli hücresinin çekirdeğini de etkilediğinden sitotoksik ilaçlardır. Bunların antibakteriyel etkileri olmasına rağmen, çoğu bu amaçla kullanılamazlar. Bir kısmı antineoplastik olarak malign tümörlerin tedavisinde kullanılırlar. Memeli hücresi üzerinde fazla toksik olmayan *Rifamisinler* antibakteriyel ilaç olarak kullanılırlar. Çünkü, RNA polimerazın β ünitesine bağlanarak, DNA'dan RNA sentezini engeller (Akman, 1983).

2.3.1.5. İntermediyer metabolizmayı bozmak suretiyle etki

Bu şekilde etki yapan antibakteriyel ilaçlara örnek olarak *Sulfonamid*'ler, *Sulfon*'lar, *Trimethoprim*, *p-aminosalisilikasit* ve *İzoniazid* verilebilir. Bunlar, bakterinin metabolizması için gerekli bazı maddelerin sentezini önlerler. Bu antibiyotikler bakteriler için antimetabolit niteliğinde olan maddelerdir (Watanabe, 1963 ve Aydın, 1978).

Yapılan çalışmalar özellikle *E.coli*'lerde olmak üzere diğer basiller arasında da R plazmidlerine bağlı çoklu direnç aktarımlarının yaygın olduğunu göstermiştir. Çalışma konumuz *E.coli* K12'nin F faktörü ve direnç plazmidleri ile ilgili olduğundan sadece bu plazmid üzerinde durulacaktır.

2.4. R Faktörleri (Direnç Plazmidleri)

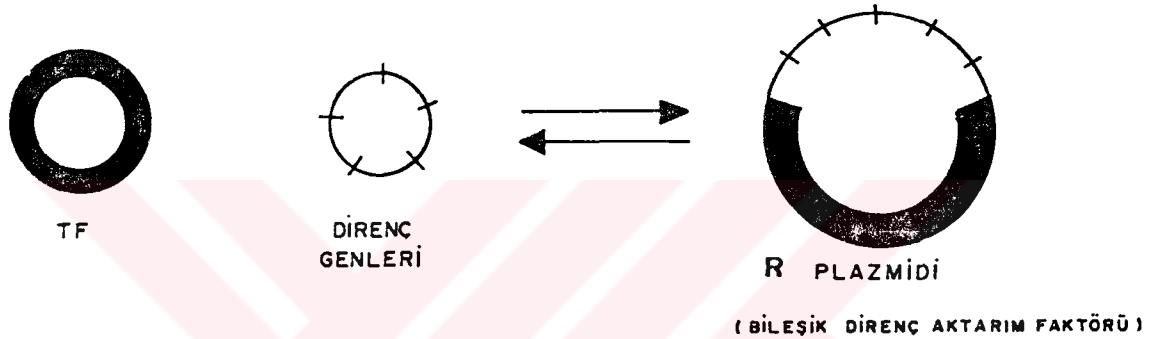
Enterik bakterilerde saptanan bir direnç tipinde, dirençlilik özelliğinin bir virtüs gibi dirençli bakterilerden duyarlı bakterilere bulaştırılabildiğini belirtmiştik. İşte bulaşıcı tipte antibiyotik direnç özelliğinden sorumlu olan bu bileşik yapılı plazmidlere, direnç aktarım etkenleri (Resistance Transfer Factors) ya da R plazmidleri denilmektedir. R plazmidleri, bir transfer etkeni ile ilaçlara direnç özelliğini kontrol eden kromozom dışı genleri taşıyan küçük ve çoğu çembersel biçimli DNA elementleridir. Bileşik plazmidler olup bir transfer elementi ile antimikrobik maddelere direnç özelliğini yöneten genlerden yapılmış olan iki parçadan ibaret olduğu bilinmektedir (Akman, 1972 ve Anderson, 1965).

Daha sonraki yıllarda, İngiltere'de Datta, Meynell ve Anderson'un (1972) çalışmalarını çeşitli ülkelerde yapılan çok sayıda çalışmalar izledi. Bu çalışmalarla dünyanın hemen her ülkesinde *E.coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Pasteurella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia* ve *Yersinia* suşlarında bu tip direncin yaygın olduğu anlaşıldı.

R plazmidleri tarafından yönetilen bulaşıcı tipte antibiyotik direnç varlığının, doğada bakteriler arasında hızla yayılmakta olduğu ve yayılmanın yalnızca tür içi olmayıp değişik bakteri cinsleri için de sözkonusu olduğu saptanmıştır. R plazmidini içeren R(+) bakteriler; genellikle çoklu direnç gösterirler ve birbiriyle ilişkisi olmayan, birbirine karşı çapraz direnç sağlayamayan 8-10 antibiyotiğe birden dirençli durumda bulunurlar. R(+) bakteriler; çoklu direnç özelliklerini konjugasyonla ve transdüksiyonla, temas ettikleri duyarlı Gr(-) bakterilere blok halinde geçirebilirler. Böyle bir bakteri hücresi, 7-8 antibiyotiğe karşı direnç özelliğini yaklaşık bir dakika gibi kısa bir süre içinde duyarlı olan bakteri hücrelerine aktarabilir.

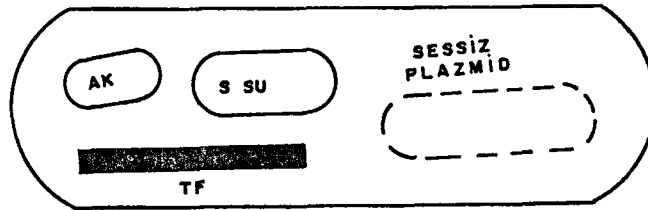
Bu çoklu dirençlilik özelliğini kazanan bakterilerde, dirençlilik özelliği, bulaşıcılık karakterini korumakta ve başka duyarlı bakterilere geçirilebilmektedir (Anderson, 1972).

Sınıf-I R Plazmidleri; Transfer elementi ile direnç genlerini birlikte içeren bir yapı halindedirler. Bazı deneylerde genetik elemanların değişik oranlarda olmak üzere ayrı ayrı veya hep birlikte kaybolabildikleri gözlenebilmekte ve bu olaya kendiliğinden ayrışma (spontan segregasyon) denilmektedir. Bu olayda konakçı genomu ile R plazmidini arasında, bir genetik değiş-tokuş olabileceği gibi, R plazmidinin kopyasının çıkması esnasında bölünmenin bilinmeyen bir nedenle tamamlanamaması ve sonuç olarak bazı yavru hücrelerin tam bir plazmid kopyasını alamamaları da düşünülebilir (Şekil 2.4).



Şekil: 2.4. SINIF I'E AİT ÇEMBERSSEL BİR R PLAZMİNİN YAPISI VE OLUŞUMU.

Sınıf-II R plazmidleri; Direnç genleri ile transfer faktör, bakteri hücreleri içinde birbirlerinden tamamen bağımsız durumdaki "replikonlar" halinde bulunup varlıklarını sürdürürler. Bu sınıftaki R plazmidleri direnç genlerinin tümünü ya da bir bölümünü konjugasyonla karşı hücrelere geçirebilirler. Genellikle bakteri hücrelerinde bir tane transfer faktör bulunabileceği sanılmaktadır, ancak "uyuşurluk gruplarına" bağlı olarak aynı hücre içinde birden fazla değişik plazmid bulunabilir (şekil 2.4.1).



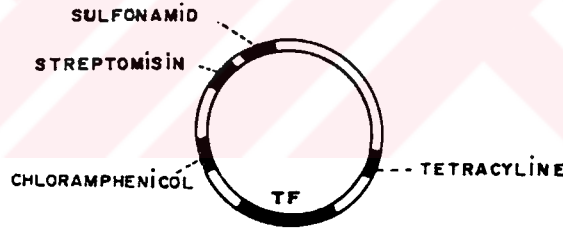
Şekil: 2.4.1. SINIF II'YE AİT BİR R PLAZMİDİ BİR BAKTERİ HÜCRESİ İÇİNDE AYRI AYRI PARÇALAR HALİNDE BULUNABİLİR.

Transfer faktör (TF) parçası, birçok bakımdan *E.coli K12*'nin F faktörüne benzer. Bu faktörü içeren bakteriler (TF) verici özellik taşırlar. Alıcı hücrelerle konjugasyon yapabilirler, cinsel piluslar oluştururlar ayrıca erkek bakterilere özgü fajlara karşı duyarlı durumdadırlar. Transfer Faktör, R plazmidinin tümünü ya da bir bölümünü konjugasyonla karşı hücelere aktarabildiği gibi seyrekte olsa konakçı hücrelerin kromozom segmentlerini ve bunlar üzerindeki bakteri genlerini alıcı bakterilere geçirebilmektedir (Akman, 1983).

2.5. R₂₂₂ Plazmidi ve Delta Faktörü (Δ)

2.5.1. R₂₂₂ Plazmidi

Japonya'da (1960) *Shigella flexneri* 2b suş: 222'de saptanmış olan bu plazmid, R100, RN1 gibi simgelerle gösterilmektedir. Genetik yöntemlerle birbirinden ayrılabilen S(*Streptomisin*), T(*Tetracycline*), Su(*Sulfonamid*) ve C(*Chloramphenicol*) olarak 4 ilaca karşı direnç genlerini taşıyan ve sınıf I'de bulunan bir plazmidir. Aynı zamanda civa iyonlarına ve bazı *Aminoglikozid* antibiyotiklerine de direnç sağlayabilmektedir. R₂₂₂ plazmidi fi+ bir plazmidir; F+ bakteri hücrelerine sokulursa verimlilik oranını azaltır (Şekil 2.5.1).



R₂₂₂ BİLEŞİK PLAZMİDİNİN TRANSDÜKSİYON BULGULARINDAN YARARLANILARAK HAZIRLANMIŞ OLAN ÇEMBERSEL GEN-BAĞLANTI HARİTASI.
Şekil 2.5.1.

2.5.2. Delta (Δ) Faktörü

F+ hücreler içinde bulunması halinde F plazmidinin işlevlerini etkilemeyen fi- bir plazmid'dir.



R plazmidleri araştırılırken, A(*Ampicilin*), S(*Streptomisin*), Su(*Sulfonamid*) ve T(*Tetracylin*)'e dirençli olan bir bakteri suşundaki direnç özelliklerinin R₂₂₂'dekinden farklı olarak bir bütün halinde aktarılamadıkları, *Ampicilin*'e ve *Streptomisin*'e direncin genellikle ayrı ayrı transfer edildikleri görüldü. Sadece uzun bir süre temas eden bakterilerde *Tetracylin*'e direnç özelliği bir bakteriden diğer bakteri hücrelerine geçirilebilmektedir. Deneyler, bu suşun direnç genleri ile TF elementinin ayrı ayrı transfer edilebildiğini gösteriyordu. Bu özellik, yapılan konjugasyon deneylerinde sadece TF ve direnç genleri içeren suşların izole edilmesi suretiyle kanıtlanmıştı. Bu özelliğinden dolayı faktör sınıf II olarak isimlendirilen plazmidlere uymaktadır (Akman, 1983).

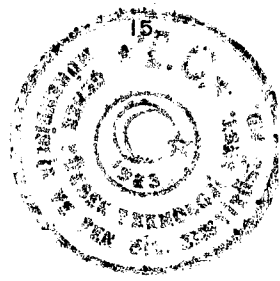
Anderson (1972), bu bakteri suşunda saptadığı transfer faktörüne Delta (Δ) faktörü adını vermiştir. Davranışları R₂₂₂ plazmid'inden tamamen farklıdır. Transfer deneyleri sonunda *Amphicilin*'e direnç genini almış, fakat Δ faktörünü almamış oldukları belirlenen bakteri hücreleri yeniden Δ faktörü ile enfekte edilirse Δ direnç özelliğinin duyarlı bakterilere aktarabildikleri görülmektedir. Δ faktörü, doğada ilaçlara duyarlı olan bakteri toplumlarının çoğunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bunların varlığı, antibiyotiklere dirençli oldukları halde Δ içermeyen (direnç özelliğini başka bakterilere bulaştıramayan) hücrelerle temas halinde direnç genlerini harekete geçirip duyarlı bakterilere aktarılabilmesi özelliğinden yararlanılarak meydana çıkarılabilir.

Δ faktörü, hücre içinde bağımsız olarak replike olabilmektedir. T(*Tetracylin*) markerinin Δ faktöründen ayrılması ve bağımsız olarak aktarılması olanaksızdır. Bu ikisi çok sıkı bağlantılı olup daima birlikte hareket etmektedirler (Aydın, 1978).

2.6. R Plazmidlerinin Kökeni

R plazmidleri, kullanılan bütün antibiyotiklerin değişik kombinasyonlarına; civa, kobalt, nikel iyonlarına ve UV ışınlarına direnç sağlayan genleri taşıyabilmekte ve bu dirençlilik özelliğini duyarlı bakteri toplumlarına bulaştırabilmektedirler. Birçok kimyasal maddeye direnç özelliğinin çoğu kez blok halinde bakteri toplumları içinde yayılmasının koruyucu ve tedavi edici hekimlik yönünden yarattığı korkunç tehlike tartışılmayacak kadar belirgindir.

Belirli bir bölgede bakteri suşlarındaki çoklu direnç modelleri, sözkonusu olan bakterilerin çevrelerinde bulunan antimikrobik etkenin cinsi ile ilişkilidir. Yani, bu direnç modeli insanlar tarafından oluşturulmaktadır. R plazmidlerinin direnç belirten parçalarının, bakteri hücreleri içinde belirlenmiş olan DNA segmentleri olabileceği ileri sürülmektedir (Anderson, 1965 ve Akman, 1977).



2.7. R Plazmidlerinin Aranması

Bir bakteri suşunda, R plazmidlerinin bulaşıcı tipte antibiyotik direnç özelliğinin bulunup bulunmadığını arama yöntemleri şu şekilde özetlenebilir.

1. Bakteri suşunun antibiyotiklere dirençli olduğunu göstermek, direnç düzeylerini saptamak.

2. Biyokimyasal ya da genetik özellikleri bakımından bu dirençli bakterilerden ayırdedilebilecek (örneğin, belirli antibiyotiklere direnç, belirli aminoasitleri sentezleme veya laktöz gibi bir karbonhidratı fermente etme yeteneği bakımından farklı) mutant duyarlı bakterileri bu dirençli bakterilerle konjugasyona sokmak, karışımındaki verici bakterilerle, duyarlı bakterileri ve verici'lerden direnç özelliklerini almış olan alıcı bakterileri birbirinden ayırdettirecek yapıda hazırlanmış olan katı besiyerlerine ekmek. Bu metodla konjugasyon yolu ile dirençli bakterilerden, direnç özelliklerini almış olan alıcı bakteriler izole edilebilir.

3. Bu bakterileri saflaştırmak, dirençli verici bakterinin dirençli olduğu diğer antibiyotiklere karşı direnç gösterdiklerini isbatlamak ve değişik antibiyotiklere direnç düzeylerini saptamak.

4. Bu dirençli bakterilerin deneyde kullanılmış olan orjinal duyarlı alıcı bakteriler olduğunu kanıtlamak.

5. Dirençli duruma gelmiş olan alıcı bakterileri, yeni uygun bakteri suşları ile konjugasyona sokmak ve uygun yapıdaki seçtirici besiyerleri kullanmak suretiyle bu bakterilerdeki direnç özelliğinin bulaşıcı olduğunu ve başka bakterilere geçirilebileceğini isbatlamak.

Direnç aktarımı, 5 jenerasyon geçtikten sonra önemli ölçüde azalmaktadır. Bu durumun, R plazmidini almış olan bakteriler içinde, bir süre sonra baskılayıcı bir madde oluşmasına bağlı olduğu anlaşılmıştır. Hücreler içinde üretilen bu maddenin belirli yoğunluğa erişmesinden sonra toplumdaki R⁺ bakterilerden pek azı R plazmidlerini konjugasyonla karşı bakterilere geçirebilirler. Bu varsayım, R⁺ bakteri toplumlarından baskılayıcı madde yapımı bozulmuş olan mutant bireylerin elde edilmesiyle de isbatlanmıştır (Akman, 1979).

Bu mutantlar, baskılayıcı madde oluşturamadıkları için sık olarak konjugasyon ve R transferi yapmaya devam ederler. Baskılayıcının, konjugasyon için gerekli olan özgül pilusların sentezlenmesini engellemek suretiyle etki gösterdiği deneylerle isbatlanmıştır. Bu özelliğe dayanılarak, bakteri suşlarının R plazmidinin varlığı bakımından incelenmelerinde, R plazmidleri tarafından yapımı yönetilen cinsel pilusların ve bakterilerin özgül fajlara duyarlılıklarındaki değişikliklerin incelenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda, R plazmidlerinin toplumdaki bakterilerin daha büyük bir bölümüne geçirilmesini gerektiren hallerde, Yüksek Sıklıkta Aktarım Sistemi (YSAS, High Frequency of Transfer- HFTS) denilen bir sistem kullanılmaktadır.

Bu metod da R⁺ suşlar ara alıcı denilen bir duyarlı bakteri toplumu ile konjugasyona sokulur, bu toplumdaki hücreler R plazmidini alır almaz, hücreler de baskılayıcı oluşmasına zaman bırakılmadan bunlar esas alıcı durumundaki duyarlı toplumlara karıştırılıp arzu edilen yapıda hazırlanmış olan seçtirici besiyerlerine

ekilirler. Bu durumda, R plazmidlerini almış olan ara alıcıların hepsi (%100'ünün) dirençli hale gelmiş olan alıcıların seçirici besiyerlerinde kolayca izolasyonu mümkün olabilecektir (Akman, 1985).



2.8. Esherichia

Tüm reaksiyonlar 37⁰C'de 24h-48h içerisinde gerçekleşir. 1.1-1.5µm×2.0-6.0µm büyüklüğünde tek veya koloni halinde bulunurlar. Çoğunlukla küçük kapsüller ihtiva ederler. Gr(-) fakültatif anaerob türlerdir. Solunum ve fermentasyon yapma özelliği vardır. En yüksek olarak 37 ⁰C'de inkübasyon gerçekleştirir. D-Glukoz ve diğer karbonhidratlardan asit ve gaz oluşturur. Oksidase (-), Catalase (+), Methyl red (+), Voges-Proskauer (-), Citrate (-), H₂S, üre ve lipaz negatiftir. *Esherichia* türleri, nitratı indirger (Bilgehan, 1987).

2.8.1. E.coli

Diarhael hastalığının sebebidir. Ayrıca üriner sistem enfeksiyonları, aşılama ile meydana gelen hastalıklar (nosocomial enfeksiyonlar), kan zehirlenmesi (septisemi) ve menenjit hastalığına da neden olurlar. Somatik (O), Kapsüller (K) ve Flagellar (H) antijenleri içerirler. *E.coli* kolonileri, Nutrient agar besiyerinde, düz (S), konveks şekilli, sulu, gri renkte ve parlak yüzeyleri ile tuz ihtiva eden vasatta kolaylıkla teşhis edilirler. Ayrıca, bazan R formunda veya ara formda da gözlemek mümkündür. *E.coli* bakterisi, sitratı kullanmayıp glukoz ve diğer karbonhidratları fermentleyip pruvat ve sonuçta laktik asit, asetik asit ve formik asit üretirler. Bazı bakteriler de laktozu fermentleme olayı çabuk değildir. *E.coli*, üriner sistem enfeksiyonlarının en önemli etkenidir. Kadınlarda görülen Üriner Sistem Enfeksiyonlarının %90'ından sorumludur (Arda, 1985).

2.9. Plazmid-Epizom

Genetik inceleme yöntemlerinin gelişmesiyle, bakteri hücreleri içinde virüs kriterlerine uyan ve bakterilerin bazı özelliklerini kontrol altında tuttukları anlaşılan kromozom-dışı bazı genetik elementler saptanmıştır. Önceleri bakterilerin bazı özelliklerini yöneten ve kromozom yapısına girebilen bu genetik elementlere, kromozomdan ayırabilmek için Jacob ve Wollman tarafından *epizom* adı verilmiştir. Daha sonra Lederberg, büyük bir olasılıkla taban sıralanması homologluğu bulunmaması nedeniyle hiçbir zaman konakçı kromozomun yapısına giremeyen benzer elementlere plazmid adı verilmesini önermiştir (Aydın, 1978 ve Bilgehan, 1987).

Novick ve arkadaşları (1976) “epizom ve plazmid” deyimlerinin birbirinin sinonimi olarak kullanılmaması gerektiğini önermiş, Campbell (1962) bu elementlerin hepsine birden plazmid denmesini ve bunlardan bazılarının epizomal davranış gösterdiklerini kanıtlamıştır. Plazmidlerin çoğu özgül cinsel faktörlere sahiptirler ve içinde buldukları bakteri hücrelerine vericilik (donörlük) özelliklerini kazandırır. Hücreleri konjugasyona yetenekli hale getirerek kendilerinin ve daha seyrek olgularda konakçı kromozom segmentlerinin bu yolla alıcı (recipient) bakterilere transferini sağlarlar.

Plazmidler; konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon yolu ile bir bakteri hücresinden diğerine geçebilmektedirler. Bir bakteri genomunun küçük ya da büyük bir bölümünün, bazan da tümünün diğer bir bakteriye geçebildiği ve bu yolla her iki bakteri hücresinin genetik özelliklerini birlikte içeren “melez bakteriler” oluşabildiği bilinmektedir (Bilgehan, 1987).

Bu genetik madde alışverişin de rol oynayan “transformasyon” olayında, alıcı bakteriler ortamdaki çözünmüş olan DNA moleküllerini içlerine almaktadırlar. Atasal bakteri suşlarından birinin değişmez şekilde verici ve diğerinin alıcı rolü oynadıklarına ilişkin ilk bulgular Hayes (1952) tarafından elde edilmiştir. Eğer bir Gr(-) bakteri hücresi kendi kendine transfer yapabilen, diğeri yapamayan iki ayrı plazmid içeriyorsa, bunlardan ilki ikincisinde aktarımını sağlayabilir. Transfer elementleri seyrek olarak konakçı bakteri kromozomuna entegre olup, konakçı kromozomun segmentlerini de karşı hücrelere aktarabilirler. Böylece plazmidler, tipik epizomal davranış gösterirler. Plazmidler birer replikondurlar. Yani konakçı bakteri kromozomundan bağımsız olarak kopyeleri oluşur ve kendi bağımsız replikasyonlarını yöneten genleri içerirler.

Aynı karakterlere sahip, veya aynı gruptan olan iki plazmid aynı hücrede bulunmaz. Çünkü, bakterinin stoplazmik membranı üzerindeki yapışma yerinin spesifik ve aynı olması, aynı hücrede bulunmayı önler. Böylece plazmidlerle, süper enfeksiyon olamaz. Örneğin, *E. coli* K12 suşunda, F faktörü için bir, R faktörü için iki ve kolisin faktörleri için ise değişik yapışma bölgeleri bulunmaktadır.

Genel olarak prokaryotik hücrelerde, tabii olarak bulunan plazmidler hücreler için gerekli elementler olmadığı gibi hücre için zararlı bir etkileri de yoktur. Elementer cisimcikler, hücre tarafından yapılmaktadır, kendiliklerinden kaybolabildikleri gibi, hücre canlılığını etkilemeksizin giderilebilirler. Bu elementer cisimciklerin birçoğu seks faktörlerine sahiptir. Böylece içinde buldukları hücreye erkeklik özelliği kazandırarak hücrelerin konjugasyona yetenekli hale gelmelerini, dolayısıyla kendilerinin dişi karakterdeki bakterilere transfer olmalarını sağlarlar.

Plazmidler, hücreden çıkabilirler, plazmidler aktarılırken, bakteri DNA'sından başka herhangi bir stoplazma maddesi diğer hücreye geçmez. Plazmidlerin transfer olabilme yeteneği, bunların özel pilus oluşturma kabiliyeti nedeniyle sınırlandırılmaktadır. Bakteriler arasındaki aktarıma, 10^{-4} - 10^{-5} kadar olmakta ve ayrıca türlere özgü bir karakter göstermektedir. Bir koliform plazmidi, *E. coli*'den-*Proteus*'a 10^{-5} sıklığında transfer edilmesine karşın, *E. coli*'den-*E. coli*'ye aktarıma 10^{-1} - 10^{-3} arasında olup daha sıktır (Aydın, 1978).

R faktörü, konjugasyonu tenbih eden esas transfer faktör (TF veya RTF) ve çeşitli ilaçlara karşı dirençliliği tayin eden rezistans determinant (direnç genleri) olmak üzere iki bölümden oluşur. *E.coli*'de bu iki faktör tek bir ünite halinde bulunur. R faktörü, tek başına konjugasyonu hızlandıran genetik bir maddedir. Bir bakteriye, sadece (TF) geçerse, bakteri (TF-) bakterilerle konjugasyon yapma yeteneğine sahip olur. Buna karşılık yalnız direnç faktörü geçerse çeşitli ilaçlara dirençlilik kazanır.

Antibiyotiklerin özel selektif baskısı altında invitro olarak R faktörlerini çoğaltmak mümkündür. Fakat bunu invivo olarak analiz etmek güçtür. Zira barsak ortamı (anaerobik, PH, safra tuzları, yağ asitleri) konjugasyona elverişli değildir. Antibiyotik alındığında, antibiyotiğe duyarlı olan mikroorganizmalarda azalma, dirençli olanlarda ise bunların yerini alma ve çoğalma görülür (Arda, 1978 ve Chabbert 1976). Bu arada R faktörünün transferi de artar. Böylece barsakta R faktörünü taşıyan hücre çok fazla bir düzeye ulaşır. R faktörü, antibiyotiklerin rastgele ve çok fazla kullanılması sonucu yaygınlaşmıştır. İnsan ve hayvanlarda çeşitli antibiyotiklerin kullanılması, barsakta hücreler içinde ekstrakromozomal direnç genlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. R faktörü taşıyan patojenlerin oluşturduğu enfeksiyonları sağlamak oldukça güçtür.

Antibiyotik sağıtımı esnasında duyarlı bakterilerin çoğu ölür, dirençli olanlar ise kalırlar. Bunlar duyarlı olanların ortadan kalkmasından da yararlanarak ürerler ve hastalığın yayılmasına neden olurlar. Özellikle bu tarz enfeksiyonlara Gr(-) bakterilerden ileri gelen hastalıklarda *Streptomisin* sağıtımından sonra rastlanır, bu nedenle böyle hastalıklarda kombine ilaçların kullanılması zorunludur. Mutasyonlar sonucunda antibiyotiklere karşı dirençlilik kazanılabilir fakat bu özellik ekstrakromozomal nitelikte değildir (Watanabe, 1963).

2.10. Koliform Tanımı

Denizlerin mikrobiyal kontaminasyonu ile ilgili hastalıklar veya Talassojenik gibi kaynağı deniz olan insan enfeksiyonlarının etki şekillerinin ve referans yöntemlerinin belirlenmesi, deniz kirliliğinin kontrolünün yapılması, denizde mevcut olan endikatör özellik taşıyan koliformların tayini ile mümkündür. Koliform, *Esheria* sınıfına dahil bütün intestinal bakterileri tanımlayan bir terim olarak kullanılmaktadır. Total Koliformlar, +4°C'nin üzerindeki sıcaklıkta olan deniz suyunda güneş ışığıyla temas ederse zamanla ölürlür. Bu nedenle total koliformların, deniz suyundaki varlığı organik ve inorganik kaynaklı atıkların yoğunluğuna bağlı bir kirlenmeyi gösterir. Bunların zamanla ortadan kalkma oranı; tuz, sıcaklık ve güneş ışınlarına bağlı olarak değişir (Coşkun, 1993).

Bir su muayenesinde, patojen mikroorganizmaları saptamak en ideal yoldur. Ancak bunların aranmasının zorluğu ve uzun bir zaman gerekmesi ve bu patojenleri meydana çıkarmak her zaman mümkün olmadığı için koliform bakterilerin ve *E.coli*'nin aranması yoluna gidilmektedir. Koliformlar, insan ve hayvan dışkıdaki

bakterilerin çoğunluğunu teşkil ederler. Suda koliform bakteri bulunmaması o suyun temiz olduğuna, belirli bir sayıdan fazla bulunması ise tehlikeli olduğuna işaret eder.

Koliformlar, doğrudan doğruya büyük bir tehlike teşkil etmeseler de, tehlikeyi haber verirler. Bunun yanında *E.coli*'nin bazı serotipleri insanlarda apandisit, peritonitis, ürogenital organ enfeksiyonları, özellikle çocuklarda gastroenteritisin ve hayvanlardaki bazı hastalıkların nedeni olabilmektedir (Keskin, 1990).

2.10.1.Total Koliformlar

Aerobik ve fakültatif anaerobik, Gr(-) spor oluşturmeyen, laktozu 35°C'de 48 saatte asit ve gaz oluşumu ile fermente eden çomakçıklardır. Bu şartlar altında total koliform kolonileri, pembeden metalik parlaklık veren koyu kırmızıya kadar değişen renklerde ve büyüklükleri toplu iğne başından normal koloni büyüklüğüne kadar değişen büyüklüklerde görünürler. Laktoz negatif koloniler renksizdirler. İnsan ve hayvanların dışkısında ve doğada; bitkilerde, toprakta çok yaygın olarak bulunan total koliform kapsamında, *Esherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Citrobacter* türleri bulunmaktadır. Bunlardan *Esherichia* türü fekal kirlilik göstergesidir. *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Citrobacter* de çoğunlukla toprak ve bitki kaynaklıdır (Coşkun, 1993).

2.10.2.Fekal Koliformlar

Aerobik ve fakültatif anaerobik, Gr(-) spor oluşturmeyen çomakçıklardır ve laktozu hem 35°C'de hemde 44.5°C'de 24 saatten daha az zamanda asit ve gaz oluşturarak fermente ederler. 44.5°C'de triptophane içeren tryptone water'da indol oluştururlar. Fekal koliformlar mavi koloniler olarak görülürler (Coşkun, 1990).

2.11. Endikatör Kaynakları

Patojenik mikroorganizmaların potansiyel kaynakları, körfez ve kıyı sularında mevcuttur. Gerçekte insanın fekal atıkları ve diğer organik kirleticilerin özellikle martılar tarafından kirlilik seviyesi çok daha az olan bölgelere, bu patojenlerin taşınması ile suyun kontaminasyonunda önemli derecede farklılıklar gözlenir. Kirlenen suların rekreasyonel amaçla kullanımı hastalıklara neden olmaktadır (Tekinşen, 1976 ve Keskin, 1990).

Dünya Sağlık Örgütü, plaj alanları hakkında yüksek oranda tatminkar olmak için her 100 ml'de *E.coli* sayısının 100'den az olmasının sürekli sağlanması gerektiğini ve yüzme suları için *E.coli* sayısının her 100 ml'de 1000'den fazla olmamasını tavsiye etmektedir. Bu tavsiye doğrudan epidemiyolojik veriyle desteklenmemesine rağmen, fekal mikroorganizmaların uygulanabilir bir seviyede tutularak halk sağlığının korunmasına önem verilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. E.coli için örneklerin toplanması

Suş izolasyonu; İzmit Körfezindeki 9 istasyonda (kirliliğin yoğun olduğu bölgelerde) yüzeyden, derinden ve kıyı kesimden su örnekleri alınarak yapılmıştır. Numune alınan istasyonlar çizelge 3.1, numune alınan istasyonları gösteren bölge haritası da şekil 3.1'de verilmiştir.

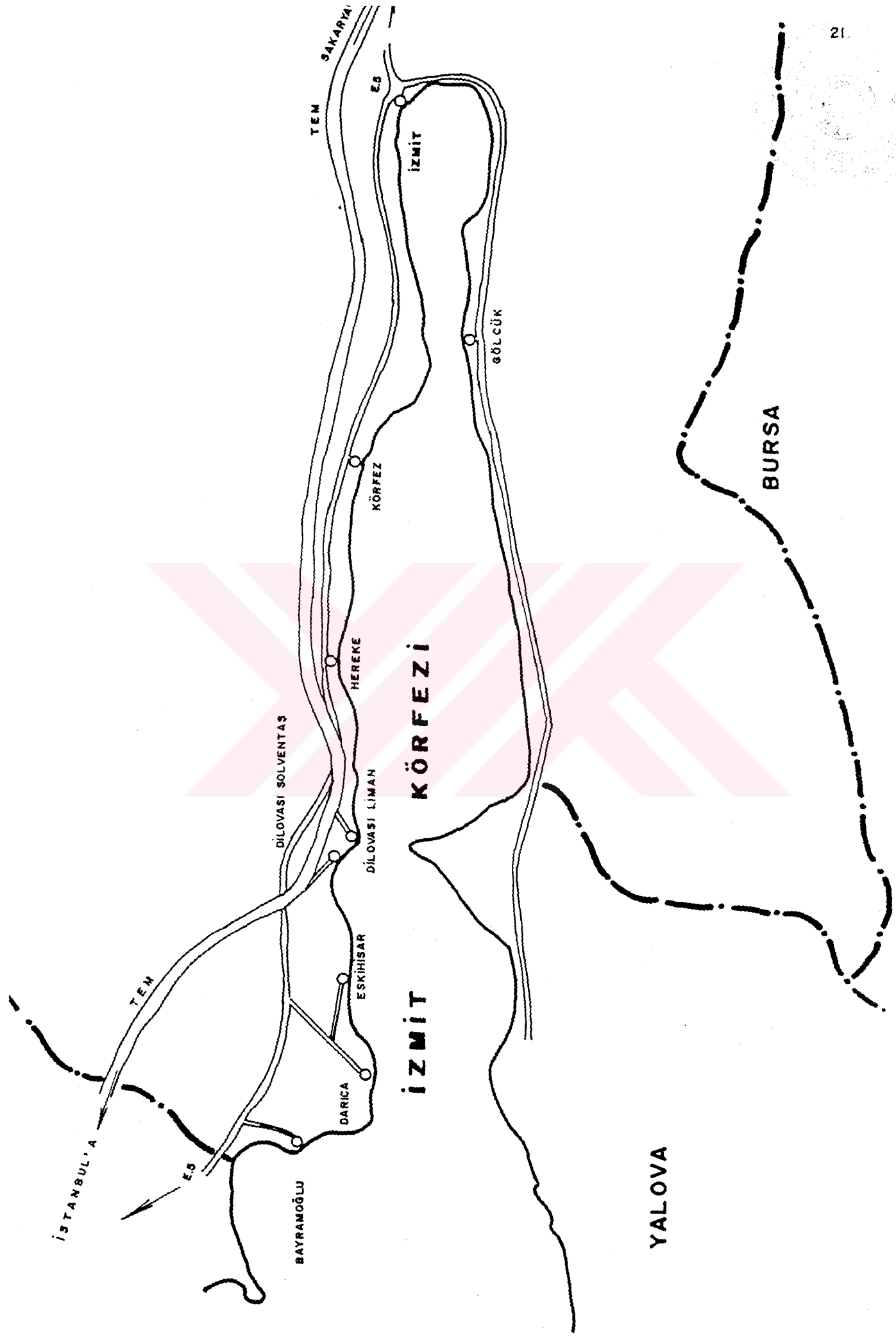
Çizelge 3.1. Numune alınan istasyonlar

	Yüzey No	Derin No	Kıyı No
Bayramoğlu	13	22	11
Darıca	6	16	15
Eskihisar	7	10	18
İzmit	21	19	20
Dilovası-Liman	-	12	-
Dilovası-Solventaş	-	14	-
Hereke	4	5	17
Körfez	8	2	3
Gölcük	1	23	9

Toplam numune sayısı: 23

Numuneler, steril olarak önceden temin edilen kahverengi cam şişelere alınıp ağızlarına mantar tıpa kapatılarak portatif bir buzdolabı içerisinde +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmek suretiyle aynı gün otomobille, incelemek üzere Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı Bakteriyoloji Bölümü'ne getirilmiştir.

Membran Filtrasyon yöntemiyle su numunelerindeki koliform tayini yapılmıştır.



Şekil 3.1. (O) NUMUNE ALINAN İSTASYONLAR

3.2. Metod

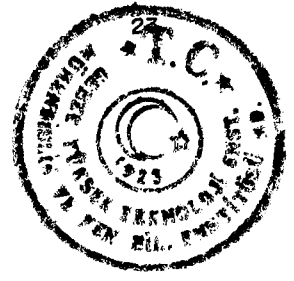
3.2.1. Membran Filtrasyon Yöntemi ile Total Koliform Tayini

3.2.1.2. Uygulama Alanı ve Genişliği

Bu metod, ılıman ve sıcak denizlerin kıyı bantlarında ve kaplıca sularında total koliformların tayini için tanımlanmış olup plajların sanitasyon kontrolü için de kullanılmaktadır. Bu metodun bir avantajı, *Clostridium perfringens* gibi anaerobik bakteri kolonilerinin okunmasına izin vermesidir. Koliform grubu olmayan bakterilerin çoğu bu metod da kullanılan besiyerlerinde üremezler. Üreyen koliform grubundaki bakteriler de, spesifik testlerle ayrırtebilirler. Bu test ile, fekal orjinli *E.coli* TipI ve non-fekal orjinli TipII ile TipVI tayin edilmektedir (Tekinşen, 1976).

3.2.1.2.1. Testin Esasları

Steril şartlar altında alınan deniz suyu örneklerinden sudaki total koliformun tahmin edilen sayısına göre dilüsyon serileri hazırlanır. Bu dilüsyon serileri 0.45µ genişliği olan membran filtreden süzülür. Membran filtre, M-Endo Agar içeren petri plağına yerleştirilir ve $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 h. enkübe edilir. Total koliform kolonileri, toplu iğne başından normal koloni büyüklüğüne kadar değişen büyüklükte, pembeden metalik parlaklık veren koyu kırmızıya kadar değişen renklerde görünür. Şüpheli olan koloniler, Mac Conkey veya BGGB (Brillant Green Bile Buyyon) kullanılarak doğrulamaya alınır ve test edilir (Bilgehan, 1987).



3.2.1.2.2. Kültür Vasatları, Kimyasallar ve Stok Kültürler

Endo Agar

Polypeptone	10.0 g
Thiopeptone	5.0 g
Casitone	5.0 g
Yeast extract	1.5 g
Lactose	12.5 g
NaCl	5.0 g
K ₂ HPO ₄	4.375 g
KH ₂ PO ₄	1.375 g
Sodium lauryl sulfate	0.05 g
Sodium desoxycholate	0.10 g
Sodium sulfite	2.10 g
Distile su	1.0 L
Agar	15.0 g

Hazırlanması: 20 ml. Ethanol içeren 1 litre distile suda bütün maddeler eritilir. Kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtılır ve hemen uzaklaştırılır. Son PH 7-2±0.1 olmalıdır. 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına dağıtılır. Agar donduktan sonra petri plakları ters olarak çevrilir ve buzdolabında karanlıkta muhafaza edilir. Besiyeri otoklava konmaz.

Mac Conkey Broth

Medium vasat	
Sodium tourocholate	5.0 g
Lactose	10.0g
NaCl	5.0 g
Pepton	20.0 g
Distile su	1.0 L

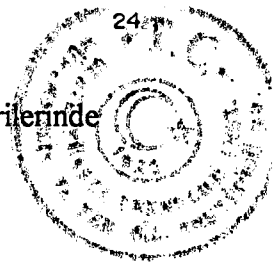
Brilliant Green Bile Broth (PH:7.2 ± 0.2)

Oxgal dehydrated	20.0 g
Lactose	10.0 g
Pepton	10.0 g
Brilliant Green	13.3 mg
Distile su	1.0 L

Phosphate Buffer (PH: 7.2)

K ₂ HPO ₄	3.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Distile su	1.0 L

Hazırlanması: Maddeler eritilir, 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Dilüsyon serilerinde kullanmak üzere, tampon solüsyonu 9 ml olarak test tüplerine dağıtılır.



Hazırlanması: Maddeler eritilir, 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Dilüsyon serilerinde kullanmak üzere, tampon solüsyonu 9 ml olarak test tüplerine dağıtılır.

3.2.1.2.3. Su örneklerinin Alınması

3.2.1.2.3.1. Analiz İşlemleri (Örnek miktarı ve dilüsyon serilerinin seçimi)

Membran Filtre metodunda, enkübasyondan sonra membran filtre üzerinde 20-80 koloni olması idealdir. Temiz deniz suları için planlanan dilüsyon serilerinin önceden yapılmış çalışmaları bulunmuyorsa, orjinal örneğin su miktarları filtre edilip 100 ml, 1ml ve 0.1 ml olarak kontamine sular için dilüsyonlar artırılır.

3.2.1.2.4. Dilüsyon Serilerinin Hazırlanması

Orjinal örnekten direk ekimler yapılmadan önce dilüsyon serileri hazırlanır. Su örneği dilüsyonlardan ve ekimlerden önce iyice çalkalanmalıdır. Su örneği iyice çalkalandıktan sonra, steril pipetle orjinal örnekten 1 ml alıp 9 ml fosfat tamponu ve su içeren tüpe aktarılır, karıştırıcı veya el ile kuvvetlice çalkalanır. Daha sonra D-1 dilüsyonundan alınan 1ml, 9ml fosfat tamponu içeren sulu tüpe konarak D-2 dilüsyonu elde edilir.

3.2.1.2.5. Filtrasyon İşlemi

Fazla konsantrasyonda bakteri içeren örneklerden kontaminasyonu engellemek için, filtrasyon işlemine en yüksek dilüsyondan başlanır. Herbir dilüsyon serisi için sterilize filtrasyon hunisi (funnel) kullanılır. Sterilize edilmiş pens ile membran filtre filtrasyon apereyinin üzerine konur. Dikkatli bir şekilde funnel yerine yerleştirilir ve kilitlenir. 20 ml steril fosfat tampon suyu funnel'in içine konur sterilize pipet ile D-2 dilüsyonundan 1 ml funnel'a ilave edilerek kısmi vakum ile filtre edilir.

Funnel'in duvarları yaklaşık 20 ml steril fosfat tampon suyu ile yıkanır, kısmi basınç uygulanarak filtre edilir. Funnel'in duvarları ikiden fazla yıkanarak tekrar kısmi vakum ile filtre edilir, kiliti açılarak funnel kaldırılır ve alevde sterilize edilmiş pens ile membran filtre alınarak vasat içeren petri plağının üzerine konur. D-1 dilüsyonunu filtre etmeden önce 20 ml fosfat tamponu filtrasyon ünitesinden geçirilir. Tüm ekimlerde aynı işlemler tekrarlanır.

3.2.1.2.6. Enkübasyon

Üzerine membran filtre konulan, agar plakları 36±1°C'de 24 h. enkübe edilir. Sterilite kontrolü membran filtresiz agar içeren bir plakta enkübe edilerek yapılmıştır.



3.2.1.2.7. Değerlendirme

Stereomikroskop ile pembeden metalik parlaklık veren koyu kırmızıya kadar olan değişik büyüklükteki koloniler sayılır. Şüpheli kolonilerin sayısı, total koloni sayısının %10'undan fazla ise, şüpheli koloniler Mac.Conkey veya BGBB' ye alınır.

Fekal koliformlar ise, stereomikroskopta mavi renkli koloniler olarak sayılır. Non-fekal koliform kolonileri, griden krem renge kadar değişen renklerde görünmektedir.

3.2.1.2.8. Doğrulama Testi

3.2.1.2.8.1. Mac Conkey Buyyon Analizi

Alevde steril edilmiş öze ile, membran filtre üzerindeki şüpheli kolonilerden Mac Conkey buyyona alınır ve $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 h enkübe edilir. Koliform grubu, Durham tüplerinin içerisinde gaz oluşturarak besiyerinin violeye benzer rengini sarıya dönüştürmüştür.

3.2.1.2.9. BGBB Analizi

Şüpheli kolonilerden aynı şekilde alınarak Brilliant Green Bile Buyyon'a konur. $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 h enkübe edilir. Koliform grubu bakteriler, Durham tüpü içerisinde gaz oluşturmuştur.

3.2.1.2.10. Sonuçların Hesaplanması

Enküasyon sonucu, Total koliform kolonileri sayılarak kaydedilir. Eğer gerekiyorsa doğrulama testine göre düzeltme yapılır. Membran Filtre üzerinde koliform ve koliform olmayan koloniler toplamı 20-200 arası olan dilüsyonlar değerlendirmeye alınmıştır.

100 ml'de Total koliform sayısı, şu formülle hesaplanır.

$$\text{Total koliform} / 100 \text{ ml} = \frac{\text{Koliform koloni sayısı}}{\text{Filtre edilen örnek (ml)}} \times 100$$

Eğer sayılan koloni yok ise sonuç 1/100 ml olarak verilir.

$$\text{Fekal koliform} / 100 \text{ ml} = \frac{\text{Fekal koliform koloni sayısı}}{\text{Filtre edilen örnek miktarı (ml)}} \times 100$$

3.2.2. *E.coli*'lerin İzolasyonu

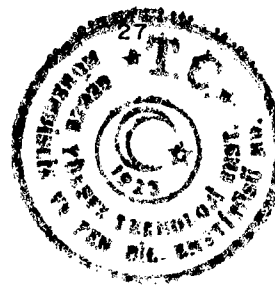
Çalışmada, 9 istasyondan alınan numuneler içerisindeki koliform tayini yapıldıktan sonra, konjugasyon deneyinde *E.coli*'de R plazmidlerine bağlı direnç aktarımı gösterileceği için koliform bakterilerden olan *Shigella*, *Proteus* ve *Salmonella* cinsleri arasından sadece *E.coli* izole edilmiştir.

EMB (Eosine Methylene Blue) besiyerinde üreyen laktoz(+) kolonilerin tanınması için TSİ (Three Sugar Iron Agar) besiyerine ekim yapıldı ve İMVIC testleri için (İndol-Metil Red-Voges Proskauer-Citrate) lac(+) olan koloniler sete alınarak klasik yöntemlerle *E.coli*'ler tanımlanmıştır.

EMB Agar

Pepton	10.0 g
Laktoz	5.0 g
Sükroz	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Agar	13.5 g
Eozin	0.04 g
Metilen mavisi	0.065 g
Saf su	1000 ml'ye tamamlanır.

Karışım kaynatılarak eritilir ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve biraz soğutulup plaklara dökülür, PH:7.1 olmalıdır. Bu düzen içerisinde sükroz konulur. EMB besiyeri de, Mac Conkey agar gibi kullanılır. Besiyerinin içerdiği boyalar, Gr(+) ve bir kısım Gr(-) bakterilerin üremesini inhibe eder. Özellikle, *Enterobacteriaceae* ve benzer bakterilerin ayırtilmesinde kullanılan bir besiyeridir. Laktoz ve sükroz üzerine etki eden bakteriler asit oluştururlar. Boyalar bu ortamda presipite olurlar. Sonuç olarak *E.coli* gibi tipik laktozu fermente eden bakteriler madeni parlaklık veren yeşil-siyah renkli koloniler oluştururlar. *Salmonella*, *Shigella* ve *Proteus* gibi bakteriler bu şekerleri fermente etmedikleri için saydam, renksiz koloniler olarak görünürler.



TSİ Agar (PH:7.3)

Gr(-) bakterilerin glukoz, laktoz ve sükröz üzerindeki etkilerini ve H₂S oluşturup oluşturmadıklarını araştırma temelinde dayalı olarak gösteren, ön tanı değeri taşıyan bir besiyeridir. Aşağıdaki maddeler karıştırılarak sıcak su banyosunda eritilir. Deney tüplerine 8-9 ml dağıtılır, 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Tüpler düzlemde 25° açı oluşturacak şekilde yatık olarak tutulur.

Polypeptone	20 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Dextrose	1 g
Sodium chloride	5 g
Ferric ammonium sulfat	0.2 g
Sodium thiosulfate	0.2 g
Agar	13 g
Phenol kırmızısı	0.025 g
Saf su	1000 ml

Ekim yöntemi: Şüpheli bakteri kolonisine dokundurulan iğne öze ile alınan materyal önce iğne özenin, besiyerinin dip kısmına batırılması ile sonra da yatık kısmının yüzeyinde zik zak çizilmesiyle ekim yapılır. Ekimler 35 °C'de 18-24 h enkübe edilmiştir.

Sonuçların okunması ve değerlendirilmesi: Besiyerinde, glukozun on katı kadar laktoz ve sükröz bulunmaktadır. Glukozu fermente eden bakteriler, oluşturdukları asit ile fenol kırmızısı ayıracını etkileyerek sarı renge dönüştürürler. Ayrıca bakteriler besiyerindeki peptonun oksidatif dekarboksilasyonundan alkali ürünler oluştururlar.

Bu alkali ürünler besiyeri yüzeyindeki glukozdan oluşan asitleri nötralize ettikleri halde dipteki yoğun asidi nötralize edemezler. Bu nedenle glukozu fermente edip, laktoz ve sükrözü parçalamayan bakteriler dipte sarı, yatık kısımda ise kırmızı renk oluştururlar. Laktoz, sükröz veya her ikisini de fermente eden bakteriler bol miktarda asit oluşturduklarından oluşan alkali ürünler, ne dipteki ne de yatık besiyerindeki asidi nötralize etmeye yetmezler. Bu nedenle laktozu, sükrözü ya da her ikisini fermente edebilen bakteriler her iki besiyerinde de sarı renk oluşturmuşlardır.

Fermentasyon esnasında gaz oluşması, besiyerinin içinde gaz kabarcıklarının veya besiyerinin parçalanmasının görülmesiyle anlaşılır. Thiosulfate'ın üzerine etki ederek H₂S oluşturan bakteriler bu maddenin ferric ammonium sulfat üzerine etkisi ile siyah renkli ferrous sülfid meydana getirirler, besiyerinin dip kısmının siyah renk alması bakterinin H₂S oluşturduğunu gösterir. Thiosulfate üzerine etki ancak asit ortamda meydana gelir. Bu nedenle besiyerinin sarı rengi görülme de bakterilerin H₂S oluşturmuş olmaları glukoz üzerine de etki ettiğini göstermiştir.

3.2.2.1. İmvic Testleri (İndol-Methly Red- Voges Proskauer-Citrate)

3.2.2.1.1. İndol Deneyi: İndol, nitrojenli bir bileşik olup bazı bakteriler tarafından triptofanın enzimatik hidrolizasyonu sonucu meydana getirilir. Bu deney için karbonhidratsız besiyeri kullanılmalıdır. Eğer besiyerinde karbonhidrat olursa bakteri karbonhidratı kullanır, triptofanı parçalamaz. Triptofan, besiyerlerinde kullanılan preparatlarda bulunan bir aminoasittir, ancak her bakteri triptofandan İndol oluşturamaz.

Araştırmada, 5cc peptonlu su, kovacs ayırıcı ve mikroorganizma kullanılmıştır. Mikroorganizma, peptonlu suya ekildikten sonra 37 °C'de 2-7 gün enkübasyonda bırakılmış ve bu sürenin sonunda kültürle kovacs ayırıcından 0.5 cc ilave edilip karıştırılmış, kültürün üst kısmında kırmızı rengin oluşması ortamda İndol'un varlığını göstermiştir. Negatif durumlarda ise, üstte sarı renk teşekkül etmiştir. Denemelerde reaksiyonu iyi okuyabilmek için kültüre önce 0.5 cc ksilol konur ve karıştırılır, sonra kovacs ayırıcı ilave edilir. Test Ortamında ise; 2 g Pepton ve 0.5 g NaCl, alınıp 100 cc'lik distile su içinde ısıtılarak eritilir ve PH:7.4'e ayarlanır. Tüplere 5 cc olarak taksim edilip otoklavda 120 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.2.2.1.2. Methyl Red Deneyi: Metil kırmızısı reaksiyonu, glukozun fermentatif olarak metabolize olması sonucu oluşan organik asitler tarafından ortamın PH'ını düşürdüğünü gösteren bir deneydir. Bu solüsyon, PH:6'da sarı renk, PH:4.4'den aşağıda da kırmızı renk vermiştir. Bu deneyle, bakterilerin karbonhidratlara etki ederek meydana getirdikleri laktik asit, formik asit, süksinik asit gibi asitler aranır.

Çalışmada, 5 cc Glukoz ve fosfatlı peptonlu su, Metil red solüsyonu ile mikroorganizmanın taze kültürü kullanılarak, besiyerine mikroorganizma ekildikten sonra kültürler 37 °C'de bir süre enkübe edilmiştir, sonra tüp içine 4 damla metil red solüsyonundan damlatılıp iyice karıştırılıp kırmızı renk oluşumu, pozitif olarak değerlendirilmiştir, şüpheli durum varsa kültürler birkaç gün daha enkübe edilirler, sarı rengin oluşumu negatif reaksiyonu göstermektedir.

Test Ortamında ise, 5 g Pepton, 5 g K₂HPO₄, 5 g D-Glukoz ve 1000 cc Distile su kullanılıp pepton ile fosfat sıcak distile su içinde eritilir ve PH:7.6'ya ayarlanır. Tüplere 5 cc miktarında taksim edilerek 121 °C'de 15 dakika steril edilir, kullanılacağı zaman son konsantrasyonu %1 olacak şekilde steril karbonhidrat ilave edilmiştir.

3.2.2.1.3. Voges Proskauer Deneyi: Bu deney karbonhidrat metabolizmasının ana ürünü olan asetil karbinol'ün, bulunması esasına dayanır. Bu madde KOH ve hava varlığında diasetile okside olur. Diasetil ise, ∞ naftol ve peptonda bulunan bir aminoasit olan arginin mevcudiyetinde 2-4 h'te karışıma kırmızı renk verir. Ayıraçlar konduktan sonra sonuç en geç 4 h. içinde okunmalıdır.

Ayıraçlar:	a) ∞ Naftol	Naftol	5 g
		Etil alkol	100 cm ³
	b) KOH solüsyonu	KOH	40 g
		Damıtık su	100 cm ³

Araştırmada, kültürlerden Clarks Lubs besiyerine az miktarda ekim yapılıp 37 °C'de 48 h. enkübe edilir. Enkbasyondan sonra kültürlerden test tüplerine 1 cc konur, 0.6 cm³ α naftol zltisine 0.2 M. KOH zltisi ilave edilerek 1 cm³ kültür içerisinde çalkalanır. Sonra elde edilen karışım 37 °C'deki etüvde 24 h. kaldıktan sonra okunup kırmızı rengin pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir.

3.2.2.1.4. Citrate Besiyeri Deneyi: Bazı mikroplar karbon ve enerji kaynağı olarak sitratları ve nitrojen kaynağı olarakta amonyum tuzlarını metabolize etme yeteneğine sahiptirler. Bu karaktere sahip mikroplar sitrat ve amonyum tuzlarının bulunduğu ortamda üreyebilirler. Bu alışma için, Simmond's sitrat besiyeri ve mikroorganizma kullanılır. Simmond's sitralı jelozunun yüzeyine bakterinin yeni jeloz kültürünün tuzlu su süspansiyonundan bir öze ile yayım yapılır. 37 °C'de 3 güne kadar bekletilir, ortamda mavi renk ve çizgi şeklinde üreme pozitif reaksiyonu, orjinal yeşil renk oluşması ve üremenin görülmemesi negatif reaksiyonu göstermiştir.

Laktozu fermente eden bakteriler, ayırıcı ortamlarda renkli koloniler oluştururken laktoz(-) olanlar renksiz koloni yaparlar. İMVİC reaksiyonu da bakterilerin adlandırılmasında önem taşımaktadır. İMVİC reaksiyonu, *E.coli* için(++-) şeklinde dir.

3.2.2.2. Antibiyotik Diskler: Antibiyotiklere duyarlılık ölçümünde Oxoid'in antibiyotik disklerinden yararlanılmıştır. Kullanılan disklerin içerdikleri antibiyotik yoğunlukları ve inhibisyon alanı standartları gösterilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kullanılan Antibiyotiklerin İnhibisyon Alan Standartları

Antibiyotik Adı	Yoğunluk (mcg)	İnhibisyon Alanı (mm)	
		Dirençli	Duyarlı
Sulbactam/Ampicillin (SAM)	20	≤13	≥21
Penicillin (P)	10	≤11	≥22
Gentamicin (CN)	10	≤12	≥15
Amikacin (AK)	30	≤14	≥17
Nalidixic Acid (NA)	30	≤13	≥19
Chloramphenicol (C)	30	≤12	≥18
Cefoperazone (CEP)	75	≤15	≥21
Kanamycin (K)	30	≤13	≥18
Trimethoprim Sulfamethoxazole (SXT)	25	≤10	≥16
Tetracycline (T)	30	≤14	≥19

3.2.3. Konjugasyon Deneyinin Yapılışı

Dirençliliği incelenecek olan bakteri suşları, 1 ml buyyon içeren tüplere ekilerek 37 °C'de 6 h. enkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültürlerin 1/100'lük dilüsyonlarından steril olan eküvyon ucu ile sterilite kontrolü yapılmış ve etüvde kapakları aralık ve ters tutularak kurutulmuş Oxoid'in D.S.T. Agar besiyerinin yüzeyine homojen dağılım yapacak şekilde ekim yapılmıştır.

Fakat ekim yapmadan önce her bir tüpteki süspansiyonun bulanıklığı Mac Farland bulanıklık derecesine göre 0.5'e ayarlanır. Eğer, bakteri süspansiyonunun bulanıklığı Mac Farland 0.5'ten daha fazla ise, bakteri süspansiyonuna steril serum fizyolojik eklenerek bulanıklık ayarı yapılır.

Eğer, bakteri süspansiyonunun bulanıklık derecesi Mac Farland 0.5'ten daha az ise, bir süre daha etüvde bırakılarak aynı bulanıklık derecesine gelmesi sağlanır. Bu işlemin uygulanmasındaki amaç, her antibiyotik duyarlılık testinde besiyerine aynı miktarda bakteri ekimi yapılarak standardizasyonu sağlamaktır. Patojen bakterinin buyyonda Mac Farland 0.5 bulanıklığındaki süspansiyonu yapıldıktan sonra antibiyogram yapılacak besiyeri alınır. Ekim yüzeyi kuruduktan sonra diskler steriliteye dikkat edilerek besiyerinin yüzeyine tam temas edecek şekilde yerleştirilip alevden geçirilmiş pensle hafifçe bastırılmıştır.

Petri kutuları laboratuvar ısısında yaklaşık 30 dakika bekletilerek, antibiyotiklerin yayılımı sağlandı. 37 °C'de bir gece enkübe edildikten sonra üremenin engellendiği alanların çapları ölçüldü ve mm olarak kaydedilmiştir.

Verici *E.coli*, alıcı *E.coli* (*E.coli* K12 Lac(-) Nal^r) suşlar ayrı ayrı buyyona öze ile ekilerek bir gece 37 °C'lik etüvde enkübe edilmiştir.

Seçici besiyeri olarak Mac Conkey besiyeri hazırlandı. Bu besiyerine Nalidixic acid ve uygun yoğunlukta ayrı ayrı antibiyotikler (SAM, C, CN...), eritilmiş olan besiyerinin yüzeyine 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra ilave edilmiştir.

Alıcı *E.coli* ve çoklu direnç gösteren bakterilerin sıvı kültürlerinden, ayrı ayrı antibiyotikleri içeren bütün Mac Conkey plaklarına kontrol ekimi yapıldı. Plaklar dörde bölünerek kullanıldı. Çoklu direnç gösteren bakterilerle, alıcı bakteri bu besiyerlerinin hiçbirinde üremedi. Eğer üreme olursa suşlarda veya hazırlanan besiyerinde bir bozukluk var demektir.

İçinde 5 cc buyyon bulunan tüplere, alıcı olarak kullanılan *E.coli* K12'nin bir gecelik sıvı kültüründen 0.5 cc, verici *E.coli* suşunun bir gecelik sıvı kültüründen de 0.1 cc ekildi. Hafifçe çalkalanarak 37 °C'lik etüve kondu. Bu karışım bir gece enkübe edilmiştir (Direnç Transfer Dönemi).

Ertesi sabah, bir öze kullanılarak ayrı ayrı antibiyotikler ve Nalidixic acid içeren Mac Conkey plaklarına ekim yapıldı (Birgün önce plaklar etüvde kurutuldu). Bu ekim yapılan plaklar 37 °C'lik etüvde bir gece bekletilmiştir.

Ekilmiş olan plaklar ikinci gün etüvden çıkarıldı, lac(-) olan yani laktozu fermente etmeyen ve renksiz görünen şeffaf kolonilerin üremesi *E.coli* K12'ye direncin aktarıldığını göstermiştir. Çünkü lac(+) durumdaki verici *E.coli* suşunun direnç gösterdiği antibiyotiklere karşı, alıcı *E.coli* suşu da aynı direnci göstermektedir.

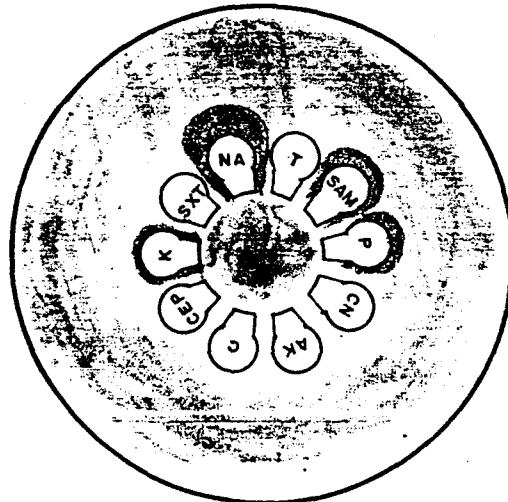
Her plakta oluşan laktoz negatif kolonilerden (tek koloni almamaya dikkat edilerek) ayrı ayrı antibiyotik içeren Mac Conkey plaklarına, her plağa tek koloni düşecek şekilde ekimi yapılmıştır (Bu plaklarda Nalidixic acid bulunmamaktadır). Bu pasajın amacı, direnç özelliği aktarılmış olan alıcı *E.coli* K12'leri saflaştırmaktır. Bu plakta üreyen tek koloniden buyyona ekim yapılarak, bir gece 37 °C'de etüvde enkübe edilmiştir.

Buyyonda üreyen suş, eküviyonla D.S.T. agarına homojen şekilde yayıldı. İlk antibiyotik direnç testinde kullanılan diskler sıraya dizildi, ikinci gün enkübasyon alanları ölçülerek mm olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.2.3).

Deneye sokulmuş olan alıcı suşun birden fazla sayıda antibiyotiğe dirençli duruma gelmiş olması, deneye sokulan verici suşun direnç özelliğinin bulaşıcı tipte (R plazmidlerine bağlı) olduğunu gösterir. Alıcı suşlar, direnç özelliğinin tümünü aynen almamış olabilir veya hiç aktarım olmayabilir. Ancak olguların çoğunda, çoklu dirençli duruma gelmişlerdir. R faktörünün bünyesinde taşınan direnç genleri sayesinde kullandığımız antibiyotiklere karşı dirençli hale gelen *E.coli* K12 $\text{Na}^f \text{ lac}(-)$ suşundaki dirençlilik, *E.coli* K12 $\text{Ch}^f, \text{ lac}(+)$ suşuna da aynı yöntemle aktarılmıştır. Sadece Na^f olan ve diğer antibiyotiklere karşı direnç göstermeyen alıcı suşun, deneye sokulmasıyla birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli duruma gelmiştir. Deneyimizde diğer antibiyotiklere karşı hassas olan alıcı *E.coli* K12 suşu, numunelerden izole ettiğimiz verici *E.coli* suşundaki antibiyotik direnç özelliklerini kısmen almıştır.

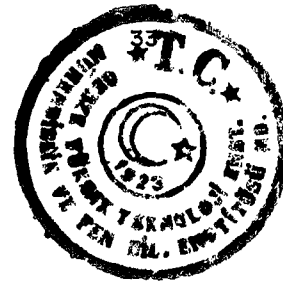
Çalışmada kullanılan antibiyotiklerle ayrı ayrı hazırlanmış olan Mac Conkey agarlara, "R plazmid" aktarımı yapılmış *E coli* K12 suşları ayrı ayrı ekilip Disk Difüzyon Metodu ile antibiyogramları yapılarak kolonilerin saf olup olmadığı ve antibiyotik direnç özelliklerinin ne düzeyde aktarıldıkları kontrol edilmiştir (Akman, 1972 ve Bauer, 1966).

Ayrıca, yapılan çalışmalarda milimetre olarak alınan zon ölçümleri Çizelge 3.2'deki sınırlar çerçevesinde incelenerek "dirençli, duyarlı ve orta dirençli" olarak değerlendirme yapılmıştır. Burada dirençlilik durumu; O mikroorganizmanın sözkonusu antibiyotiğin sağaltımında kullanılan dozlarla elde edilen kan ve doku konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu anlamını taşımaktadır. Duyarlılık durumu; mikroorganizmanın aynı konsantrasyonlara karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Orta duyarlılık ise; kullanılan antibiyotiğin daha yüksek dozlarda verilmesi halinde sonuç alınabileceğini belirtmiştir.



R PLAZMİDİNİ ALAN BİR *E.coli* K12'nin ANTİBİYOGRAMI

Şekil: 3.2.3.



4. BULGULAR

İzmit Körfez'indeki, 9 istasyondan alınan 23 denizsuyu örneğinden izole edilen ve körfezde kirliliğe neden olan, yani "indikatör tür" olarak tayin edilen koliformlardan, biyokimyasal olarak *E.coli* tanımı kesinleşen 8 *E.coli* suşu kullanılmıştır. Örneklerden, Membran Filtre metodu ile araştırma sonuçları Fekal koliform ve Total koliform durumları gösterilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *E.coli* Suşlarının Soyutlandığı Kaynaklar

Suş No	44.5 °C'de-48 h Fekal Koliform	37 °C'de-48 h Total Koliform
1. Numune	++	++
2. //	++	+
3. //	θ	θ
4. //	θ	θ
5. //	++	++
6. //	++	++
7. //	θ	θ
8. //	θ	θ
9. //	++	++
10. //	θ	θ
11. //	θ	θ
12. //	θ	θ
13. //	θ	θ
14. //	θ	θ
15. //	++	++
16. //	-	-
17. //	-	-
18. //	-	-
19. //	-	-
20. //	-	-
21. //	-	-
22. //	++	++
23. //	++	++

Toplam 23 örnekten 8'inde koliform varlığı Total ve Fekal olarak saptanmıştır.

+: Koliform var (çok)

-: Koliforma az rastlandı

θ: Koliform yok (Diğer bakteriler bulunmaktadır)

Buna göre 23 örnekteki koliform varlığını total ve fekal olarak saptamış olup 8 E.coli suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu suşların antibiyotik direnç testleri yapılmıştır. Bu testte 10 antibiyotik kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir. E.coli suşlarının *Sulbactam/Ampicillin*, *Tetracyclin*, *Trimethoprim+Sulphamethoxazole*, *Penicillin* ve *Gentamicine* dirençlilik oranları %50’nin üzerinde bulunmuştur.



Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bauer ve arkadaşlarının Disk Diffüzyon Metoduna göre, incelenen 8 E.coli suşunun antibiyotiklere duyarlılıklarını gösterilmiştir (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Çalışmada Kullanılan 8 E.coli Suşunun Antibiyogram Sonuçları

Suş No	(NA)	(T)	(SAM)	(P)	(CN)	(AK)	(C)	(CEP)	(K)	(SXT)
1	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
2	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R
5	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R
6	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R
9	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
15	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S
22	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
23	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S

S: Duyarlı
R: Dirençli

Çizelge 4.4.1. E.coli K12’nin Antibiyogramı

K12	(NA)	(T)	(SAM)	(P)	(CN)	(AK)	(C)	(CEP)	(K)	(SXT)
	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Çizelge 4.4.2. R Plazmidini Alan E.coli K12’nin Antibiyogramı

K12	(NA)	(T)	(SAM)	(P)	(CN)	(AK)	(C)	(CEP)	(K)	(SXT)
	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S

Çizelge 4.5. İzole Edilen *E.coli* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık ve Dirençlilikleri

Kullanılan Antibiyotikler	Suş Sayısı		% Oran	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Nalidixic Acid (NA)	8	0	100	0
Tetracylin (T)	4	4	50	50
Sulbactam/ Ampicillin (SAM)	3	5	37.5	62.5
Penicillin (P)	3	5	37.5	62.5
Gentamicin (CN)	4	4	50	50
Amikacin (AK)	7	1	87.5	12.5
Chloramphenicol (C)	5	3	62.5	37.5
Cefoperazone (CEP)	6	2	75	25
Kanamycine (K)	5	3	62.5	37.5
Trimethoprim+ Sulphamethoxazole (SXT)	3	5	37.5	62.5

Çizelge 4.6. İzole Edilen *E.coli* Suşlarının Çoğul Antibiyotik Dirençliliklerine Göre Gruplandırılması

Antibiyotik Sayısı	Suş Numaraları
2	1
4	2, 23
5	5
4	9, 15
3	22
6	6

Bulaşıcı Tipte Plazmid (R Faktör) Aranması:

Testlerde sadece *Nalidixic acid*'e duyarlı, diğerlerine dirençli olan *E.coli* suşları kullanıldığından körfezden izole edilen 8 *E.coli* suşundan tümünün duyarlı olduğu antibiyotik, *Nalidixic acid*'dir. Bunu sırasıyla *Amikacin*, *Cefoperazone*, *Chloramphenicol*, *Tetracyline*, *Ampicillin* gibi antibiyotikler izlemiştir. 8 *E.coli* suşunda bulaşıcı tipte R plazmidini arandı.

Konjugasyon denemeleri sonucunda 6 suş 2 veya daha fazla antibiyotiğe dirençli bulundu. Çünkü 6 suşun bulaşıcı tipte R plazmid bulundurduğu tesbit edilmiştir. Direnç aktarım deneyleri sonunda 2 suş 6 antibiyotiğe dirençli, 2 suş 5 antibiyotiğe dirençli, 1 suş 4 antibiyotiğe dirençli, 1 suşa ise 3 antibiyotiğe karşı dirençlilik aktarımı tesbit edilebilmiştir. Konjugasyon testlerinde, R plazmid aktarımı gerçekleşen 6 *E.coli* suşunun tekrar yapılan antibiyogram testleri sonucunda konjugasyon testleri sırasında belirlenen antibiyotik dirençlilikleri ile benzerlik gösterdiği tesbit edilmiştir (Çizelge 4.7 ve 4.8).

Çizelge 4.7. Konjugasyona Tabii Tutulmuş Verici ve Alıcı Suşlar ile Yapılan R Faktörü Aktarım Sonuçları

Suş No	Verici Suşların Direnç Şeması	Suş No	Alıcı Suşların Direnç Şeması
2	SAM, P, C, SXT	K12 (2)	SAM, C, SXT
5	P, T, CN, C, SXT	K12 (5)	T, CN, C, SXT
6	SAM, P, CN, CEP, K, SXT	K12 (6)	CN, CEP, SXT
9	SAM, P, AK, C	K12 (9)	AK, C
15	T, CN, CEP, K	K12 (15)	T, CN, CEP
23	T, SAM, CN, K	K12 (23)	T, CN

Çizelge 4.8. R Plazmid Aktaran *E.coli* Suşlarının Antibiyogram Sonuçları

Suş No	NA	T	SAM	P	CN	AK	C	CEP	K	SXT
2	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R
5	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
6	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R
9	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S
15	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S
23	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bulaşıcı tipte antibiyotik direncin süratle yayılması, günümüzde hekimleri en çok düşündüren sorunlardan biri haline gelmiştir. Bu konuda dünyanın çeşitli ülkelerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli antibiyotiklerin koruyucu ve tedavi edici amaçlar için uzun süreden beri kullanılmasının bu antibiyotiklere dirençli bir populasyonun oluşmasına neden olduğu ve dirençli bakterilerin insan sağlığını tehdit ettiği, çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Akman, 1979 ve Çetinkaya, 1973).

E.coli'lerin yüksek sıklıkta R faktörü ihtiva edip bu özelliklerini diğer Gr(-) bakterilere bulaştırma şanslarının yüksek olduğu da bildirilmektedir. Gr(-) barsak bakterilerinde gözlenen "Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç" özelliğinden sorumlu Resistance Transfer Factor "RTF" ilk olarak Japonya'da Ochiai ve Akiba (1959) saptamıştır.

İngiltere'de Datta ve Anderson (1964), çalışmaları sonucunda "Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç" özelliğinin bakteri hücreleri içerisindeki plazmidler üzerinde bulunan direnç genleri tarafından yönetildiği tesbit edilmiştir. Aynı araştırmacılar (1962), İngiltere'de izole ettikleri *Salmonella typhimurium* suşlarındaki direnç oranını %3 olarak bulmuşlardır. Yine aynı araştırmacılar (1964-1965), bu direnç oranının %61'e yükselmiş olduğunu ve suşların çoğunda bu direncin R faktörüne bağlı bulunduğunu bildirilmişlerdir.

Datta ve arkadaşları (1972), çeşitli hastane enfeksiyonlarından izole edilen *E.coli* suşlarında R faktörlerine bağlı antibiyotik direnç oranının %43-45 arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Aynı konuda yurdumuzda yapılan çalışmalarda (1963-1978), enterik bakteriler arasında R plazmidlerine bağlı direnç özelliği oranının yüksek olduğu belirtilmiştir. Daha sonraki yıllarda bu oranın *E.coli*'lerde %28'den %83.9'a, *Shigella*'larda %52'den %80'e, *Salmonella*'larda %8'den %69'a yükseldiği bildirilmiştir. Bu araştırmacılar tarafından elde edilen bulgular, koliformlarda %67 oranında R plazmidi bulunduğunu göstermiştir (Uçar, 1969).

Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direncin süratle yayılması, son zamanlarda önemli bir sorun haline gelmiştir. Dünyanın çeşitli ülkelerinde bu konuda çok sayıda çalışmalar vardır. Yurdumuzda ise ilk çalışma *Shigella*'lar üzerinde yapılmıştır.

E.coli'lerin yüksek sıklıkta R faktörü ihtiva ettikleri ve diğer Gr(-) bakterilere bulaştırma şanslarının yüksek olduğu belirtilmiştir. Tedavi görmemiş hastaların dışkılarında çoklu direnç gösteren *Shigella*'larla aynı dirence sahip olan *E.coli*'lerin bulunması, bir bakteri kolonisindeki *E.coli*'lerde R faktörü aranmasının önemini ortaya koymuştur. Antibiyotiklere dirençli *E.coli* suşlarının bazıları bütün direnç karakterlerini duyarlı suşa bulaştırılabilirler. Bazıları ise, bir kısmını bulaştırır bir kısmını bulaştıramaz. Bunun nedeni, geçiş esnasında meydana gelen bir kopma veya kromozomal bir dirençle ilgili olabilir. Çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç gösteren değişik suşların farklı antibiyotik direnç faktörlerini alıcı suşa bulaştırdığı da görülmektedir (Akman, 1974).

Bu konudaki çalışmalar, aşağıdaki ihtimallerden bir veya birkaçının sözkonusu olabileceğini göstermiştir.

1. Dirençliliğin kromozomal oluşu
2. Bazı suşların, transfer faktörü "TF" bulunmayan R plazmidi içermesi
3. Aktarım sırasında R plazmidlerinin, gen zincirlerinin değişik bölgelerden kopması sonucu ayrışım olayının meydana gelmesi
4. Dirençlilik özelliğinin bir bölümünün kromozomal olması
5. Değişik dirençlilik örneklerinin farklı R plazmidlerine bağlı bulunması,

İncelediğimiz çok sayıda antibiyotiğe karşı dirençli 8 suşun, 6 tanesi kesin olarak R faktörü içermekte ve duyarlı bir bakteriye aktarılabilir (Çizelge 4.5).

Dirençli *E.coli* (donör) ve *E.coli* K12 (recipient) karışımları Mac Conkey + Nalidixic Acid + antibiyotik plaklarına ekildiğinde, bazı plaklarda lac(-) koloniler görüldü. Bu plaklara verici ve alıcı bakteriler ayrı ayrı ekildiğinde ise üreme olmadı veya alıcı ve vericinin ayrı ayrı yapılan antibiyogramında her ikisinin de herbir antibiyotik için duyarlılık ve dirençlilik durumu farklılık göstermiştir. Bu gözlem bize, üreyen kolonilerin dirençli hale gelmiş *E.coli* K12'den oluştukları fikrini vermiştir.

Bu kolonilerin *E.coli* K12'ye ait oldukları NA içermeyen diğer antibiyotiklerin bulunduğu Mac Conkey plaklarına ekim yapılarak isbatlanmıştır. Eğer bu koloniler donör'den antibiyotik direnç faktörü almamış olsalardı, antibiyotikli plaklarda üremeleri mümkün olmazdı (Çizelge 4.4).

Üreme sadece bir plakta olsaydı bunun mutasyon sonucu olabileceği düşünülebilirdi. Deneylerimizde birden fazla plakta üreme olduğu görülmektedir ki, bu durumun çok ender bir olay olan mutasyon sonucu olması mümkün değildir. Antibiyotiklere dirençli hale gelen *E.coli* K12 suşu daha önce kullanılan disklerle kontrol edilmiştir (Çizelge 4.7-4.8).

Doğrulama deneyleri, *E.coli* suşlarının Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç "R Faktörü" içerdiklerini göstermiştir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar bulaşıcı olan dirençliliğin hızla artmakta olduğunu kanıtlamıştır. Örneğin, Wachsmuth ve ark. (1983), Amerika Birleşik Devletlerinde 29 ishali hasta üzerinde çalışmışlar, ishali hastalardan izole ettikleri 12 Enterotoksijenik *E.coli*'den 5'inin R plazmidi aktarabilme yeteneğine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar (1983), Güney Asya'da ishali vakalardan izole edilen 17 enterotoksijenik *E.coli* suşunun 13'ünün R plazmidi transfer ettiğini belirtmişlerdir.

Günalp (1978), Hacettepe Üniversitesi Klinik Patoloji Laboratuvarlarına gönderilen numunelerden izole ettiği 934 *E.coli* suşundan %51'inin konjugasyonla değişik antibiyotiklere karşı oluşan dirençliliği aktardığını tesbit etmiştir.

Mayer ve ark. (1985), *Trimethoprim* dirençli 42 *E.coli* ve *Klebsiella* suşundan %88'inin konjugasyonla *E.coli* K12 suşuna dirençliliği aktardıklarını saptamışlardır. *E.coli* dışında diğer bakteriler arasında da R faktörüne bağlı direnç aktarımları yapılan çeşitli çalışmalar da ortaya konmuştur.

Türet (1972), *Salmonella* suşları üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada 67 *Salmonella* suşundan 24'ünde çoklu dirençlilik bulmuş ve 23'ünün bu dirençliliği aktarmış olduğunu göstermiştir.

Şili şehrinde (1991-1992), atık su akıntısı bulunan istasyonlardan farklı özellikler gösteren ve iklim şartlarına göre değişen Gr(-) bakteriler toplanmış, total koliform sayımları yapılarak antibiyotik dirençlilikleri saptanmıştır. Aynı araştırmacılar antibiyotik direnç gösteren numuneler tesbit ederek dirençli bakteri cinslerinden bazılarının fermentasyona meyilli olduklarını bazılarının ise fermentasyon oluşturmadıklarını antibiyotik direnç zonlarının hesaplanması ile tayin etmişlerdir. Bu çalışmada Fermentasyon yapan bakteriler, genellikle *Ampicilline* dirençli olup fermentasyon yapmayan basillerin çoğunluğu ise, *Cephalothin* antibiyotiğine karşı direnç gösterdiği tesbit edilmiştir.

Bu sonuçlar, her iki antibiyotiklinin klinik olarak kullanım sıklığının önemini ortaya koymuştur. Fermentasyon yapmayan bakteriler için yüksek hacimdeki antibiyotik direnç indeksinin, birkaç β lactam ünitesine karşı mikroorganizmanın doğal yapısından dolayı kaynaklanan bir direnç olduğu belirtilmiştir. Böylece, enterik basillerde direnç çoğunlukla plazmide kodlanmıştır. Atıksularda dirençli basillerin çok sayıda bulunması doğadan kaynaklanan hastalıklarda önem taşımaktadır (Martinez, 1994).

Lars H, Vorland, Karin Carlson, Odd Aolen (1984), bir yıl boyunca Norveç'te Üriner Sistem Enfeksiyonuna rastlanmış olup üriner sistemden izole edilen *E.coli* suşlarının en sık kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlilik durumları ve suşların konjugasyonla R plazmidi içeriği değerlendirilmiştir. *E.coli* suşlarının %42'si bir veya daha fazla antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. En fazla direnç *Sulfonamid'e* (%20.8), *Tetracyclin'e* (%10.1) bulunmuş; suşların %6'sından azı *Ampicillin*, *Cephalotin*, *Nalidixic Acid* ve *Trimethoprim+Sulfamethazol'e* dirençli oldukları saptanmıştır. Bu çalışmada hiçbir suşta *Gentamycin'e* direnç saptanmamıştır. *Tetracyclin'e* direnç erkeklerde kadınlardan daha çok görülmüştür. Üriner sistem enfeksiyonu mevsimlere göre farklılık gösterdiği halde, antibiyotik direnç mevsimlere göre değişiklik göstermez. Plazmide bağlı dirençlilik *Ampicillin*, *Streptomycin*, *Sulfonamid* ve *Tetracyclin'de* gözlenmiştir.

K.Wachsmuth, J. Dlboy, K. Birkness, D. Sack ve J. Wells (1983), R plazmidleri ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalarda R plazmidini ile *E.coli* serotipleri arasındaki enterotoksin plazmidleri ile ilgili karşılaştırmalar yapılmıştır. Enterotoksijenik *E.coli* salgınları sırasında enterotoksin ve R plazmidleri arasındaki bağlantılardan söz edilmiştir.

Amerika Birleşik Devleti'nde 29 Enterotoksijenik *E.coli* suşunda var olan antimikrobiyal direncin konjugasyonla nasıl aktarıldığı ve R plazmidinin mobilize edilmesi anlatılmıştır. İzole edilen 12 Enterotoksijenik *E.coli* suşunun 5 tanesi R plazmidini transfer edebilme yeteneğine sahip bulunmuştur. Diğer 4 izolat plazmid DNA'sını mobilize edebilmiş, fakat transkonjugatlarda toksin üretimine rastlanmamıştır (Wachsmuth, 1983).

David R.Shaw and Victor J.Cabelli (1980), Çevreden izole edilen *E.coli*'lerde R plazmid transferinin sıklığı ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada, sudan izole edilen *E.coli* suşlarında çoklu ilaç direncine rastlamışlardır. Bu çalışmada, total *E.coli* popülasyonunun %8.3'ünde birden çok antibiyotiğe karşı direnç gösteren *E.coli*'ler gösterilmiştir. 55 suşun 32'sinde dirence rastlanmış ve bunlar *E.coli*'nin K12 F⁻ suşları olarak tesbit edilmiştir. *E.coli*'lerin %5'inde yaklaşık 31 suşta transfer edilen ilaç direncine rastlanmıştır.

Çevreden izole edilen R⁺ suşların 9'u 3 fekal alıcı bakteriden izole edilmiştir. K12 R⁺ laboratuvar donörleriyle, çevreden izole edilen transfer R⁻ plazmidler arasında korelasyon saptanmıştır. R⁺×K12 F⁻ lac(-) olarak 16 suştan elde edilen transkonjugatlarda K12 F⁻ lac(+) suşlara dönüşmüşlerdir. Amerika Birleşik Devleti'nde yapılan bir çalışmada sudaki bulgulara göre; barsak hastalıklarına sebep olan *Shigella*, *Salmonella* ve Enteropatojenik *E.coli* bakterilerinin R plazmidini içerdikleri tesbit edilmiştir. Sudan izole edilen bu bakteri türlerinde de R plazmidine rastlanmıştır. Atıksulardaki enterik bakterilerde bulunan R plazmidleri transfer özelliğine sahiptir.

Colicin'ler *E.coli*'nin büyümesini engeller veya öldürürler. Colicin üreten bakteriler R plazmidini taşıyor ve bu bakterilerde direnç aktarım oranı verici hücrelerde 10⁻² dir. Plazmid aktarımının birçok değişik yolu olabilir. Örneğin, C18 suşu hem *Chloramphenicol* hem de *Tetracyclin*'e dirençli olduğu halde aynı plazmid üzerinde kodlu olan *Chloramphenicol*'e direnç geni aktarılmamıştır. Diğer bir izah ise; *Chloramphenicol* direncinin konjugatif olmayan bir plazmid üzerinde olması veya transfer özelliklerini kaybetmiş olabilmesi yönündedir (Akman, 1979).

Toshio Kınjo, Nobuyuki Minamoto, Makoto Sugiyama ve Yoshihiro Sugiyama (1992), *E.coli* suşlarında antimikrobiyal direncin karşılaştırmasını yapmışlardır. Fekal örneklerden izole edilen *E.coli* izolatları antimikrobiyal direnç ve transfer edilen R plazmidleri açısından incelenmiştir. Bu çalışmada, izole edilen 874 *E.coli* suşunun sadece 11'i 6 antimikrobik ilacın en az birine dirençli bulunmuştur. Bu antibiyotikler; *Ampicillin*, *Streptomycin*, *Tetracyclin*, *Chloramphenicol*, *Kanamycin* ve *Sulfadimethoxin*'dir. 7 bireyde %2.5 dirençli *E.coli* suşunu bulmuşlardır.

Bu antibiyotiklere dirençli suşların, izolasyon sıklığının yükselip yükselmediğini görmek için, 244 fekal örnekte çalışmışlardır. Bu suşların 12'si antibiyotiğe dirençli olan *E.coli* suşu olup 87 dirençli suşun hiçbirinde transfer edilebilen R plazmidlerine rastlanmamıştır. Bunun aksine olarak, 33 suşun 20'si dirençli *E.coli* suşu olup R plazmidi taşımaktadırlar, antibiyotiğe direnç gösteren 161 suşun 50'sinde R plazmidi taşıdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, antibiyotiğe direnç gösteren *E.coli* suşlarının çevrede "mikrobiyal indikatör" olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Böylece çevresel kirliliğin tayini yapılmıştır.

Enterik bakterilerin hasta barsaklarındaki normal flora bakterilerinden birçok antibiyotiğe birden direnç özelliğini kolayca alınabilmesi ve bu tip direnci kolaylıkla bulaştırabilecek olan bakterilerin tedavi de yaratabilecekleri problemlerin önemi açıkça görülmektedir (Akman, 1983). Bu tip direncin yurdumuz içinde ciddi problem teşkil ettiği bir gerçektir. Bunun için antibiyotik direnç testlerinin yapılması ve standardizasyonu, klinik laboratuvar işbirliğinin sağlanması, gelişi güzel antibiyotik kullanımının önlenmesiyle R faktörlerinin tedavi edici hekimlikte yarattığı güçlükler azaltılabilir ve her yeni antibiyotiğin daha uzun süre etkinliği sağlanabilir.

Bizim incelediğimiz sınırlı sayıda suş ile saptadığımız bulgulara dayanarak, yurdumuzdaki *E.coli* suşlarında R faktörlerinin bulunuş oranları hakkında kesin bir yargıya varılamaz ise de, bulgularımız bu tip direncin yaygınlığını bildiren çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan *E.coli* suşlarının genellikle hastane ortamından ve hastalıklı materyallerden izole edilmiş olmasına karşın, bizim çalışmamızın ilginçliği çalıştığımız verici *E.coli* suşlarının deniz suyundan izole edilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu konuda doğrudan karşılaştırma yapacağımız bir çalışmaya rastlamamakla birlikte bakteri kolonilerinde antibiyotiklere direnç konusunda ekstrinsik direnç ile intrinsik direnç olgularının birbirine yakın olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca bakteri toplumlarındaki bulaşıcı tipte dirençlilik durumunun yayılmakta olduğu da söylenebilir. Farklı kaynaklardan izole edilmesine karşılık az sayıda *E.coli* suşunda saptadığımız bulgular bunu göstermiştir.

Bu çalışmada, antibiyotik ve metal dirençliliği fenomenlerinin birbirleriyle ilişkisine değinilmemiştir. Ancak çevreyi kirleten metal kontaminantların, dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğu ileri sürülmekte olup, İzmit Körfezinde de deniz ve çevre kirlenmesinde ağır metal atıkları başrolü oynamaktadır. Son yıllarda ağır metallerin çevrede (deniz, göl, nehir vb.) doğal ve yapay yollarla yapılan atık suların arıtılması işlemleri sırasında, bakteriler tarafından biyolojik transformasyona uğratarak, toksik metal bileşiklerine dönüştürüldükleri de açıklanmıştır. Burada mevcut parametrelerin incelenmeye muhtaç olduğu ve daha ileri çalışmaları gerektirdiği görülmekte olup, açıklanması gereken pekçok sorun bulunmaktadır.



Çalışmamızın ilk aşamasındaki bulgularımız, İzmit Körfezindeki kirlenmenin ve kirlilik indikatörü olan koliform varlığının önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmayı İzmit Körfezindeki deniz canlılarında ağır metallerin R plazmidleriyle ilişkisi ve antibiyotiklerde dirençlilik ilişkisinin incelenmesiyle sürdürerek daha ileri çalışmalarla geliştirmek mümkündür.

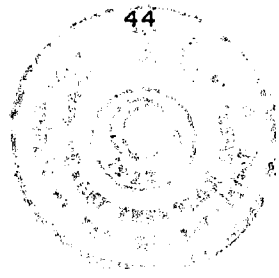
Bu çalışmada ayrıca su kaynaklı ve patojen olan *E.coli* suşlarının en az 2 antibiyotiğe birden çoklu direnç taşıdıkları ve bu dirençliliklerini R plazmidleri ile aktarabilme yeteneğinde oldukları isbat edilmiştir. Bununla beraber, koliform bakterilerde çoklu dirençliliği sağlayan R plazmidlerinin varlığı da saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları İzmit Körfezindeki *E.coli* suşlarının direnç modelinin tanıtılmasında etkili olabilecektir.





KAYNAKLAR

- Akalın, H.E., Baykal, M., Gram(-) Bakterilerin Aminoglikozit Grubu Antibiyotiklere Dirençlilikleri, Mikrobiyoloji Bült. 16:1-4, 1982
- Akın, A., Ankara'da çeşitli kaynaklardan soyutlanan Proteusların Biyokimyasal Özellikleri Proteosinlerle Tiplendirilmesi ve Antibakteriyellere Dirençliliklerinin R plazmidleri ile ilişkisi, Ankara Üniv. Ecz. Fak., 1982
- Akman, M., Bakteri Genetiği. Cumhuriyet Üniv. Yayını, Sivas, 1983
- Akman, M., Türkiye'de izole edilmiş olan Shigella suşlarında Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç Varlığı "R Faktörü" Mikrobiyoloji Bült. 6:22, 1972
- Akman, M., Türet, S., Çetinkaya Ş., Enterik bakterilerin Bulaşıcı Antibiyotik-Direnç "R faktörü" Varlığı bakımından incelenmesinde yeni bir yöntem. Türk Hijyen Tec. Biyoloji Dergisi, 32:1, 1972
- Akman, M., Gülmezoğlu E., Tıbbi Mikrobiyoloji Hacetepe Üniv. Yayını A-15 çeviri 11. Baskı, Ankara, 1974
- Akman, M., Gülmezoğlu E., Tıbbi Mikrobiyoloji Hacetepe Üniv. Yayını, 64-96, Ankara, 1976
- Akman, M., Antibiyotiklere dirençli enterik bakteri suşlarının artışı ve R plazmidleri. Mikrobiyoloji Bült. 13:313-320, 1979
- Akman, M., Bakteri Genetiği. Cumhuriyet Üniv. Yayını, Sivas, 1985
- Alaedinoğlu, G.Ph.Dr. Thesis University of Reading, Engg. ,1976
- Anderson, M.F., Datta, N., Shaw, E.J., R factors in Hospital İnfection. British Medical Journal, 3, 82-85, 1972
- Anderson, J.D. Gillespie, W.A., Richmond, M.H., Chemotherapy and Antibiotic-Resistance Transfer between Enterobacteriaceae in the human Gastrointestinal Tract. J. Med. Microbiol., 6, 1973
- Anderson, E. S., İnfluence of the Delta transfer factor on the phage sensitivity of Salmonella. Nature. 212, 795, 1966
- Anderson, E.S., Lewis, M.J., Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in Salmonella typhimurium Nature, 208, 1965



Arda, M., Genel Bakteriyoloji, 1978

Aydın, N., Plazmidler, Epizomlar, 1978

Barkay, T., Fouts, D.L. and Olson, B.H., Preparation of a DNA Gene Probe for Detection of Mercury Resistance genes in Gram Negative Bacteriel Communities., 1985

Barth, E.F., Ettinger, M.B., Salatto, B.V. and Mcdermott G.N., Summary report on the effect of heavy metods on the biological treatment process, 1965

Berkman, E., Aminoglikozid Antibiyotikler, Kimyasal yapıları Modifiye edici enzimleri günümüzdeki etkinlikleri ve geliştirilme yöntemleri. Mikrobiyoloji Bült. 15: 189-206, 1981

Bilgehan, H., Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Ege Üniv. Tıp Fak. Yayın No:84, İzmir, 1984

Bilgehan, H., Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, 1987

Bilgehan, H., Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 4-11, 1990

Bilim ve Teknik Dergisi, Haziran , TÜBİTAK, 1991

Campbell, A.M., Episomes. Adv. Genetics, 11: 101-145, 1962

Coşkun, Ş., Deniz Sularının Mikrobiyolojik Analiz Yöntemleri. 13:İzmir, 1993

Çetin, E.T., Pratik Mikrobiyoloji, 185-186, İstanbul, 1965

Çetin, E.T., Pratik Mikrobiyoloji, 93, İstanbul, 1973

Çetinkaya, Ş., Hacettepe hastanelerine gelen hastalardan izole edilen E.coli suşlarında Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç "R faktörü" Varlığı. Mikrobiyoloji Bült. 7, 11-15, 1973

Datta, N., Lawn A.M., Meynell, E., The relationship of F type piliation and F phage sensitivity to drug resistance transfer in R⁺ F E.coli K12. J. Gen. Microbiol., 45: 365, 1966

Datta, N, Transmissible drug resistance in an epidemic strain of Salmonella typhimurium. J. Hyg. Camb.60: 301-306, 1962

Datta, N., Elizabeth, J.S. Felicity, M.A., R factor in hospital infection. British Medical Journal, 3:82-86, 1972

- David R. Shaw and Victor J. Cabelli , R plasmid Transfer Frequencies from Environmental Isolates of E.coli to Laboratory and Fecal Strains, 1980
- Dökmeçi, İ., Farmakoloji, Dicle.Üniv. Tıp Fak.yayımları 81, 1979
- Ertong, C., Çeşitli Klinik materyallerden izole edilen E.coli suşlarındaki dirençliliğin R faktörü ile ilişkisi uzmanlık tezi. Ankara Üniv. Tıp Fak., 1983
- Günalp, A., Sokak tipi E.coli suşlarında kromozom transferi yaptıran plazmidlerin dağılımı ve bulunuş oranları üzerinde bir araştırma. Mikrobiyoloji Bült. 2,12,168, 177, 1978
- İzgür, M., Sağlıklı hayvanlarda izole edilen E.coli suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler (Doktora Tezi), 1981
- Joo, I and et al., Biochemical İmmunochemical and İmmunobiological properties of a chloramphenicol-resistant Salmonella typhi Strain isolated in Mexico. 223-470, 1975
- Kayaalp, O., Tıbbi Farmakoloji , Ankara, 1978
- K.,Wachsmuth, J. Dıboy, K.Birkness, D. Sack and J.Wells , Genetic Transfer of Antimicrobial Resistance and Enterotoxigenicity Among E.coli Strains, Antimicrobial Agents Chem.2, 23,278-283,1983
- Keskin, M., Sağlık Açısından Deniz Suları Mikrobiyolojisine Yaklaşımlar. 6: İzmir, 1990
- Lars H. Vorland, Karin Carlson, Odd Aolen , Antibiotic Resistance and small R plasmids Among E.coli Isolates from Outpatient Urinary Tract İnfections in Northern Norway, 1984
- Martinez, M. Mondoca-M.A., Zemelman R Rev Latinoam-Microbiol. 36(1): 39-46, 1994
- Mayer, K. H., Fling M.E. Hopkins, J.D. and O. Brien, T.F. ,Trimethoprim resistance in multiple Genera of Enterobacteriaceae at a U.S. hospital spread of the type II Dihydrofolate Reductase gene by a single plasmid. J. Infect. Dis. 5,151,783- 789, 1985
- Mitsuhashi, S., Harada, K., Kameda, M., Suzuki, M. and Egawa, On the drug resistance of enteric bacteria 3. Transmission of the drug resistance from Shigella to F- or HRr Strains of E.coli K12. J. Exptl. Med., 30: 301-306, 1960
- Mitsuhashi, S. Tanaka, T., Drug Resistance of enteric bacteria. Journal of Bacteriology, 93: 1242, 1967
- Novick, R.P. and Brodsky, R., Studies on plasmid replication I. Plasmid incompatibility and establishment in Staphylococcus aureus. J. Mol. Biol. 68:285-

Özenci, H., Ankara'da çeşitli kaynaklardan soyutlanan Klebsiella'ların biyotipleri, serotipleri antibiyotiklere invitro dirençlilikleri ve dirençliliklerinin R plazmidleri ile ilişkileri. A.Ü.Tıp Fak., 1979

Peterson, B.C., Hashimoto H., Rownd R.H., Cointegrate Formation between Homologous plasmids in E.coli J. Bacteriol, 3,151,1086-1094, 1982

Tekinşen. C., Suyun Bakteriyolojik Muayenesi, Ankara Üniv. Vet. Fak. 324: 10-15, 20-27, 53-60, 1976

Toshio Kinjo, Nobuyuki Minamoto, Makoto Sugiyama and Yashihiro Sugiyama, Comparison of Antimicrobial Resistance E.coli in Wild and Captive Japanese Serows, 1992

Türet, S., 1971-1972 yıllarında izole edilen Salmonella suşlarında resistans transfer faktörlerinin gösterilişi. Mikrobiyoloji Bült. 6, 439-444, 1972

Uçar N., Enterobakterilerde Antibiyotiklere Resistans ve Resistans Transfer Faktörü. Türk Vet. Hek. Dergisi. 39:7, 17-18, 1969

Watanabe, T. and Fusawa, T., Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae, 1. Transfer of resistance factors by conjugation. Jour.. Bacterial. 81: 669-678, 1961

Watanabe, T., Infective heredity of Multiple drug resistance in Bacteria. Bac. Rev., 27: 87-115, 1963

Watanabe, T., Infectious drug resistance in enteric bacteria, New England. Jour..Med.275, 888, 1966

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Konya’da doğdu. 1989 yılında Konya Atatürk Kız Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Öğrenimine başladı, aynı zamanda Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesinden 4 yıl boyunca Pedagojik Formasyon dersleri aldı. 1993 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 1995 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.

