

### Öne Çıkan Sonuçlar:

- Akuakültürde fekal kökenli koliform bakteriler tespit edilmiştir.
- Fekal koliform bakterilerinin antimikrobiyal direnç genlerinin taşıyıcısı oldukları belirlenmiştir.
- Akuakültür kaynaklarında antimikrobiyal direnç genlerinin varlığı ortaya konmuştur

### Yazışma yazarı:

Özacan YAVAŞ,  
yavas.ozcann@gmail.com

### Referans:

Yavas, O., Duman, M., Satıcıoğlu, I. B., Garip, E., Karaer, F., Altun, S., (2018), Akuakültürde Tespit Edilen Fekal Koliform Kökenli Antimikrobiyal Direnç Genleri, İklim Değişikliği ve Çevre, 3, (4) 22–26,

Makale Gönderimi : 19 TEMMUZ 2018  
Online Kabul : 9 AĞUSTOS 2018  
Online Basım : 15 AĞUSTOS 2018

Özcan YAVAŞ<sup>1</sup>, Muhammed DUMAN<sup>2</sup>, İzzet B. SATICIOĞLU<sup>3</sup>, Ebru GARİP<sup>1</sup>, Feza KARAER<sup>1</sup>, Soner ALTUN<sup>2</sup>

1 Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, BURSA

2 Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri A.B.D, BURSA

3 Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları A.B.D, KAYSERİ

### Özet

Akarsu ve denizler üzerinde faaliyet gösteren balık çiftliklerinin son yıllarda sayıları artmış olup bu çiftliklerde kullanılan atık sular arıtılmadan direkt doğaya deşarj edilmektedir. Balık çiftlikleri genel olarak su kaynaklarının atık su, kentsel su ve çiftlik suları ile karıştırılıp karıştırılmadığına bakılmaksızın akarsu ya da barajlar üzerinde kurulmakta ve bu sular sucul canlılar ve karasal hayvanlar tarafından kullanılmaktadır. Akarsulara kentsel atık suların karışması ile balık çiftliklerinde koliform kontaminasyonuna neden olmaktadır.

Bu çalışma sularda kirlilik göstergesi olan *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter asburiae* gibi fekal koliformların ve antimikrobiyal direnç genlerinin tespit edilerek fekal koliformların akuatik ortamları kontaminasyonunu engellenmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışma kapsamında toplam 6 adet *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter asburiae* 16S rRNA ve *gyrB* gen bölgesi de dahil olmak üzere biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Daha sonra gen bölgesinden elde edilen sonuçlar, Gen Bank veri tabanında karşılaştırılmış ve veri tabanında kayıtlı olan izolatlarla karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Akuakültür, Antimikrobiyal Direnç Genleri, *Enterobacter*, Fekal Koliform

## The Antimicrobial Resistance Genes Originated From Fecal Coliform in Aquaculture

### Abstract

Fish farms are established generally on the stream or dam lakes regardless of if the water supply is mixed with waste water, urban water, and other farm water. Also there is the most important factor is other terrestrial animal could use this water or contaminated it. Aquaculture waters could be polluted when urban wastes mixing of farm waters thus result coliform contamination that the most important quality factor to water quality in addition other polluted factors.

It has been demonstrated that bacterial flora of fish reflects the aquatic environments microbiota. Fecal coliforms such as *Enterobacter cloacae* are not intestinal tract flora of fish that usually originate from feces of warm blooded animals hence their presence in the infected fish or aquaculture water supply demonstrates the pollution of their environment.

A total of six *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter asburiae* were characterized based on biochemical and molecular methods including 16S rRNA and the *gyrB* housekeeping gene region. The sequence results obtained from the 16S rRNA and *gyrB* gene region were deposited in the GenBank database and compared with isolates from different countries that were registered in the database.

**Keywords:** Aquaculture, Antimicrobial Resistance Genes, *Enterobacter*, Fecal Coliforms

### 1. Giriş

Son yıllarda *Enterobacter* spp. klinik anlamda önem kazanmış ve yoğun bakım hastalarından hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni/patojeni olarak ortaya çıkmıştır (Bell vd., 2003). Ulusal Hastane Enfeksiyonları Gözetim Sistemi, 1976'dan 1989'a kadar hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonlar hakkındaki veriler Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı (2008)'na bildirilmiş ve yapılan bildirim yaklaşık %5'ini *Enterobacter* spp. oluşturmuştur (Bell vd., 2003; Biendo vd., 2008). Bir diğer çalışmada, 1995-2002 yılları arasında 24179 hastane kaynaklı septisemi vakasında *Enterobacter* spp. en sık izole edilen on adet patojenden biri haline gelmiştir (Biendo vd., 2008).

Son yıllarda *Enterobacter cloacae* kompleksine *E. cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter nimipressuralis* olmak üzere

altı türü tanımlanmıştır. En önemli temsilcisi *E. cloacae*, dünya genelindeki sağlık alanında önemli bir patojen olarak ortaya çıkmıştır. *E. cloacae*, hastane kökenli sepsisin% 5'inde, nozokomiyal pnömonilerin% 5'inde, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının% 4'ünde ve postoperatif peritonit olgularının% 10'unda izole edilmiştir (Castanheira vd., 2011; Chen vd., 2011).

*E. cloacae* ve diğer Enterobacter türlerinin hastane kaynaklı enfeksiyonlarda bu kadar yaygın izole edilmeleri bu etkenlerin insan sağlığı açısından oldukça önemli bir patojen olduklarını göstermektedir. Hayvanlarda meydana gelen hastalık vakalarında ise Enterobacter genusuna ait etkenler izole edilmiş olsa da bu bakterilerin hastalık oluşturmalarına dair bildirimler oldukça sınırlıdır. Hastalık vakalarının yanı sıra insan ve hayvan dışkılarında, su, toprak, bitki, bitki malzemeleri, böcek ve süt ürünlerinde de enterik patojenlerin tespiti yapılmıştır (Davidson vd., 2000; Neto vd., 2003). Enterik patojenlerin geniş yayılımı bu patojenlerin akarsu ve dolayısıyla balıklara da bulaşması ile sonuçlanmış ve balıklarda enterik patojenlerin izole edildiğine dair bildirimler yapılmıştır (Janssen ve Meyers 1968; Aoki ve diğerleri 1973). Bu bildirimler özellikle akarsu ve akuakültürde fekal kontaminasyon oluştuğunu göstermiştir.

Fırsatçı patojenler hem insan sağlığında hem de akuakültürde antimikrobiyal direncin rezervuarı olarak görev yaparlar. Bu etkenler ortamda sürekli bulunarak kullanılan antimikrobiyallere düşük düzeyde maruz kalırlar ve böylelikle hemen her antimikrobiyale karşı direnç geliştirir ve bu direnci çevreye yararlar (Roberts, 2005; Pei vd., 2006; Martinez, 2009; McKinney vd., 2010; DiConza ve Gutkind, 2010; Kang vd., 2010; Su vd., 2011).

Çalışma kapsamında akuakültürden izole edilen Enterobacter genusuna ait patojenlerde tespit edilen direnç genleri araştırılmış ve böylece akuakültür yetiştiriciliği yapılan işletmelerde hem suların Enterik patojenlerle hem de antimikrobiyal direnç genleri ile kontaminasyonu ortaya konmuştur.

## 2. Veri ve Çalışma Alanı

### 2.1 Bakterilerin identifikasyonu

Akuakültürde yetiştiriciliği yapılan ve hastalık semptomu gösteren gökkuşağı alabalıklarından, su ve bentik örneklerinden bakteriyolojik örneklemeler yapılmıştır. Örneklemeler, balık hastalıklarının teşhisi için kılavuz ilkeleri izleyerek ve hayvan refahı için uluslararası yönergeleri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir (OIE, 2000). İzole edilen etkenler klasik mikrobiyolojik testler ve 16S rRNA PCR analizi ile doğrulanmıştır (Duman vd., 2018).

## 3. Yöntem

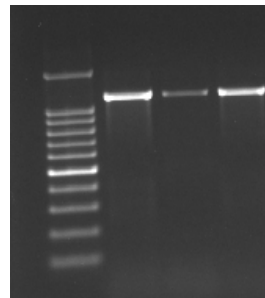
### 3.2 Antimikrobiyal duyarlılık testi ve direnç genleri

Antimikrobiyal duyarlılık testi açısından izolatlar Florfenikol (FFC, Sigma, F1427), tetrasiklin (TET; Sigma, 31741), sülfametoksazol (SUL; Sigma, S7507), sülfametoksazol-trimetoprim'e karşı broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak duyarlılık testi yapılmıştır (CLSI 2014). Kalite kontrolü (QC) suşları olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. 22 ° C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra plakalar 595 nm dalga boyunda bir mikropilaka okuyucuda (Multiscan Go, Thermo) ölçülmüş ve duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir (CLSI, 2014). Ayrıca tüm izolatlara FFC, TET ve SUL dirençliliği açısından moleküler olarak antimikrobiyal direnç gen tespiti yapılmıştır.

## 4. Bulgular

### 4.1 Bakteriyel İdentifikasyon

Tüm suşlar Gram negatif, katalaz pozitif, O/F fermentatif, vibriostat (O/129) dirençli, MacConkeyde üreme pozitif özellik göstermiş ve Enterobacter genusuna dahil olduğu belirlenmiştir. PCR analizi sonucunda tüm izolatlara sekans analizi yapılmış ve çalışmada kullanılan 3 izolatın *E. cloacae* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların PCR görüntüleri Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. *E. cloacae* 16S rRNA PCR görüntüsü (1100bp)

### 4.2 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ve Direnç Genleri

Yapılan antimikrobiyal duyarlılık testinde iki izolatın (ENT1 ve ENT3) florfenikol dirençli olduğu,

tüm izolatların sulfanomid'lere karşı dirençli ancak tetrasikline duyarlı olduğu tespit edilmiştir. ENT2 izolatının florfenikol duyarlı olmasına rağmen floR antimikrobiyal direnç geni taşıdığı ve aynı zamanda da tetD direnç geninin taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. ENT2 ve ENT3 izolatlarının fenotipik olarak TET duyarlı iken tetrasiklin direnç geni taşıyıcısı oldukları belirlenmiş ve ENT3 izolatında tetD ve tetE direnç genleri tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların tamamında sul1, sul2, sul3, tetA, tetB ve tetC antimikrobiyal direnç genlerini taşımadıkları belirlenmiştir.

Tablo 1. Bakteri İdentifikasyon Yüzdeleri

Bakteri	FFC MIC (8)	florR	SUL MC (128)	su1	su2	su3	TET MIC (8)	tetA	tetB	tetC	tetD	tetE	Sekans sonuç	ID
ENT1	64-	-	256<	-	-	-	2	-	-	-	-	-	Enterobacter cloacae	99
ENT2	1-	+	256<	-	-	-	0,256-	-	-	-	+	-	Enterobacter cloacae	99
ENT3	16-	-	256<	-	-	-	0,512-	-	-	-	+	+	Enterobacter cloacae	99

## 5. Sonuç

Hastane kaynaklı ve önemli bir enfeksiyon olan *Enterobacter cloacae*'nin insanlarda hastalık oluşturduğuna dair birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bakteriyel septisemi vakalarında *E. cloacae* ve Enterobacteriaceae genusunda bulunan diğer etkenler izole edilmiş ve bu etkenlerin insanlar açısından önemli bir patojen olduğu tespit edilmiştir (Hansen vd., 1990; Nieto ve Lopez, 1990; Vigneulle ve Laurensin, 1995). Akuakültürde *Enterobacter* türlerinin tespit edilmesi yetiştiricilik yapılan suların atıklarla ve fekal kaynaklarla kontamine olduğunu göstermektedir (Sekar et al., 2008). Büyük çoğunluğu insanlar için fırsatçı patojen olan *E. cloacae* etkenleri hastane kaynaklı enfeksiyonların büyük çoğunluğundan izole edilmektedir. Dolayısıyla bu etkenler tedavi amaçlı kullanılan hemen her antimikrobiyale maruz kalmakta ve düşük düzeyde de olsa antimikrobiyallere karşı direnç geliştirmektedirler (Levesque vd., 1995; Srinivasan vd., 2005; Agerso ve Petersen, 2006; Akinbowale vd., 2007). Yaptığımız çalışmada fenotipik olarak antimikrobiyal direnç geliştirmedeği tespit edilen *E. cloacae* türlerinin direnç geni taşıdığı belirlenmiştir. İnsanlardan yapılan *E. cloacae* izolasyon çalışmalarında çok sayıda antimikrobiyal direnç geni tespit edilmiş ve hem fenotipik hem de genotipik olarak bu etkenlerin antimikrobiyal direnç geliştirmiş olduğu belirlenmiştir (Chen-Yang vd., 2011). Çalışmamızda izolatların genotipik direnç geliştirmiş olduğu belirlenirken fenotipik direnç geliştirmedikleri tespit edilmiş ve bu sonuçlar da tespit edilen etkenlerin farklı ortamlarda direnç geni

kazanan ve akuakültüre ulaşan etkenler olabilecekleri de risk faktörleri arasındadır. Özellikle akuakültürde *Enterobacter* türlerine yönelik bir hastalık bildirimine rastlanmazken bu etkenlere yönelik tedavi protokolleri de uygulanmamaktadır. Dolayısıyla antimikrobiyal direnç geliştirmiş olan bu etkenlerin akuakültürde kullanılan antimikrobialardan etkilenerek direnç genlerini kazandıkları düşünülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda akuakültürden *E. cloacae* ve bu etkenlerde de antimikrobiyal direnç genlerinin tespit edilmiş olması akuakültür sularının atık sularla ya da fekal kaynaklarla kontamine olduğunu, tespit edilen bu etkenlerin ve direnç genlerinin de su ve balık yoluyla insanlara ulaşabilme potansiyelinde olabileceği yönüyle önemli bir risk faktörü oluşturduğu belirlenmiştir.

### 6. Kaynaklar

- Agersø, Y., A. Petersen, (2006), The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene *sullI* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(1), 23-27.
- Akinbowale, O., H. Peng, M. Barton (2007), P514 Class 1 integron mediates antibiotic resistance in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, S113.
- Aoki, T., S. Egusa, and T. Watanabe, (1973), Detection of R bacteria in cultured marine fish, yellowtails (*Seriola quinqueradiata*), *Jpn J Microbiol* 17, 7–12.
- Bell, J. M., J. D. Turnidge, R. N. Jones (2003), Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactemse producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pasific Region: results from the SENTRY Antimicrobial Survetllance Program, 1998-2001., *Antimicrobial Agents Chemother*, 47, 3989-3993.
- Biendo, M, et al. (2008), Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV and CTX-M beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*, *Res. Microbiol.*, 159, 590 –594.
- Castanheira, M., et al. (2011), Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007, *Antimicrob. Agents Chemother*, 55, 1274 –1278.
- Chen, Y. H., et al. (2011), Antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intraabdominal infections in the Asia-Pacific region according to currently established susceptibility interpretive criteria., *J. Infect.*, 62, 280 –291.
- Davidson, E. W., R. C. Rosell, and D. L. Hendrix (2000), Culturable bacteria associated with the whitefly, *Bemisia argentifolii* (*Homoptera: aleyrodidae*), *Fla Entomol*, 83, 159–171.
- Di Conza, J. A., G. O. Gutkind (2010), Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista argentina de microbiología*, 42(1), 63-78.
- Hansen, G. N., J. Raa, and J. A. Olafsen (1990), Isolation of *Enterobacter agglomerans* from dolphin fish, *Coryphaena hippurus* L. *J Fish Dis* 13, 93–96.
- Su, H. C., G. G. Ying, R. Tao, R. Q. Zhang, L. R. Fogarty, & D. W. Kolpin (2011), Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from integrated fish farms in south China. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(11), 3229-3236. Janssen, W.A. and Meyers, C.D., 1968, Fish: serologic evidence of infection with human pathogens, *Science* 159, 547–548.
- Kang, M. S., A. Kim, B. Y. Jung, M. Her, W. Jeong, Y. M. Cho, Y. K. Kwon (2010), Characterization of antimicrobial resistance of recent *Salmonella enterica* serovar Gallinarum isolates from chickens in South Korea. *Avian pathology*, 39(3), 201-205.C.
- Levesque, L. Piche, C. Larose and P. H. Roy, 1995, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 185–191.
- Martinez, J. L. (2009), Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11), 2893-2902.
- McKinney, C. W., K. A. Loftin, M. T. Meyer, J. G. Davis, A. Pruden (2010), Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence. *Environmental science & technology*, 44(16), 6102-6109.
- Neto, R.J., T. Yano, L.O.S. Beriam, S. A. L. Destefano, V. M. Oliveira, and Y. B. Rosato (2003), Comparative RFLP- ITS Analysis between *Enterobacter cloacae* strains isolated from plants and clinical origin., *Arq Inst Biol*, 70367–372.
- Nieto, T. P. and L. R. Lopez (1990), Isolation of *Serratia plymuthica* as an opportunistic pathogen in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 13, 175–177.
- Pei, R., S. C. Kim, K. H. Carlson, A. Pruden (2006), Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water research*, 40(12), 2427-2435.
- Roberts, M. C. (2005), Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS microbiology letters*, 245(2), 195-203.
- Srinivasan, V., H. M. Nam, L. T. Nguyen, B. Tamilselvam, S. E. Murinda, S. P. Oliver (2005), Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2(3), 201-211.
- Thillai Sekar, V., T. C. Santiago, K. K. Vijayan, S. V. Alavandi, V. Stalin Raj, J. J. S. Rajan, N.

- Kalaimani (2008), Involvement of *Enterobacter cloacae* in the mortality of the fish, *Mugil cephalus*. Letters in applied microbiology, 46(6), 667-672.
- Vigneulle, M., F. B. Laurencin (1995), *Serratia liquefaciens*: a case report in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in floating cages in France. Aquaculture, 132(1-2), 121-124.