

Doğu Akdeniz'den İzole Edilen *Enterococcus faecalis* Bakterilerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençliliği

Fatih Matyar^{1,*}, Sadık Dinçer²

¹Çukurova Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen ve Teknoloji Öğretmenliği, 01330 Sarıçam, Adana, Türkiye

² Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 01330 Sarıçam, Adana, Türkiye

*Yazışılan yazar e-posta: fmatyar@cu.edu.tr

Alınış:15 Aralık 2009, Kabul: 02 Mayıs 2010

Özet: Bu çalışmada Akdeniz'den izole edilen 158 adet *Enterococcus faecalis* bakterilerinin 15 farklı antibiyotiğe ve dört farklı ağır metale karşı dirençliliği sırasıyla agar difüzyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Gentamisine (%98.7), siproflaksine (%77.8), imipeneme (%77.2) ve levofloksasine (%72.8) karşı yüksek antibiyotik dirençliliği bulunurken, en az dirençlilik ise vankomisine (%3.2) minosikline (%13.3) ve kinopristin-dalfopristine (%13.3) karşı bulunmuştur. Çoklu antibiyotik dirençlilik (ÇAD) indeksleri 0.2-0.93 arasında değişmektedir. Birçok izolat farklı ağır metal derişimlerine tolerans göstermiştir. Bu sonuçlar Doğu Akdeniz'in önemli miktarda antibiyotik ve ağır metal dirençliliği taşıyan *Enterococcus faecalis* barındırdığını ve bununda halk sağlığı açısından potansiyel bir risk taşıdığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler : *Enterococcus faecalis*, antibiyotik dirençliliği, ağır metal

Antibiotic and Heavy Metal Resistance of *Enterococcus faecalis* Isolated from Eastern Mediterranean Sea

Abstract: In this study the resistance of 158 *Enterococcus faecalis* isolates recovered from Mediterranean Sea to 15 different antibiotics and four heavy metals was investigated by agar diffusion and agar dilution methods respectively. A high incidence of resistance to gentamicine (98.7%), ciprofloxacin (77.8%), imipenem (77.2%) and levofloxacin (72.8%), as well as almost an absence of resistance to vancomycin (3.2%), minocycline (13.3 %) and quinupristin-dalfopristin (13.3%) was found among the isolates. Multiple antibiotic resistance (MAR) index ranging from 0.2 to 0.93. Most isolates were showed tolerance to different concentrations of heavy metals. These results suggest that Eastern Mediterranean Sea has important proportion of antibiotic and heavy metal resistant *Enterococcus faecalis* and these bacteria can be responsible a potential risk for public health.

Key words: *Enterococcus faecalis*, antibiotic resistance, heavy metal

1. Giriş

Enterokok cinsi bakteriler 10-45°C'de üreyebilen, %6.5 NaCl'lü ortamlarda üremeyi sürdürebilen, 60°C'de 30 dakika canlı kalabilen bakterilerdir. Ayrıca yüksek pH'da (pH 9.6) %40 safra tuzu içeren ortamlarda üreyebilirler. Fakültatif anaerob bakterilerdir. Sitokrom enzimleri olmadığından katalaz negatifler [1].

Bugüne kadar 32 farklı türü bulunan Enterokoklardan *E. faecalis* ve *E. faecium* en önemli türler olup insanların sindirim sisteminin doğal florasında bulunmaktadır. Enterokoklar dışkı kaynaklı ve kötü çevre koşullarına karşı dayanıklı olmaları nedeniyle

genellikle gıda, bitki, su ve topraktan izole edilmektedirler [2]. Enterokoklar geniş bir konakçı dağılımına sahiptirler. Çeşitli hayvanların ve insanların sindirim sisteminde, ağızda, üreme ve boşaltım sisteminde ve derisi üzerinde bulunabilirler [3]. Canlı organizmalar dışında, yüzey sularından, akarsulardan, lağım sularından, topraktan ve çeşitli besin maddelerinden enterokok izolasyonu yapılmıştır [4, 5].

Enterokokların hastalık yapma özelliği az olmasına rağmen, toplum kaynaklı ve özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli etkenlerdir. *E. faecalis* ve *E. faecium*'un bazı suşları tarafından üretilen sitolizin insan ve hayvan eritrositleri için hemolizin aktivitesi gösterir. Ayrıca *E. faecalis* bakterilerinde görülen biyofilm oluşumu bu mikroorganizmaların boşaltım sistemine ve kalp kapaklarına kolonize olmasını kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda Enterokok türlerinde amfisilin ve penisiline karşı artan direnç tedavilerde bu antibiyotiklerin kullanımını sınırlamıştır [6]. Günümüzde bakteriyel balık patojenlerinin bulaşma yolları hakkında bilgi çok azdır. Balıklarda bulaşmanın direkt temasla ya da mikroorganizma bulaşmış balık yemleriyle olabileceği düşünülmektedir [7]. Kültür balıkçılığının gelişmesi ve artması ile birlikte balıklarda diğer bakteriyel enfeksiyonlarla birlikte Enterokokkal enfeksiyonlarda dünya çapında büyük bir problem olmaya başlamışlardır [8].

Bu çalışmada, İskenderun Körfezi kıyı şeridi boyunca alınan su örneklerinde *Enterococcus faecalis* bakterilerinin izole edilmesi, bunların antibiyotik ve ağır metal dirençlilik profillerinin çıkarılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

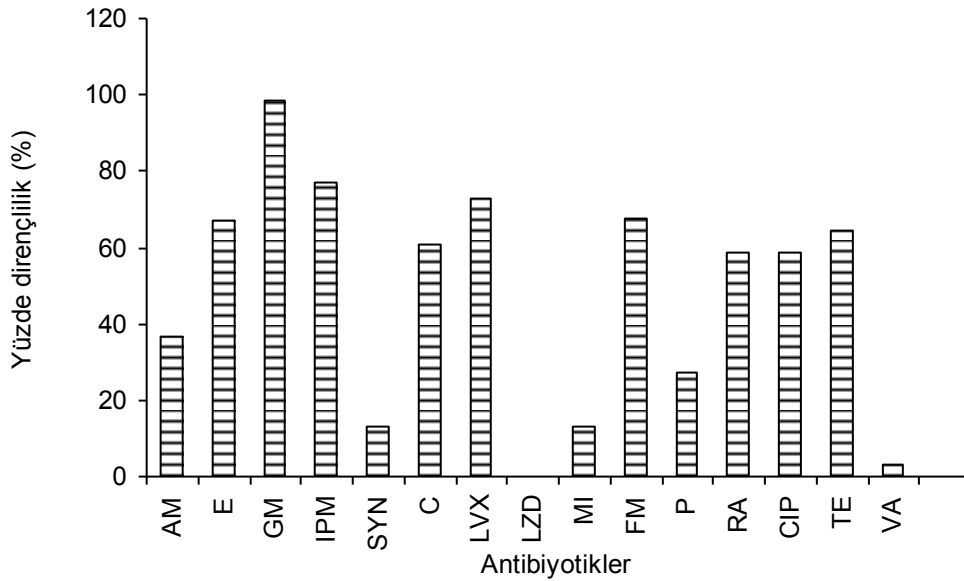
İskenderun Körfezi kıyı şeridi boyunca farklı noktalardan steril bakteriyolojik su numune şişesi kullanılarak deniz yüzeyinden 20 cm aşağıdan deniz suyu örnekleri alınmış (100ml) ve soğuk zincir korunarak 4 saat içerisinde laboratuvara getirilmiştir [9]. Deniz suyu örneklerinden alınan 1 ml su örneği, steril saf su içerisinde seri sulandırma ile *Enterococcus* selektif Agar a ekim yapılarak izolasyon sağlanmıştır. gr/lit olarak bileşimi: Tripton (Merck) 20; maya özütü (Difco) 5; dekstroz (Merck) 2; dipotasyumfosfat (Merck) 4; sodyum azit (Merck) 0.4; agar (Difco) 10; 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorid (Sigma) 0.1. Besi yeri içeriği incelendiği zaman alışlageldik bileşenler dışında göze çarpan Sodyum azit Gram negatif bakterilerin besi yeri ortamında gelişimini engellerken 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorid ise *Enterococcus faecalis* tarafından parçalanarak pembe-kırmızı renkli pigment oluşturarak şüpheli kolonilerin seçimine olanak sağlar. Şüpheli kolonilerin Gram boyama ve mikroskopik görüntülerine ilave olarak pH 9.6'da, %6.5 NaCl'li besi yerinde gelişme göstermeleriyle izolasyon işlemi tamamlanarak bakterilerin antibiyotik dirençlilik testlerinin ve tanımlamanın yapılabilmesi için Plate count agarda (PCA) (Merck) stok kültürleri hazırlanmıştır. Selektif izolasyonu takiben bakterilerin teşhisinin doğrulanması amacıyla VITEK II (Biomérieux, Fransa) tanımlama sistemi kullanılarak işlem gerçekleştirilmiştir.

Antibakteriyel hassasiyet testleri Mueller-Hinton agar (Difco) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [10]. Çalışmamızda kullanılan antibiyotik diskleri ve etki değerlikleri şu şekildedir. Ampisilin (AM, 10 µg), eritromisin (E, 15 µg), gentamisin (GM, 10 µg), imipenem (IPM, 10 µg), kinopristin\dalfopristin (SYN,

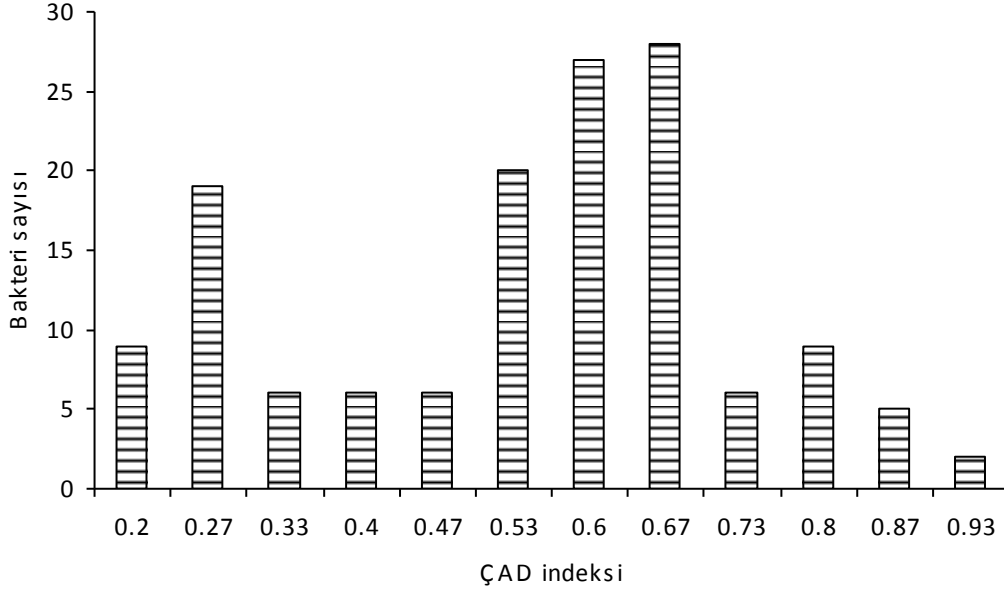
15 µg), kloramfenikol (C, 30 µg), levofloksasin (LVX, 5 µg), linezolid (LZD, 30 µg), minosiklin (MI, 30 µg), nitrofurantoin (FM, 300 µg), penisilin (P, 10 µg), rifampin (RA, 5 µg), siproflaksasin (CIP, 5 µg), tetrasiklin (TE, 30 µg), vankomisin (VA, 30 µg). *Enterococcus faecalis* ATTC 29212 kontrol organizma olarak kullanılmıştır. Tüm antibiyotik diskleri, Becton Dickinson (BBL, MD, Amerika) dan temin edilmiştir. Her bakteri izolatu için 12.5 µg/ml den 3200 µg/ml'ye kadar değişen konsantrasyonlarda Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ ve Mn²⁺ ağır metallerini ihtiva eden Mueller-Hinton agar (Difco) kullanılarak minimal inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir. Kullanılan dört farklı ağır metal tuzu şu formüllere sahiptir; CdCl₂.2H₂O, CuSO₄.5H₂O, Pb(NO₃)₂ ve MnCl₂.2H₂O (Merck). İzolatların minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) değerleri referans olarak kullanılan *Escherichia coli* K-12'nin MİK değerini geçmişse dirençli olarak sayılmışlardır [11].

3. Bulgular

Çalışmamızda toplam 158 adet *Enterococcus faecalis* izole edilmiş, bunların 15 farklı antibiyotiğe ve 4 farklı ağır metale karşı dirençlilikleri araştırılmıştır. En yüksek antibiyotik dirençliliği gentamisine (%98.7), siproflaksine (%77.8), imipeneme (77.2) ve levofloksasine (%72.8) karşı bulunurken, en az dirençlilik ise vankomisine (%3.2) minosikline (%13.3) ve kinopristin-dalfopristine (%13.3) karşı bulunmuştur. Linezolide karşı hiçbir izolat dirençlilik gösterememiştir (Şekil 1). ÇAD indeksleri araştırıldığında, ÇAD indekslerinin 0.2-0.93 arasında değişiklik gösterdiği, iki izolatın en fazla 14 farklı antibiyotiğe dirençlilik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2). İzolatların ağır metallere karşı gösterdiği tolerans, referans bakteri *E. coli* K-12'nin MİK değerine göre hesaplanmıştır. Referans bakterinin MİK değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre tüm izolatlar referans bakterinin tolerans gösterdiği kadmiyum ve manganez konsantrasyonlarını geçip bu iki ağır metale karşı %100 tolerans gösterirken, bakıra %72.8 ve kurşuna karşı %37.3 oranında tolerans göstermişlerdir (Şekil 3).



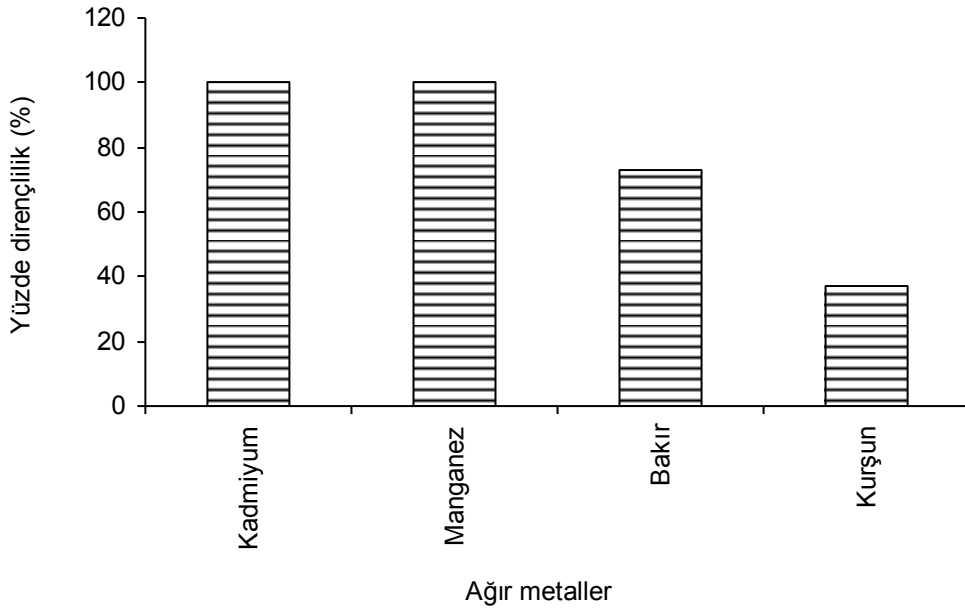
Şekil 1. İzolatların 15 farklı antibiyotiğe karşı % dirençlilikleri



Şekil 2. İzolatların ÇAD indeksleri

Tablo 1. Referans bakteri *E. coli* K-12 suşunun ağır metallere karşı MİK değerleri

Ağır metal	MİK Değeri
Kadmiyum	100 µg/mL
Bakır	200 µg/mL
Kurşun	1600 µg/mL
Manganez	1600 µg/mL



Şekil 3. İzolatların ağır metallere karşı tolerans yüzdeleri

4. Tartışma ve Sonuç

Yapılan çalışmada farklı antibiyotik sınıflarına karşı dirençlilik farklı bulunmuştur. En yüksek dirençlilik gentamisine karşı tespit edilmiştir. SAVAŞAN vd. [12] balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri üzerine yapmış oldukları çalışmada izolatların, siprofloksasin, eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, ampisilin, gentamisin, penisilin ve vankomisine sırasıyla %34.6, %3.8, %3.8, %96.1, %11.5, %92.3, %11.5 ve %3.8 oranında dirençli olduklarını bulmuşlardır. Gentamisine direnç bu çalışmada da yüksek çıkmıştır. Yine bu çalışmaya benzer olarak çalışmamızda vankomisine dirençlilik çok düşük çıkmıştır. Ancak enterokoklarda gittikçe artan vankomisin dirençliliği nedeniyle antimikrobiyal tedavi başarısız olmakta ve bu da enfeksiyonlardaki yüksek ölüm oranının başlıca nedenlerinden birisi olarak gösterilmektedir [13].

Farklı çalışmalar penisiline karşı olan dirençliliği farklı değerlerde göstermektedir. AKINCI vd. [14] yapmış oldukları çalışmada kan, idrar, yara, apse gibi materyallerden 70 enterokok izole ederek, bunların %70'ini *E. faecalis* olarak belirlemişlerdir ve suşlarının tümünü penisiline karşı hassas bulmuşlardır. Yugoslavya'da MIROVIC vd. [15] yaptıkları çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *E. faecalis* suşlarında penisilin direnç oranını %0.9, TOUTOUZA vd. [16] ise izole ettikleri *E. faecalis* suşlarında penisilin direnci oranını %75.8 olarak saptamışlardır. Çalışmamızdaki %27.2'si penisiline karşı dirençli olarak saptanmıştır. Antibiyotiklerin uygunsuz ve gelişigüzel kullanımı ile gerek toplum kökenli gerekse hastane kökenli dirençli mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlarda ciddi tedavi sorunları yaşanmaktadır. Bir antibiyotiğe dirençli olan etken kısa sürede birden çok ilaca karşı da direnç kazanmakta ve bu çoğul dirençli mikroorganizmalar hızla ortama yayılmaktadır [17]. Hastane, endüstriyel ve zirai atıkların verildiği suların dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında büyük rol oynadığı, bilinmektedir. Antibiyotiklere ve ağır metallere dirençli bakterilerin özellikle sucul ortamlarda gen transfer yöntemleriyle hassas bakterilere antibiyotik ve ağır metal dirençliliği kazandırmaktadır. Plazmitler ve transpozonlar bu olayda en büyük genetik etkenlerdir.

Çoklu antibiyotik dirençliliklerine bakıldığında 28 (%17.7) izolatın on farklı antibiyotiğe karşı dirençlilik gösterdiği saptanmıştır. MATYAR vd. [18] deniz suyundan izole ettikleri bakterilerde izolatların %16.7'sinin dört farklı antibiyotiğe karşı dirençli olduklarını bulmuşlardır. Birçok toksikolojik çalışmada farklı ortamlardan izole edilen bakterilerin ağır metal hassasiyeti ve ya dirençliliği araştırılmıştır [19, 20]. Çoğu çalışma çevredeki ağır metallerin mikrobiyal topluluklarda çeşitli modifikasyona sebep olduğunu ortaya koymaktadır [21].

İskenderun Körfezi liman özelliği olması nedeniyle ticarete anahtar rol oynayan bir bölgemizdir. Körfez kıyısında kurulmuş demir çelik fabrikaları, gübre fabrikası, rafineri ve termik santral körfezin endüstriyel olarak kirlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Çalışmamızda izole edilen toplam 158 izolatın tamamı kadmiyum ve manganeze karşı dirençli olarak saptanmıştır. Kurşun ve bakıra karşı görülen direnç değerleri ise sırasıyla %37.3 ve %72.8'dur. Bakır mikroorganizmaların çoğu için gerekli bir kofaktördür, bununla birlikte (Cu^{2+}) serbest iyonik formu yüksek konsantrasyonlarda toksiktir. Bu çift etki altında, bakterilerin orta seviyelerdeki hücre içi konsantrasyonlarda

yaşayabilme yeteneği söz konusudur. Bazı türlerde bakır dirençliliğinin genetiği, cıva dirençliliği kadar iyi anlaşılammış olmasına rağmen, operonlar içindeki genler tanımlanarak (örneğin; *E. coli*, *Enterococcus hirae*,) bu genlerin regülasyonunun, pompa sistemi ve bakır bağlama sistemleri ile yakından ilgili olduğu ortaya konmuştur. Son yıllarda hızlı nüfus artışı ve hızlı endüstrileşme sonucu özellikle sucul ortamda toksik ağır metal seviyesinin arttığını gösteren birçok çalışmanın yapılmıştır [22, 23].

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda İskenderun Körfezi deniz suyunun barındırdığı *E. faecalis* bakterilerin yüksek düzeyde çoklu antibiyotik dirençliliği taşıması, ayrıca ağır metallere karşı yüksek oranda tolerans göstermeleri körfez suyunun hastane ve endüstriyel atıklarla fazla miktarda kirlenmiş olabileceğinin göstergesidir. Bu bakterilerin özellikle tedavide sık kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli olmaları sorun teşkil edebilir. Bölge yerel yönetiminin ve bölge halkının antibiyotik kullanımı açısından uzman kişiler ya da hekimler tarafından bilgilendirilerek bilinçli antibiyotik kullanımı sağlanabilir. Ülkemizde çoğu zaman, başta üst solunum yolu enfeksiyonlarında hekime danışılmadan eczanelerden antibiyotik alınmasının önüne geçilmesi başka bir önlem olarak sayılabilir. Ayrıca endüstriyel atıkların sucul ortamlara verilmesinde daha dikkatli olunması ya da bu yolu seçenler için yaptırımlar getirilmesi başka bir önlem olarak sayılabilir.

Teşekkür

Projemize destek sağlayan Ç.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Fonu'na teşekkür ederiz (Proje No:EF2009BAP6).

Kaynaklar

- [1] Teixeria L.M., Facklam R.R., 2003. *Enterococcus*. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover Microbiology. Eighth edition, Washington. ASM Press. pp: 422-433.
- [2] Giraffa G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 163– 171.
- [3] Quednau M., Ahrne S., Peterson A.C., Molin G., 1998. Antibiotic resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 1163-1170.
- [4] Harwood V.J., Brownell M., Perusek W., Whitlock J.E., 2001. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 4930-4933.
- [5] Pinto B., Pierotti R., Canale G., Reali D., 1999. Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 258– 263.
- [6] Ersoy Y., Bayraktar M., Fırat M., Yağmur M., Durmaz R., 2005. Klinik örneklerden izole edilen enterokok suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*, 19: 92-96.
- [7] Romalde J.L., Magarinos B., Nunez S., Barja J.L., Toranzo A.E., 1996. Host range susceptibility of *Enterococcus* sp. strains isolated from diseased turbot: possible routes of infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 607–611.
- [8] Frick I.M., Morgelin M., Bjorck L., 2000. Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein-protein interactions. *Molecular Microbiology*, 37: 1232-1247.
- [9] Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D., 1992. APHA Microbial examination. In Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association Washington, pp. 9.1-9.147.
- [10] Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493–496.

- [11] Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., Barton M.D., 2007. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 177–182.
- [12] Savaşan S., Kaya O., Kırkan Ş., Çiftçi, A., 2008. Balık kökenli *Enterococcus faecalis* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 55: 107-110.
- [13] Malathum K., Murray B.E., 1999. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resistance Updates*, 2: 224–243.
- [14] Akıncı E., Balık İ., Tekeli E., 1999. Klinik örneklerden izole edilen Enterokok türlerinin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesi. *Flora*, 4: 40-45.
- [15] Mirovic V., Citic J., Tomanovic B., Nonkovic Z., 2000. Antimicrobial resistance of Enterococci from clinical specimens. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 171.
- [16] Toutouza M., Skandami V., Poujioukober M., Fakiri H., Karabassi V., Komninou Z., 2001. Resistance phenotypes in Enterococci isolated from clinical specimens during 3 year period. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 1-394.
- [17] Murray B.E., 1997. Vancomycin resistant enterococci. *American Journal of Medicine*, 102: 284-293.
- [18] Matyar F., Kaya A., Dinçer S., 2008. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*, 407: 279–285.
- [19] Duxbury T., Bicknell B., 1983. Metal-Tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 15: 243-250.
- [20] Doelman P., Jansen E., Michels M., Van Til M., 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soil*, 17: 177-184.
- [21] Starzecka A., Bednarz T., 1993. Comparison of development and metabolic activity of algae and bacteria in soil under the influence of short and long term contamination with metallurgic industrial dusts *Archiv für Hydrobiologie*, 98: 71-88.
- [22] Kalay M., Koyuncu C.E., Dönmez A.E., 2004. Comparison of Cd levels in the muscle and liver tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* caught from the Mersin Gulf. (in Turkish). *Ekoloji Dergisi*. 13: 23-27.
- [23] Yazkan M., Özdemir F., Gölükçü M., 2004. Cu, Zn, Pb and Cd contents in some molluscs and crustacea caught in the Gulf of Antalya (in Turkish). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 95-100.