T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENİZ SUYU İZOLATI GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN BAZI ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN VE VİRÜLANS ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZLI NESLİHAN GÜNGÖREN

Tez Danışmanı
PROF. DR. NURCİHAN HACIOĞLU DOĞRU

ÇANAKKALE – 2024

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENİZ SUYU İZOLATI GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN BAZI ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN VE VİRÜLANS ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZLI NESLİHAN GÜNGÖREN

Tez Danışmanı
PROF. DR. NURCİHAN HACIOĞLU DOĞRU

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2023-4382

ÇANAKKALE – 2024

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Nazlı Neslihan GÜNGÖREN tarafından Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU yönetiminde hazırlanan ve **29/01/2024** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Deniz Suyu İzolatı Gram Negatif Bakterilerin Bazı Antibiyotik Direnç Genlerinin ve Virülans Özelliklerinin Belirlenmesi**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**İmza**
Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU (Danışman)	……
Dr.Öğr. Üyesi Neslihan DEMİR	……
Dr. Öğr. Üyesi Derya DOĞANAY	……

Tez No : ……..

Tez Savunma Tarihi : 29/01/2024

……

Prof. Dr. AHMET EVREN ERGİNAL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU'na, tez çalışma sürecimde ve laboratuvar çalışmalarımda bana desteğini esirgemeyen sevgili Öğr. Gör. İlke KARAKAŞ, FYL-2023-4382 nolu proje ile tez çalışmamı destekleyen Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve çalışma süresince bana inanan, destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nazlı Neslihan GÜNGÖREN

Çanakkale, Ocak 2024

ÖZET

DENİZ SUYU İZOLATI GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN BAZI ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİNİN VE VİRÜLANS ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nazlı Neslihan GÜNGÖREN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU
29/01/2024, 80

Bu çalışmada, Çanakkale kıyı şeridi deniz suyundan izole edilmiş toplam 50 bakteri izolatının antibiyotik direnç profilleri, tetrasiklin ve vankomisin direnç genleri ile bazı virülans özellikleri (biyofilm, siderefor, enzimatik aktivite) araştırılmıştır. Direnç geni saptanan izolatların ayrıca moleküler identifikasyonları yapılmıştır. Antibiyogram testi sonuçlarına göre, izolatların %90'ın penisilin, %76'sı vankomisin, %68'i tetrasiklin, %54'ü ampisilin ve %8'i gentamisin antibiyotiklerine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. İzolatların %88'inin, Çoğul Antibiyotik Direnç (ÇAD) indeksi kritik seviyenin üzerinde hesaplanırken; %30'unda tetM, %10'unda vanA, %2'sinde ise hem tetM hem de vanA antibiyotik direnç geni tespit edilmiştir. Ayrıca virulans faktörleri açısından tüm izolatların enzim varlığı, biyofilm üretme ve siderefora sahip olma açısından yüksek potansiyele sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Bakterilerde tespit edilen yüksek antibiyotik direnci ve direnç geni varlığı bölgede kontrolsüz antibiyotik kullanımını göstermekle birlikte, halk sağlığı açısından risk teşkil edebileceği sonucuna varılmıştır.

.

Anahtar Kelimeler: Deniz Suyu, Bakteri, Antibiyotik Direnç Genleri, Biyofilm, Virülans

ABSTRACT

DETERMINATION OF SOME ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES AND VIRULENCE CHARACTERISTICS OF SEAWATER ISOLATE GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Nazlı Neslihan GÜNGÖREN
Çanakkale Onsekiz Mart University
School of Graduate Studies
Master of Science Thesis in Biology Science
Advisor: Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU
01/29/2024, 80

In this study, the antibiotic resistance profiles of a total of 50 bacterial isolates isolated from the coastal area of Çanakkale, isolated from seawater, were investigated, along with the presence of resistance genes for tetracycline and vancomycin, and some virulence factors (biofilm formation, siderophore production, enzymatic activity). Molecular identifications of isolates with detected resistance genes were also performed. According to the results of the antibiotic susceptibility tests, 90% of the isolates were found to be resistant to penicillin, 76% to vancomycin, 68% to tetracycline, 54% to ampicillin, and 8% to gentamicin. While 88% of the isolates had a Multiple Antibiotic Resistance (MAR) index above the critical level, tetM was detected in 30%, vanA in 10%, and both tetM and vanA in 2% of the isolates. Furthermore, in terms of virulence factors, it was concluded that all isolates had a high potential for enzyme production, biofilm formation, and siderophore production. The high antibiotic resistance and the presence of resistance genes in bacteria indicate uncontrolled antibiotic usage in the region, posing a potential risk to public health.

Keywords: Seawater, Bacteria, Antibiotic Resistance Genes, Biofilm, Virulence

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI……..……... i
ETİK BEYAN…… ii
TEŞEKKÜR…….. iii
ÖZET ……..…….…….. iv
ABSTRACT …….. v
İÇİNDEKİLER ……..…… vi
SİMGELER ve KISALTMALAR…….....……. viii
TABLOLAR DİZİNİ…….…. ix
ŞEKİLLER DİZİNİ……..……...…….….. x

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ 1

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5

2.1. Çanakkale İli ve Kıyı Şeridi Genel Özellikleri…… 5
2.2. Gram (-) Bakteriler ve Genel Özellikleri……. 7
2.3. Bakteriyel Virulans Faktörleri……. 9
2.3.1. Kapsül…… 10
2.3.2. Adezinler…… 10
2.3.3. Endotoksin……. 10
2.3.4. Enterotoksin……... 10
2.3.5. Hemolizinler……... 11
2.3.6. Siderofor……. 11
2.3.7. Biyofilm……. 12
2.3.8. İnvazyon mekanizmaları…… 13
2.3.9. Slime faktör…… 13

2.4. Antibiyotikler ve Genel Özellikleri…….. 14
2.4.1. Antibiyotik Direnci…… 18
Doğal Direnç Mekanizması……. 19
Kazanılmış Direnç Mekanizması……. 19
Antibiyotiklerin İnaktivasyonu Sonucu Oluşan Direnç Mekanizması……..... 20
Hedef Olan Molekülün Değişimi Sonucu Oluşan Direnç Mekanizması…….. 20
Bakteri Hücre Duvarı Permabilitesi Değişimi ve Aktif Pompa Sistemlerinin Değişmesi Sebebiyle Oluşan Antibiyotik Direnci……. 20
Diğer Mekanizmalar Sonucu Oluşan Direnç Mekanizması……..... 21
2.4.2. Antibiyotik Direnç Genleri……... 21
2.5. Antibiyotik Gruplarına Göre Direnç Mekanizmaları……. 22
2.5.1. Tetrasiklin Direnci…… 22
2.5.2. Glikopeptid Antibiyotiklere Direnç…….. 23

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
MATERYAL YÖNTEM 31

3.1. İzolat Temini…… 31
3.2 İzolatların Moleküler İdentifikasyonu…….. 31
3.3. Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi……. 32
3.3.1. Kültürel Yöntemlerle Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi…….. 32
3.3.2. İzolatların Antibiyotik Direnç Geni Taşıma Potansiyellerinin Belirlenmesi……. 33
3.4. İzolatların Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi…….. 34
3.4.1. DNaz Aktivitesi…… 34
3.4.2. Hemoliz Aktivitesi……... 34
3.4.3. Proteolitik Aktivite……... 34
3.4.4. Lipolitik Aktivite…….. 35
3.4.5. Amilolitik Aktivite……... 35
3.4.6. Lesitinaz Üretimi…….. 35
3.4.7. Jelatin Hidrolizi Aktivitesi……... 35

3.4.8.İzolatların Amino Asit Dekarboksilaz (AAD) Aktivitesinin Belirlenmesi…… 35
3.5. İzolatların Siderofor Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi…… 35
3.6. İzolatların Slime Oluşumunun Belirlenmesi ……. 36
3.6.1. Kongo Kırmızılı Agar (KKA) Besiyerinde Slime Oluşumunun Tespiti.. 36
3.6.2. Standart Cam Tüp Metoduna Göre Slime Oluşumunun Tespiti…… 36
3.7. İzolatlarda Biyofilm Varlığının Tespiti…… 36

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI 37

4.1. İzolatların Kültürel İdentifikasyon Bulguları……... 37
4.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyon Bulguları……... 39
4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profili Bulguları…… 43
4.3.1. Fenotipik Antibiyotik Duyarlılık Bulguları…….. 43
4.3.2. Antibiyotik Direnç Geni (Tet M ve Van A) Bulguları……... 47
4.4 İzolatların Enzimatik Aktivite Bulguları…….. 51
4.5. Siderefor Aktivitesi Bulguları…….. 55
4.6. İzolatların Slime Oluşturma Bulguları……. 57
4.7. İzolatlarda Biyofilm Oluşum Bulguları……... 58

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER 60

KAYNAKÇA ...……. 61
ÖZGEÇMİŞ ….……..... I

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAD	Aminoasit dekarboksilaz
ADB	Antibiyotik Dirençli Bakteri
ADG	Antibiyotik Direnç Geni
AM10	Ampisilin Antibiyotiği diski
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
Dk	Dakika
G	Gram
gDNA	Genomik DNA
%	Yüzde oranı
^{o}	Derece
^{o}C	Santigrat derece
I	Orta derecede duyarlı
LPS	Lipopolisakkarit
mg	Miligram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
MCASA	Modifiye Chrome Azurol S agar
MHA	Müller hinton agar
MGE	Mobil Genetik Eleman
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
NB	Nurient broth
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P10	Penisilin antibiyotiği diski
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Dirençli
S	Duyarlı
SMA	Skim milk agar
TetM	Tetrasiklin direnç geni

TE30	Tetrasiklin antibiyotiği diski
TSA	Triptik soy agar
TSB	Triptik soy broth
VanA	Vankomisin direnç geni
VA30	Vankomisin antibiyotiği diski

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Filogenetik analizde kullanılan 16s rDNA geni için primer dizileri	32
Tablo 2	Antibiyotik direnç geni primer dizileri	33
Tablo 3	Van A'ya ait PZR bileşenleri	33
Tablo 4	Tet M'ye ait PZR bileşenleri	34
Tablo 5	İzolatlara ait biyokimyasal analiz bulguları	37
Tablo 6	Microgen TM GnA+B-ID Tanımlama Kiti Bulgularına Göre İzolatların Tür İsimleri	38
Tablo 7	19 adet izolata ait moleküler tanımlama bulguları	40
Tablo 8	İzolatların antibiyotik direnç profilleri	44
Tablo 9	İzolatların enzimatik aktivite sonuçları	54
Tablo 10	İzolatların siderofor, slime oluşumu ve biyofilm analiz sonuçları	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Çanakkale ili fiziki haritası	5
Şekil 2	Gram (-) hücre duvar yapısı	8
Şekil 3	Gram (-) bakterinin siderefor aracılığı ile hücre içine demir alım mekanizması	12
Şekil 4	Antibiyotik atıklarının suya karışımı	16
Şekil 5	1-38 numaralı izolatların jel görüntüsü	39
Şekil 6	39-50 numaralı izolatların jel görüntüsü	39
Şekil 7	1-38 numaralı izolat PZR tetM direnç geni dizileme sonucu	48
Şekil 8	39-50 numaralı izolat PZR tetM direnç geni dizileme sonucu	48
Şekil 9	1-19 numaralı izolat PZR vanA direnç geni dizileme sonucu	48
Şekil 10	20-50 numaralı izolat PZR vanA direnç geni dizileme sonucu	49
Şekil 11	No 7-12 numaralı izolatlara ait proteaz aktivitesi görüntüsü	51
Şekil 12	No 19-24 numaralı izolatlara ait DNaz aktivitesi görüntüsü	51
Şekil 13	No 31-36 numaralı izolatlara ait lipaz aktivitesi görüntüsü	51
Şekil 14	No 18 ve 12 numaralı izolatlara ait ADD görüntüsü	51
Şekil 15	No 5-8 numaralı izolatların siderefor analiz sonuç görüntüsü	55
Şekil 16	No 3, 7, 14, 15 numaralı izolatların cam tüp yöntemine göre slime oluşumu görüntüsü	58

BİRİNCİ BÖLÜM
GİRİŞ

Yeryüzünün neredeyse %70 oranında bir alanını kapsayan deniz ve okyanuslar sucul ekosistemlerin bir parçasıdır. Denizel habitatlar iklimsel değişimler ve su döngüleri açısından hayati bir önem taşımaktadır. Deniz ekosistemi gelmiş geçmiş kütlesel olarak en büyük canlılardan, mikroskobik olanlara kadar birçok çeşidi kapsayan büyük bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Ekosistem içerisindeki besin zinciri ve organik maddelerin dönüşümü ve kullanılabilir hale gelmesi üzerinde önemli bir katkı sağlayan mikroorganizmalar da bu sistemin bir parçasıdır. Deniz ve okyanuslardaki biyoçeşitlilik belirlenirken genellikle mikroorganizmaların besin gereksinimi ve ulaşımına bağlı olarak gruplandırılacak şekilde tanımlanmıştır. Her ne kadar derin denizlerde çok büyük bir biyoçeşitlilik olsada, kıyı şeridine yakın yerlerdeki tür çeşitliliği bakteriyel açıdan daha yüksektir. Bunun sebebi ise, güneş ışığı ve besin miktarının fazlalığıdır. Özellikle denizel kıyı şeritleri, farklı türleri destekleyecek daha fazla yaşam alanına sahiptir (Church, 2009).

Denizlerdeki mikroorganizmalar üzerinde birçok bilimsel çalışma yapılmıştır ve yapılan araştırmalar genellikle halk sağlığı ve çevresel faktörlere bağlı oluşan deniz kirliliğinin tespiti ve kullanılabilirlik kalitesinin tespiti amaçlıdır. Yıllar içerisinde teknolojik ilerlemelerle birlikte bakteriyel çeşitlilik, deniz bakterilerinin metabolik özellikleri ve biyotransformasyon süreçleri, virulansları, endüstriyel açıdan kullanılabilirlikleri ve potansiyelleri, spesifik metabolik özellikleri (biyofilm oluşturma, siderefora sahip olma vb) belirlendiği çalışmalar üzerinde yoğunlaşılarak literatüre katkılar sağlanmıştır (Taylor, vd., 2007; Antunes, vd., 2019; Catão, vd., 2019; Kumar, vd., 2019).

Deniz kıyısındaki bakteriyel popülasyonlar, çevresel faktörlere maruz kalış ve adaptasyon şekline göre karakterize oldukları göz önüne alınarak bölgesel olarak bakteri popülasyonları ve çeşitliliğinin farklılaştığı sonucuna ulaşılabilir. Özellikle Gram negatif bakteriler deniz kıyı şeridinin önemli bir bileşeni konumundadır. İnsan faaliyetlerinin yoğun olduğu kıyı şeridinde, organik maddelerin yoğun olarak sulara karıştığı yerlerde popülasyon olarak baskındırlar. Bunların yanında gram negatif özellikteki Enterobacteriaceae familyasına ait olan birçok tür kanalizasyon atık suları ile kolaylıkla

deniz kıyı sularına karışmaktadır (Altuğ, vd., 2016). Özellikle evsel ve endüstriyel atık maddelerin yeterince arıtılmadan Çanakkale kıyı şeridinden denize bırakılması sahil şeridindeki kirliliğinin önemli sebeplerindendir (Özden, 2013). Gram negatif bakteriler hücre içi ve dışı birçok enzim sistemine sahiptirler. Özellikle lipolitik ve proteolitik enzimlere sahip olmaları organik maddeleri kolayca ayrıştırmalarına sebep olur. Bu açıdan organik madde girişinin yoğun olduğu deniz kıyı şeridi gram negatif bakteriler için ideal yaşam ortamı sayılabilir (Arnosti, vd., 2005).

Denizler gibi su ekosistemi içerisinde planktonik türlere göre biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerin besin alışverişi ve hayatta kalabilme potansiyelleri daha yüksektir (Wingender ve Flemming, 2011). Biyofilm oluşturma özelliği, bakteriler için çevresel stresten korunmaya yardımcı olur ve patojenlerin hastalık yapma kabiliyetini arttırır (Hall-Stoodley, 2005).

Denizler, özellikle denize ait olan kıyı şeridi suları halk sağlığı açısından değerlendirilmesi gerekli olan önemli su ekosistemlerindendir. Patojenik bakterilerin gelişimleri için potansiyel kaynaklar, denize ait kıyı şeridindeki sularda mevcuttur. Gram negatif bakteriler sahip oldukları virulans faktörleri ile patojenitesi yüksek olarak bilinen ve özellikle ciddi enfeksiyonlara sebep olan önemli ve riskli bir bakteri grubudur (Bal, 2006). Gram negatif bakterilerin sahip oldukları virulans faktörleri ile patojenitelerinin yüksek olmasıyla birlikte antibiyotiklere de yoğun direnç gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca antibiyotik direncinin yanında sahip oldukları virülans özellikteki biyofilm yapısı sebebiyle hastane enfeksiyonlarına neden olan en önemli ve riskli bakteri grubudur (Tursun, vd., 2018). Özellikle birçok bakteriyel hastalığın etmeni oldukları için halk sağlığı açısından da önem arz etmektedirler. Sebep oldukları hastalıkları tedavi etmek için birçok antibiyotik çeşidi aktif olarak kliniklerde ve evlerde kullanılmaktadır (Durdu, vd., 2018). Tüm bu durumlar göz önüne alındığında deniz kıyısındaki gram negatif bakterilerin varlığı ve virulans açısından değerlendirilmesi önemlidir.

Antibiyotikler, dünya çapında sadece bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için değil, aynı zamanda enfeksiyonları önlemek, tarım ve su ürünleri yetiştiriciliğinde büyümeyi teşvik etmek ve gıdaları korumak için profilaktik ajanlar olarak da görev yapmak üzere kullanılmaktadır. Kliniklerde, hayvancılık, gıda vb. ticari faaliyetlerde de antibiyotiklerin

yoğun kullanımı durumunun istikrarsız ve kontrolsüz bir şekilde küresel bir problem olarak yükselişte olduğu Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) tarafından bildirilmiştir (Maddox, 2022). Antibiyotik direnci ve antibiyotik dirençli patojenlerin varlığı, en büyük halk sağlığı sorunlarından biri olarak rapor edilmektedir (Kraemer, vd., 2019).

Çeşitli su ortamlarında denizler de dahil olmak üzere antibiyotik dirençli mikroorganizmalar tespit edilmiştir (Ash, vd., 2002). Antibiyotiğe dirençli bakterilerin (ADB) çevreye yayılması, antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve yanlış kullanımı ve dünyanın birçok yerinde kontrolsüz bir şekilde atık haline gelmesiyle bağlantılıdır. ADB ve antibiyotik direncini kodlayan genler (ADG), atık sularda genellikle yüzey sularına kıyasla daha yüksek oranlarda ve konsantrasyonlarda tespit edilmektedir. Atık su aynı zamanda antibiyotik direncinin seçimi ve yayılması için temel oluşturan çeşitli bakteri topluluğunun büyümesi için uygun koşullar da sağlayabilir (Kümmerer, 2009a, b). Su ekosistemleri bir antibiyotik direnci rezervuarı açısından, ilişkili olsun ya da olmasın bakteri türleri arasında direnç genlerinin transferine katkıda bulunan önemli bir unsurdur (Su, vd., 2020). Özellikle deniz kıyı suları, antibiyotik direncinin yayılması için rezervuarlardan ve yollardan biri olarak kabul edilmektedir (Blasi, vd., 2020). Genel olarak bakteriler, bakteri genomundaki spontan kromozomal mutasyonlar yoluyla veya konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon yoluyla farklı bakteri türleri arasında yatay gen transferi yoluyla direnç genleri kazanarak antibiyotik direnci geliştirebilirler (Sengupta, 2012). Su ekosisteminde ve çevresindeki bakterilerde ADG'lerin varlığı insan sağlığı için bir tehdit oluştururken, yatay gen transfer mekanizmaları patojenik bakterilerde direnç belirleyicilerinin difüzyonuna katkıda bulunur (Peterson, vd., 2018). Antibiyotiğe dirençlilik geni sadece bakterileri etkilememekte, aynı zamanda insan ve hayvan patojenleri arasında geçiş yapabildiği bilinmektedir.

İnsanlar denizlerden aktif olarak, ticaret, gıda, turizm, yetiştiricilik, ulaşım vb. sektörel amaçlarla yararlanmaktadır. Bu yoğun etkileşime bağlı olarak doğrudan veya dolaylı olarak özellikle deniz kıyısı ve çevresi ile etkileşim halindedir. Bu açıdan antibiyotik direnç genine (ADG) sahip olan deniz bakterileri halk sağlığını açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle direnç profillerinin genişliği arttıkça virulans özellikleri ile hastalıklara yol açıp tedavileri zorlaştırabilirler.

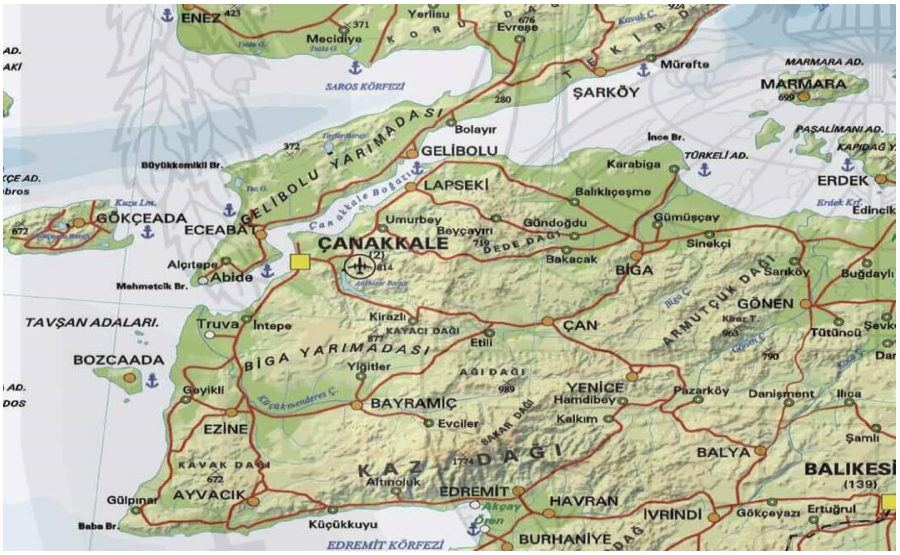
Günümüzde yapılan birçok araştırmada, antibiyotik direnci, deniz suyundaki dinamikleri ve bakteriyel topluluk yapısı ve çevresel faktörler arasındaki ilişkiler daha az kapsamlı bir şekilde açıklanırken, çok sayıda rapor evsel kanalizasyon deşarjı, tıbbi atık su ve su ürünleri atık sularının nehirler ve göller üzerindeki etkisini araştırmıştır. Dünyada deniz ve okyanusların oluşturduğu ekosistemin büyüklüğü göz önüne alınırsa, deniz ekosistemi ve özellikle insanların yoğun faaliyette bulunduğu kıyı şeridindeki bakteri popülasyonu üzerinde çalışma yapıp, antibiyotik direnci ve bazı virülans faktörlerin saptanması çok önemlidir. Ülkemizde bulunan kıyı şeridindeki bakteri popülasyonları üzerine yapılan çalışmalarda; antibiyotiklerin bakterilere etkileri, antibiyotik direnç genlerinin varlığı konusunda çalışmalar sınırlıdır.

Araştırmanın konusunu daha önce Çanakkale kıyı şeridinde izolasyonu yapılmış 50 adet izolat arasından gram negatif (-) özellikteki bakterilerin fenotipik ve genotipik antibiyotik direnç profilleri ile birlikte enzimatik aktivite, biyofilm kapasitesi, siderefor oluşturma gibi virülans karakterlerin ortaya konması oluşturmaktadır. Böylece halk sağlığı açısından Çanakkale kıyı şeridinin bakteriyal patojenler bakımından taşıdığı risklerin saptanması amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Çanakkale İli ve Kıyı Şeridi Genel Özellikleri

Çanakkale ili konum olarak Türkiye'nin kuzeybatısında ve Marmara bölgesi içerisindedir. Topraklarının bir bölümü ile Marmara Bölgesi, Edremit Körfezine kıyı olan alanı ile ise, Ege Bölgesi sınırları içinde kalır. Gökçeada ve Bozcaada adaları ile toplam yüz ölçümü 9.817 km'dir (Anonim, 2023a). İstanbul ilinde olduğu gibi Asya ve Avrupa kıtalarında toprakları bulunduğu için önemli suyolu olan boğaz hattına sahiptir ve toplamda 671 km kıyı şeridi vardır. Kıyı şeridinde, Karanlık, İskele, İntepe, Saltık, Lapseki, Akbaş, Cumalı, Gelibolu ve Bahçe olmak üzere toplam 9 limanı vardır (Şekil 1) (Anonim, 2023b).



Şekil 1. Çanakkale ili fiziki haritası (Anonim, 2023c)

İldeki mevcut akarsular Kazdağlarından kaynaklanmakta olup, düzensiz su rejimi sebebiyle ulaşım ve tarımsal amaçla kulanılamamaktadır. Başlıca akasuları, Tuzla, Menderes, Sarıçay, Kocabaş, Bergaz ve Kavak Çayı ile Bayramiç Deresi'dir (Anonim, 2023d).

2022 yılı adrese dayalı nüfus sayım sisteminin verilerine göre Çanakkale ili nüfusu 559,383 kişi olup, genellikle il merkezinde yoğunlaşmıştır (TUİK, 2022). Çanakkale

Marmara bölgesinde bulunmasına rağmen endüstriyel faaliyetlerin çok yoğun olmadığı bir ildir. Başlıca sanayi kolları; gıda, çimento, tekstil, madencilik ve seramik sanayidir. İldeki araziler tarım faaliyetlerine uygundur ve tarımcılık başlıca geçim kaynağıdır. Turizm Çanakkale için önemli bir geçim kaynağıdır. Doğal güzelliklere ve tarihi öneme sahip olmasının yanı sıra Akdeniz iklimine sahip olması da yaz ve kış turizm için önem arz etmektedir. Deniz kıyıları turizm ve deniz sporları açısından popülerdir (Anonim, 2023b).

Denizlerin kıyı şeridinin rekreasyon, tarım, balıkçılık vb. faaliyetlerle kullanımı beraberinde kirlilik sorununuda getirmektedir. Deniz kirliliğinin en önemli sebepleri evsel atıklar, sanayi, deniz ulaşımı ve deniz kazaları kökenli kirlilik kaynaklarıdır. Özellikle kıyı şeridi kirlilikten daha çok etkilenmektedir.

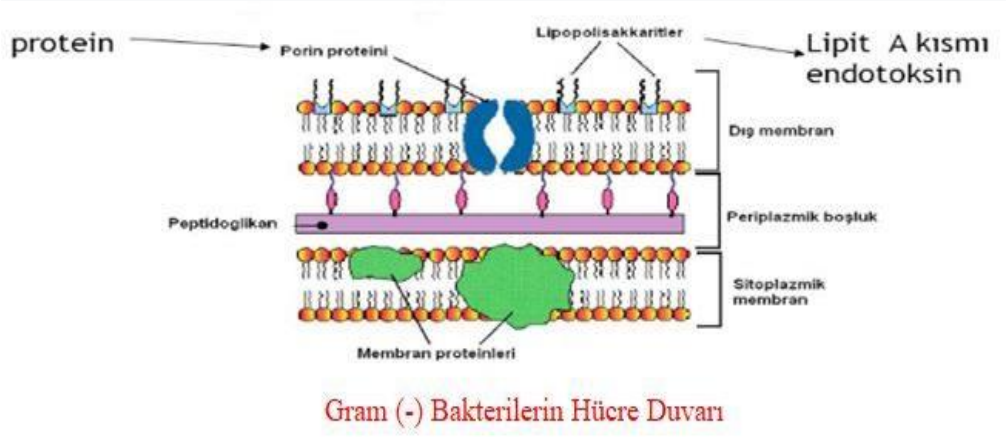
Çanakkale boğazının deniz taşımacılığında aktif rol alması, kıyı şeridinin turizme elverişli olması ile birlikte artan nüfus baskısı Çanakkale kıyı şeridi için önemli bir tehdittir. Deniz kıyısındaki turizm faaliyetlerinin yaz mevsiminde çoğalması ile birlikte insan kaynaklı atıklar deniz kıyısı ve çevresinde toplanmada olup; tüm bu kirleticilerin deşarj olduğu son nokta olan Çanakkale deniz kıyısı şeridi kirliliğe büyük ölçüde maruz kalmaktadır. Boğazdan geçen gemilerin atıkları, tersanelerin tedbirsiz faaliyetleri, limanlar, balıkçı barınakları da deniz kirliliği sebepleri arasındadır. Gemi sondaj aktiviteleri, gemi kazaları sonucu oluşan petrol ve atıkların deniz dibine ulaşması gibi durumlar da kirliliği arttırıp biyoçeşitliliğe tehdit oluşturmaktadır (Özden, 2012). Bunlara ek olarak, bölgedeki sanayi kuruluşları arıtma sistemlerine sahip olsalar da denize atık karışması tamamen engellenememektedir. Özellikle zeytinyağı ve süt ürünleri imalatı sonucu oluşan atık suların bölgedeki dere yataklarına ya da su kaynaklarına zaman zaman deşarjları söz konusu olabilmektedir. Benzer şekilde madencilik faaliyetleri sonucu oluşan endüstriyel atıklar ve evsel kaynaklı atıklar Sarıçay'ı kirliliğe maruz bırakmaktadır. Kirlenen Sarıçay'dan atıklar Çanakkale denizine ulaşabildiği bilinmektedir (Hacıoğlu, 2011). Bölgedeki yoğun tarımsal faaliyetler sonucu, tarımsal üretimde kullanılan gübre yeraltı sularına karışıp denizlere taşınmaktadır. Antropojenik atıklar kent merkezlerinden her ne kadar arıtılsa da kanalizasyon sistemi ile toplanıp derin deşarj sistemi şehir merkezinin ortasından geçen Sarıçay deresi ile Çanakkale Boğazı'na karışmaktadır (Ilgar, 2000).

2.2. Gram (-) Bakteriler ve Genel Özellikleri

Deniz ve okyanuslara ait olan kıyı şeridleri insanlar tarafından çeşitli gereksinimlerle ekolojik ve ekonomik açıdan yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu yoğun etkileşim sonucu deniz ekosistemi kirlenmekte, aynı zamanda atıklar aracılığı ile antibiyotik kalıntıları da deniz kıyılarına karışmaktadır. Sonuç olarak oluşan denizsel kirlilik ve birikim, çevresel ve sağlık açısından küresel bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Çevresel etmenlere bağlı değişimlere mikroorganizmalar ve özellikle bakteriler hızlı tepki vermektedir. Özellikle denizlere ait yapılan birçok çalışmada bakteriler ekosistem izleme çalışmaları için temel indikatör organizmalar konumundadır (Kalkan ve Altuğ, 2015).

Çalışılan coğrafik bölge, materyal, kirletici kaynaklar ve ekosistem bileşenlerine göre doğru biyolojik indikatörle çalışılmalıdır. Çanakkale ve ülkemizin diğer kıyı şeridi bölgelerinde yapılan pekçok çalışmada denizel habitatların en önemli indikatörlerinin gram (-) bakteriler oldukları ve bununla birlikte çok çeşitli virülans faktörler taşıdıklarının bildirilmiş olması (Çardak ve Altuğ 2010; Uğur, vd., 2012) çalışmamızın gram (-) bakteriler etrafında şekillenmesinin en önemli nedenidir.

Bakteri hücre duvar yapısını fiziksel ve kimyasal açıdan ayırmak için kullanılan gram boyama prosedürüne göre; Gram (-) bakteriler, boyayı tutmayıp mikroskop altında safranin rengi olan pembe olarak görünürler. Gram (-) bakterilerin hücre duvar yapısı ince bir peptidoglikan katmanı ve üzerinde kalın bir lipopolisakkarit (LPS) tabakadan oluşmakta olup boyayı tutmaz. Gram (-) bakteri hücre duvarı birçok açıdan benzersizdir ve buna en çok katkı sağlayan yapı, hücre duvarının LPS içeren dış zarıdır (Şekil 2). Bu katman sitoplazmik alan dışında bir bölgeyi sınırlar ve moleküllerin bu "periplazmik boşluk" içine ve dışına geçişini kontrol eder (Telli, vd., 2013).



Şekil 2. Gram (-) hücre duvar yapısı (Telli, vd., 2013)

LPS tabaka, lipid A, O antijeni ve polisakkarit çekirdek içerir. O antijeni türe özgüdür, lipid A (endotoksin) toksisiteden sorumludur. Ayrıca dış membran antibiyotik ve diğer toksik substratların bakteriye geçişini önler ya da azaltır. LPS bakteriye toksik özellik kazandırır. Bakteriyel dış membranın önemli bir görevi de sitoplazmik membranın dışında konumlanan enzimleri tutmasıdır. Enzimler bakteriyel periplazmik boşlukta bulunur. Periplazmanın görevleri; hidrolik enzimleri aracılığı ile besin parçalanması, bağlayıcı proteinlerle madde transportunun yapılması, kemoreseptör bulundurma gibi sıralanabilir (Todar, 2004). Ayrıca gram (-) hücre duvarında dış zar geçirgenliğini sağlayan porinler yapısı vardır. S-katmanı doğrudan dış zara bağlıdır. Flagella olan türlerinde halka sayısı iki değil dörttür. Yapısında Teikoik asit veya lipoteikoik asit yoktur (Brocks, 2010).

Gram (-) özellik gösteren çok sayıda bakteri familyası mevcuttur. Bu gruplar arasında özellikle Enterobactericeae ve Aeromonadaceae familyası üyesi bakteriler denizel habitatlardan yüksek oranda izole edilmiş ve tanımlanmışlardır (Brocks, 2010).

Enterobacteriaceae, Gram (-), fakültatif anaerobik, spor oluşturmayan çubuklardan oluşan bir ailedir. Bu ailenin özellikleri arasında hareketli, katalaz pozitif ve oksidaz negatif olmak; nitratın nitrite indirgenmesi ve glikoz fermantasyonundan asit üretimi sayılabilir. Ancak birçok istisna da vardır. Şu anda aile 51 cins ve 238 türden oluşmaktadır. Cins başına tür sayısı 1 ile 22 arasında değişmektedir. Yirmi iki cins yalnızca bir tür içerirken, yedi cins ondan fazla tür içerir. Enterobacteriaceae, 47 tür ve 21 cinsi kapsayan 180 tam genom ile aile çeşitliliği spektrumundan yoğun bir şekilde dizilenmiştir.

Enterobacteriaceae doğada her yerde bulunur. Pek çok tür, hem karada hem de suda yaşayan çeşitli ekolojik ortamlarda özgür olarak yaşayabilir ve bazıları yalnızca hayvanlarla, bitkilerle veya böceklerle ilişkilidir. Birçoğu, çeşitli enfeksiyonlara neden olan önemli insan, diğer hayvan ve/veya bitki patojenleridir. Tarımda biyokontrol, çok sayıda rekombinant protein ve protein olmayan ürünün üretimi, enfeksiyon hastalıklarının kontrolü, antikanser ajanları, biyoatık geri dönüşümü ve biyolojik iyileştirme dahil olmak üzere Enterobacteriaceae üyelerinin kullanıldığı çok sayıda uygulama vardır. Genom bazlı filogeni ve genomiklerin Enterobacteriaceae üyelerini daha da tanımlaması ve bu aile içindeki cins ve türlerin sınıflandırmasını hassaslaştırması beklenmektedir (Dissanayake, vd., 2014).

Aeromonadaceae Familyası *Aeromonas, Tolumonas*, *Oceanimonas*, *Oceanisphaera* ve *Zobellella* cinslerini içermekte olup genelde su ve su ile ilişkili olan ortamlarda bulunurlar. Basit besiyerinde kolaylıkla ürerler. Suda yaşayan memelilerde ve bazı canlılarda enfeksiyon etmenidirler. Aile, Enterobacteriaceae, Pasteurellaceae, Succinivibrionaceae ve Vibrionaceae familyalarıyla uzaktan akrabadır. Aeromonadaceae üyeleri, aileyi fenotipik olarak tanımlayan bir takım önemli yağ asitlerini ve polar lipitleri paylaşırlar. Bunlar tipik olarak su ortamlarıyla ilişkili katı aeroblar veya fakültatif anaeroblardır. *Aeromonas* türleri ayrıca suyla temas eden yiyeceklerden, insanlardan ve hayvanlardan da geri kazanılabilir. Bu cinsin üyeleri, insanlar ve hayvanlar için çeşitli ekstraintestinal enfeksiyonlara veya ishal hastalıklarına neden olabilecek fırsatçı patojenler olabilir. *Tolumonas*, *Oceanimonas*, *Oceanisphaera* ve *Zobellella*'nın metabolizması ve ekolojisine ilişkin bilgiler, bu cinslerin çoğu türünün tek bir strain temelinde tanımlanması nedeniyle nispeten azdır (Huys, 2014).

2.3. Bakteriyel Virulans Faktörleri

Bakteriyel patojenlerin, hastalık yapıcı olmasını sağlayan özellikler vardır. Bu, bakterilerin bir konak organizmayı enfekte etme ve hastalık yapma yeteneği ile ilgilidir. Bakteriyal virülans faktörleri, bakterinin patojenliği veya hastalık yapma potansiyelini artıran özelliklerdir. Bakteriyal virülans faktörleri, bakterilerin konak organizmalarda hastalık yapma kabiliyetini etkiler. Bu faktörler, bir bakterinin patojenliği veya enfeksiyon oluşturma yeteneği ile doğrudan ilişkilidir ve bakterinin bir enfeksiyonun şiddeti ve sonucu

üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu faktörler, enfeksiyonların önlenmesi veya tedavi edilmesi için hedef alınabilecek potansiyel terapötik noktaları temsil edebilir. Bakteriyal virülans faktörler arasında LPS, kapsül, endotoksin, sekresyon sistemleri, adhezyon faktörleri, toksinler, invazyon mekanizmaları ve biyofilmler sayılabilir. Bu faktörler türden türe ve organizmadan organizmaya değişebilmektedir (Josenhans ve Suerbaum, 2002).

Birçok gram (-) bakteride bu faktörlerden bir ya da birkaçına sahiptir. Bu faktörler, gram (-) bakterilerin enfeksiyon yapma yeteneklerini arttıran veya bağışıklık sistemine karşı savunmasızlığa yol açan önemli özelliklerdir. Bu mekanizmaların bazıları, adezinler gibi kromozomal yerleşimli iken; diğerleri plazmidler gibi hareketli genetik elementlerin içinde yerleşmiştir.

2.3.1. Kapsül

Polisakkarit özellikte olup, bakterinin fagositozdan kaçmasına yardımcı olabilir ve bağışıklık sisteminin tanımasını engelleyebilir (Taşdemir, 2009).

2.3.2. Adezinler

Bakteri ve konak hücre bağlanmasını sağlayan faktörlerin genel adıdır. Patogenezde ilk basamak olan adezyon için gereklidir. Türüne göre adezinler farklı hastalıklara sebep olabilir (Erdem, 1999).

2.3.3. Endotoksin

Gram (-)'lerde LPS yapılı olup, bakterinin hücre duvarının parçalanması sonucu ortaya çıkar (Erdem, 1999).

2.3.4. Enterotoksin

Bakteri hücresinden dışarı salgılanarak, ince bağırsaklarda hastalık yapan toksinlerdir. Kuvvetli toksik özellik gösterirler. Pekçok enterik bakterinin birbirinden farklı enterotoksinleri vardır (Erdem ve Ustaçelebi, 1999). 3 çeşit enterotoksin vardır. Bunlar:

Sitolitik Toksinler, A-B Toksinleri ve Süperantijenlerdir. Sitotoksinler enfeksiyon sırasında bakterilerin kolonizasyonu, istilası ve yayılmasında önemli bir rol oynarlar. Yapılan çalışmada, ekzoS+/ekzoU+ *Pseudomonas aeruginosa* strainlerinin sitotoksisiteyi ve kinolon direncini arttırdığı bulunmuştur (Cho, vd., 2014).

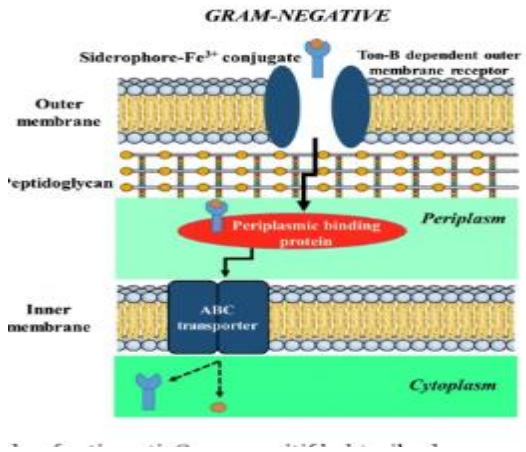
2.3.5. Hemolizinler

Hemolizinler ısıya dayanıklılık göstermeyen, sitolitik toksinlerden biri olup enterik bakterilerde yüksek oranda bulunur ve pekçok hastalıkta önemli etmenlerdir (Erdem, 1999). Konakçıya ait, monosit, eritrosit, lökosit ve fibroblast gibi bağışıklık hücrelerine karşı toksik etkiye sahiptir ve ekstrasellüler olarak salgılanmaktadır.

2.3.6. Siderofor

Demir bir mineral olarak, bakterilerin büyümesi ve gelişmesini destekleyerek bakterinin virulansını arttırıcı özelliği vardır. Bakteriler özellikle patojenler, konakçısının yapısal demirini kullanabilmek için, özellikli mekanizmalara sahiptir. Siderefor bunlar içerisinde en çok bilinenlerden biridir. Bu özelliğe sahip olmak bakterinin virulans faktörlerini arttırır (Neilands, 1995). Gram negatif bakterilerin birçoğu siderefor sentezler: Fenolat siderofor enterobaktin ve hidrosamat siderofor aerobaktin. Konak organizmada canlı kalabilmek ve yayılabilmek için, ortamdaki demiri bağlayarak rakiplerini elerler. Birçok *Enterobacter* bu özelliğe sahiptir (Şekil 3) (Erdem, 1999).

Bakteriler gelişmeleri ve üremeleri sırasında bazı besin kaynakları ve minerallere ihtiyaç duyarlar. Demir bakterilerin hayatta kalmaları için gerekli olan önemli minerallerden biridir. Bakteriler demiri hücre içinde almak için bazı mekanizmaları vardır, gram negatif bakterilerde demir eldesi için dış membran reseptörlerini kullanırlar bunlar, membran ATP-binding cassette (ABC) ve periplazmik binding protein (PBP) vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bu özgül reseptörlere sahip olması sayesinde üremesi ve hayatta kalması için esas olan demirin hücre içine alımı kolaylaşır (Krewulak ve Vogel, 2008).



Şekil 3. Gram (-) bakterinin siderefor aracılığı ile hücre içine demir alım mekanizması (Ribeiro ve Simoes, 2019)

2.3.7. Biyofilm

Bakterilerin bir arada bulunmasını, besin vb. faktörler bakımından ilişkide olmalarını sağlayan, toplu yaşam için meydana getirilen kompleks polisakkarit yapılardır (Davey ve O'toole, 2000). Biyofilm mikroorganizmaların, bir yüzeye (canlı veya cansız) yerleşerek, yapısal olarak ürettikleri ve salgıladıkları hücre dışı polimer madde aracılığı ile birbirine ve yüzeye tutunarak, oluşturduğu topluluk şeklinde tanımlanabilir (Donlan,2002; Altun ve Şener, 2008).

Bakteriler, uygun koşullar sağlandığında ve bir yüzey bulduğunda tutunmaya başlaması için Quorum Sensing (QS) isimli bir çeşit haberleşme ağından gelen çeşitli kimyasal sinyallere bağlıdır. Bu sistem aracılığı ile bakteriler etrafındaki kimyasal sinyalleri alarak, moleküllerin yoğunluğunu ölçer ve bakteriyel nüfusun yoğunluğunu belirleyebilirler. Yüzeyde tutunan bakteri populasyonu arttıkça, otoindükleyici görevi olan bazı sinyallerle lokal ekstraselüler konsantrasyon artar ve bakteriyel kümeleşme oluşumu başlar. Yüzeye yapışan bakteriler, mikrokoloni oluşturur ve sonra olgunlaşarak farklılaşır ve biyofilm formatını oluşturur (March ve Bentley, 2004).

Hayatımızın her alanında mikrobiyal biyofilmlerle karşılaşılmaktadır. Biyofilm oluşumu vücut içinde olduğu gibi çevresel canlı ve cansız ekosistemlerde de

görülebilmektedir. Kliniklerde kullanılan invazif kateterlerde, tıbbi cihazlarda, kontak lenslerde, genetik hastalıkların bazısında (kistik fibrozis) ve ağız içi mukozasında bulunur.

Biyofilm, bakterilerin hastalık yapması için etkili olan bir virülans faktörüdür. Bakterinin hastalık yapması ve antibiyotik direnç oluşturması, yüzey ile ilişkili virülans faktörleri ile bakteriler tarafından salgılanan virülans faktörleri etkilidir. Yüzeyle ilişkili virülans faktörlerinden birisi de biyofilm oluşturma özelliğidir. Gram negatif bakteriler de sahip oldukları yapısal özelliklerle birlikte, biyofilm yapısı oluşturarak ve bir yüzeye yapışarak orada bir komite kurabilirler ve böylece virulans özelliklerini arttırırlar.

Biyofilm bakterilere, antibiyotiklere ve bağışıklık sistemine karşı koruma sağlamasının yanı sıra virülans özelliklerini destekler. Biyofilm yapısının oluşumunda direnç ve virülans arasında bir ilişki vardır. Böylece bu yapı, diğer mekanizmaların yanı sıra biyofilmi oluşturan hücreler arasında antibiyotik direnci ve virülans genlerinin transferini ve yayılmasını kolaylaştırır. *P. aeruginosa* dirençli strainleri ile biyofilm oluşumu arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ve dirençli strainler, duyarlı strainlerden daha yüksek biyofilm üretimi kapasitesine sahiptir (Drenkard ve Ausubel, 2002).

2.3.8. İnvazyon mekanizmaları

Bazı gram negatif bakteriler, hücrelere girme yeteneğine sahip invazyon mekanizmalarını kullanabilirler. Bu, dokulara daha fazla zarar verebilir.

2.3.9. Slime faktör

Bakterilerce üretilen polisakkarit yapıdaki kapsülüdür. Bakterilerin plastik ve metal yüzeylere aderensini arttıracak etki gösterip, yüzey üzerinde film tabakası oluşturarak bakteriyi antimikrobiyal ajanlardan korumaktadır. Slime tabakası, alginatla sonlanan ve tekrar eden polisakkarit yapılı polimerlerden oluşur. Bu sayede konakçının immün sistemine etki ederek, bakterinin immün defanstan korunduğu gözlemlenmiştir. Bakterilerin nötrofillere ve fagositlere karşı korunmasını sağlayarak, monosit ve makrofajları stimüle eder. Aynı zamanda bakteriyi opsonizasyon sisteminden kormaktadır.

Lenfositler üzerine mitojenik etkisi vardır. T hücrelerini etkileyerek, agregasyona neden olur (Yıng, vd., 1996).

2.4. Antibiyotikler ve Genel Özellikleri

Mikroorganizmaların gelişmesini ve yayılımını durduran veya öldürme gücü olan, maddelere antibiyotik denir. Çok sayıda antibiyotik bulunmaktadır, etki ettikleri mikroorganizmalar ve etki durumuna göre çeşitlendirilmektedir. Genel olarak etkileri, mikroorganizmaların hücre duvarı bütünlüğünü bozmak, protein sentez mekanizmasını bozmak ya da gelişmesi için ihtiyacı olan maddelere ulaşımını engellemek olarak genellenebilir (Saygı, vd., 2012).

Tarihte antibiyotik ile ilgili olarak yapılan ilk çalışma 19. Yüzyılın ikinci yarısı Pasteur ve Joubert'in mikroorganizmaların yarar sağlayarak sağaltımda kullanılabileceği potansiyele sahip olduğunu düşünmesi olmuştur. Şarbon basilinin bulaş olmamış steril idrarda iyi üredığini fakat diğer bakterilerle bulaş olmuş olan idrarda üreyemediklerini saptayan araştırmacılar, diğer bakterilerle kirlenmiş idrarda bulunan şarbon basilini deney hayvanlarına aktarmış ve hastalık oluşturamadığını ortaya koymuştur. Böylece enfeksiyonlar karşısından tedavi edici ilk adımı oluşturmuştur (Chambers, 2001). Bu gözlemlerden sonra stafilokok varyantları üzerinde çalışmaları olan Alexander Fleming, stafilokokların küf mantarı etrafında üreyemediklerini, tersine öldüklerini tespit etmiştir. Bu mantarın birçok mikroorganizma üzerinde etkisi olduğunun keşfi üzerine, antibiyotik ilk kez 1928 yılında Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir ve etkili maddeye küf mantarlarının *Penicillum* türünden olmasından kaynaklı olarak 'penicillin' adını vermiştir (Türkoğlu, 2008). Daha sonraki süreçlerde antibiyotikler çeşitlenmeye ve keşfedilmeye başlanmıştır. 1930'da sülfonamidlerin keşfi, 1943'de streptomisinin elde edilişi ve makrolidlerin kullanıma girmesi ile beraber penisilinin alternatifi birçok antibiyotik eldesi olmuştur. Bu süreçte mikroorganizmaların bir kısmında başta etkili olan antibiyotiklerin zamanla etkili olmayışı ile beraber yeni çözümler ve sentetik üretimler başlamıştır. 1970-1980 yılları arasındaki tedavilerde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç tablosu ile birlikte kombine ilaç kullanımına gidilmesine rağmen, gonokokların büyük bir kısmı peniciline karşı dirençli hale gelmişlerdir (Boyce, vd., 2005).

Antibiyotikler hayatımızın birçok alanında kendini göstermektedir. Kliniklerde insan ve hayvan sağlığında kullanılmasının yanında, gıda sektörü, balık yetiştiriciliği ve yeni antibiyotik çalışmaları için yoğun olarak kullanılmaktadır. Antibiyotikler sadece tıp alanında değil hayvancılık, gıda vb. ticari faaliyetlerde de yoğun olarak kullanımı ile birlikte küresel bir sorun olarak istikrarlı bir yükselişte olduğu bildirilmiştir (CDC, 2022). Nüfusun ihtiyacına paralel olarak dünya çapındaki yoğun tarım faaliyetleri ile su ürünleri yetiştiriciliğinde de antibiyotik kullanımı artmaktadır (Van Boeckel, vd., 2015). Antibiyotiklerin, hayvancılık sektöründe olan kullanımının 2010'dan 2030'a kadar olan süreçte %67 oranında artması beklenmektedir.

Antibiyotikler, hayvan çiftliklerinde antimikrobiyal bir ajan olarak enfeksiyon tedavi etmek amaçlı kullanılmasının yanında, 1950'li yıllardan sonra yem katkısı ve büyüme geliştirici etkisi nedeni ile de kullanılmaktadır (FEDESA, 2001). Hayvanlarda varolan hastalıkların süresini sınırlamak, antibiyotik kullanımında temel amaçlardandır. Tüm bu etkileri nedeni ile hayvan çiftliklerinde yoğun antibiyotik kullanımı görülmekte, ayrıca antibiyotiklerin maliyeti ucuz ve kolay temin edilmesi de teşvik edici bir nedendir. Bilinçsiz antibiyotik kullanımı ile hayvansal kökenli mikroorganizmalarda da antibiyotiklere karşı direnç durumu ortaya çıkabilmektedir. Madde döngüleri vb. yollarla çevresel etmenlerle insanlara ve diğer canlılara ulaşmaktadır. Hayvan çiftliklerinde kullanılan antibiyotikler ve geçiş yolları şekil 4'de verilmiştir (Kemper, 2008).

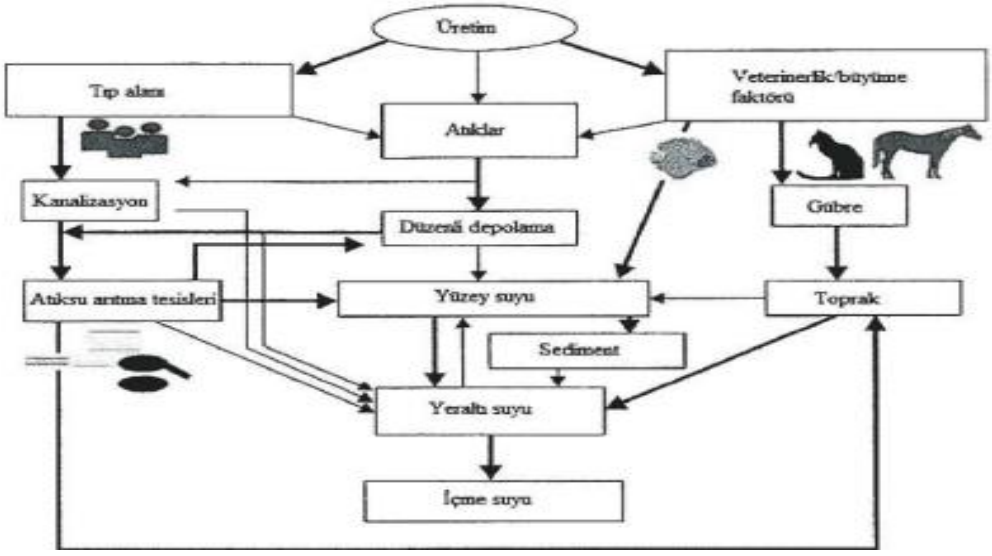
Bitkilerde bakteri kökenli olan hastalıkları kontrol etmek amacıyla antibiyotikler uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bitkiler için kullanılan antimikrobiyal ajanların büyük kısmı streptomisin ve oksitetrasiklini içerir (Erdoğan ve Everest, 2013).

Balık çiftliklerinde balıklardaki bakteri kökenli hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımıda direncin önemli sebeplerinden biridir. Bu yolla suya ve atıklarla çevreye antibiyotik kalıntılara dağılabilmektedir. Bu durum zamanla direnç gelişimine neden olur. Aynı zamanda kullanılan antibiyotikler diğer bir yol olan besin zinciri aracılığı ile yayılırak diğer canlılara da olumsuz etki eder (Kümmerir, 2009).

Günümüzde kliniklerde bakteriyel enfeksiyon tedavisinde yüksek miktarlarda antibiyotik kullanımıda bakterilerde antibiyotik direnci gelişimini kolaylaştırır. Kullanılan

ve çevresel antibiyotik konsantrasyonu ne kadar yüksek ise direnç gelişimi o derece indüklenmektedir. Toplumda antibiyotiğin kullanım alanları ve sıklığı, endikasyonlar arttıkça buna paralel olarak artmaktadır (IOM, 2010). Çok çeşitli antibiyotik grupları bulunmakla birlikte penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve beta laktam grubu antibiyotikler, kliniklerde aktif olarak kullanılmaktadır.

Antibiyotiklerin kullanımı sonucu atık ve metabolitler oluşur. Antibiyotiklerin polaritelerine, suda çözünürlüklerine ve kalıcılıklarına bağlı olarak, bileşikler parçalanabilir, kalıntı olarak kanalizasyon aracılığı ile çevreye karışarak, toprakta(çamur) kalabilir veya nehirlere salınabilir. Toprakla ilişkili ilaçlar, gübre olarak kullanıldığında kalıntılar tarımsal sistemlere girecektir. İnsanlarda kullanılmak üzere antibiyotikler, atık sular ve yüzey suları ile sulama yoluyla doğrudan tarım topraklarına da ulaşabilmektedir. Veteriner ilaçları ve metabolitleri, su ürünleri yetiştiriciliğinde ve meradaki hayvanların işlenmesinde doğrudan kullanımdan ya da yoğun hayvancılık tesislerinde uygulanması sırasında dolaylı olarak çevreye salınabilir. Toprak sistemine salınan bileşikler daha sonra yüzey suyuna veya yeraltı suyuna taşınabilir ve çevresel bir döngü ile ekosistemde kalır. Kısacası, antibiyotikler dolaylı ve doğrudan yollarla toprak ve su çevresine farklı miktarlarda deşarj edilirler. Özellikler kentsel atık su arıtma tesislerinden gelen ve akarsu, nehir, göl, deniz ve okyanus gibi sucul ekosisteme karışan sular önemli ölçüde kirliliğe neden olmaktadır (Şekil 3).



Şekil 4. Antibiyotik atıklarının suya karışımı (Kümmerer, 2001)

Birçok antibiyotik doğal olarak biyolojik olarak parçalanamaz özellikle sentetik antibiyotikler topraklarda yüksek konsantrasyonlarda uzun süre kalabilir. Topraklarda, yüzey sularında, tortularda ve yeraltı sularında, florokinolonlar, sülfonamidler, tetrasiklinler ve makrolidler dahil olmak üzere bir dizi antibiyotik tespit edilmiştir. Bazı maddeler (örneğin, tetrasiklinler ve florokinolonlar) da çevrede aylarca veya yıllarca kalır (Boxall, vd., 2010).

Antibiyotiklerin atık sular aracılığı ile çok düşük konsantrasyonlarda alıcı ortama sürekli olarak deşarjından dolayı birikim olmakta ve mikrobiyal ekoloji üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Sucul ortamda bulunan çevresel bakterilerin ve özellikle patojenlerin çoğul direnç kazanımını da kolaylaştırmaktadır. Özellikle bu durum bakterilerin antibiyotik türevi ilaçlara direnç mekanizması geliştirmesine de neden olur. Direnç mekanizmaları farklı şekillerde olmakla birlikte, genetik değişimler ve protein ekspresyonundaki değişimlere neden olarak genetik olarak kodlanabilir. Bunun yanında, doğal olarak oluşan direnç de vardır. Bakteri DNA'sının yapısında doğal olarak oluşan değişimler veya mikroorganizmalar arasında transfer olan gen sayesinde doğal olarak oluşmaktadır. Oluşan diğer direnç mekanizmaları; ilacın etki ettiği bölgenin değiştirilmesi, ilacın hücre içerisine girmesinin engellenerek ilaç birikiminin engellenmesi ve enzim mekanizmaları ile ilacın parçalanması şeklinde tanımlanmıştır.

Atıkların birikimi sonucu sucul ekosistemdeki bakteriler tarafından oluşturulan antibiyotik direnci bakteriler ile konakçısı insan ve hayvan olan bakterilerle etkileşimi sonucu mevcut direnç genlerinin paylaşımına neden olur. Mikroorganizmalar arası değişim ve aktarım ile varolan gen havuzunda değişimler olur. Bu durumda ekolojik dengeyi bozarak, doğal seleksiyon yolu ile bakteriler çok sayıda direnç geni kazanır. Bununla birlikte bu durum sonuç olarak, sucul çevre için dirençli gen sayısının arttığı ekolojik bir problem nedeni olmaktadır.

Antibiyotikler sucul organizmaları olumsuz etkileyebilir, özellikle antibiyotiklerin yapısı mikroorganizmaları etkileyecek biçimde tasarlandığı için özellikle sulardaki mikroorganizmalara etkisi olur. Yerleşik deniz bakteri topluluğu üzerine antibiyotiklerin hakkında çalışmalar yapılarak olumsuz etkileri ortaya konulmuştur.

Sucul sistemlerde bulunan antibiyotiklere bozulmamış veya metabolize olmuş atık şeklinde rastlanır. Antibiyotiklerin kimyasal bileşimi ile ilgili olarak etkisi değişken olabilir. Antibiyotikler bazı türlerine su ortamınd rastlanmaz. Sülfonamid, makrolid ve linkosamidler grubu antibiyotikler üzerinde çalışılan ve sularda sıklıkla rastlanan türlerdir. Penisilinin kolay hidrolizi sonucu, bozulmamış hali genellikle su ortamda bulunmazlar. Tetraksiklin antibiyotiğinin birikimi ve çözeltimi farklı yapıya sahiptir. Tetrasiklin grubu antibiyotikler ise organik maddeye adsorpsiyonundan dolayı tespit edilememiştir (Boxall, 2010).

2.4.1. Antibiyotik Direnci

Bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler bakteri üzerindeki bu etkisi ve kabiliyetini kaybettiğinde bakterilerde antibiyotiğe karşı direnç oluşur. Bu durumda bakteri tedavi edici dozda bile üremeye ve devam eder (WHO, 2000). Direnç durumu aslında bakterilerin hayatta kalmak için geliştirmiş oldukları bir savunma mekanizmasıdır. Bakterilerin antibiyotik keşfi ve kullanımına bağlı antibiyotik direnci geliştirdiği söylenebilir, fakat kliniklerde antibiyotik kullanımından da önce antibiyotik benzeri bakteri ve mantar metabolitlerine karşı direncin öncesinde kazanıldığına dair çalışmalar mevcuttur. Antibiyotik kullanımından önce izole edilen bazı bakteri strainleri ile henüz antibiyotik ile tedavi edilmemiş olan Afrika kabilelerindeki insanlar üzerinde yapılan çalışmada, insan dışkılarından izole edilen strainlerin direnç plazmidleri taşıdığı ve farklı direnç mekanizmaları ile kazanımlarının olduğuna rastlanmıştır.

Bu duruma en iyi örnek penisilinaz enzimine sahip olan *Staphylococcus aeurus* verilebilir. Bu bakterinin penisiline geliştirdiği direnç sonrası metisilin adı verilen yarı sentetik antibiyotik üretilmiştir. Metisilinin klinik kullanımlarından bir süre sonra da metisiline direnç bildirilmiştir. Florokinolonların klinikte kullanımından sonra, kinolon direnci oluşmuş olup bu direncin özellikle metisiline dirençli strainlerin, kromozomal mutasyona uğramasına bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir.

Antibiyotik direnci mekanizmaları incelendiğinde bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarının bir ya da birden fazla şekilde olduğu görülmektedir. Genel olarak bakterilerin direnç mekanizmaları 2 grup altında incelenebilir.

I. Doğal direnç mekanizması

II. Kazanılmış direnç mekanizması

a. Antibiyotiklerin inaktivasyonu sonucu oluşan direnç mekanizması

b. Hedef olan molekülün değişimi sonucu oluşan direnç mekanizması

c. Bakteri hücre duvarı permabilitesi değişimi ve aktif pompa sistemlerinin değişimi sonucu oluşan direnç mekanizması

d. Diğer mekanizmalar sonucu oluşan direnç mekanizması (Yamantürk Çelik, vd., 2015)

Doğal Direnç Mekanizması

Bakterilerin doğal yapısı ve savunma sistemi nedeni oluşan dirence doğal direnç denir ve kalıtsal olarak aktarılır. Antibakteriyal maddenin bağlanarak etkilediği hedef molekülün olmaması ile doğal direnç ortaya çıkarır. Antibiyotik kullanımından bağımsız olarak da birçok patojen gram negatif bakteri sahip olduğu duvar yapısı nedeniyle vankomisine vb antibiyotiklere dirençlidirler. Sahip oldukları özel hücre şeklinden dolayı (L hücre) hücre duvar sentezini engelleyen antibiyotiklerden etkilenmezler ve hücre duvarı yenilendiğinde bu antibiyotik grubuna duyarlı hale gelirler (Yamantürk Çelik, vd., 2015).

Kazanılmış Direnç Mekanizması

Antibiyotiklere maruz kalan bakterilerin, geliştirdiği çeşitli mekanizmalarla birlikte, antimikrobiyal ajanlardan etkilenmeyecek şekle gelmeleri durumuna kazanılmış direnç mekanizması denir. Kazanılmış direnç mekanizmalarını, genetiksel mekanizma ve biyokimyasal mekanizma olmak üzere ikiye ayrılır. Bakteriler, direnç mekanizmaları aracılığı ile antibiyotiklere karşı, tek ya da çoklu direnç kazanabilir. Oluşan antibiyotik direnci, antibiyotiklerin yapısına, bakterinin türüne, plasmide sahip olmasına veya kromozomal mutasyona göre değişir (Langton, vd., 2005).

Antibiyotiklerin İnaktivasyonu Sonucu Oluşan Direnç Mekanizması

Bakterilerin sahip olduğu ve antibiyotiğin yapısını bozan veya değiştiren enzim varlığı ile meydana gelir. Antibiyotiklerin inaktive etmek için çeşitli mekanizmalar, enzimler kullanılır. Antibiyotiği inaktif eden bu mekanizma ile kloramfenikol türevi antibiyotikler ve betalaktan grubu antibiyotiklere, direnç kazanılır. Patojenik bakterilerde nadiren oluşan direnç mekanizmalarından biri de antibiyotiklerin oksidasyonu yani redoks sürecidir. Tekrasiklin grubu antibiyotiklerin TetX enzimine bağlı oksidasyonu en belirgin örneklerindendir (Bonnet, 2004).

Hedef Olan Molekülün Değişimi Sonucu Oluşan Direnç Mekanizması

Antibiyotikler etki etmesi için, bakteri fonksiyonlarını ve metabolizmalarını inhibe etmesi gerekir. Bakteriler, antibiyotiklere karşı effektif olan hedef moleküllere sahiptir. Hedef moleküle etki eden antibiyotik, hücre içinde afiniteyi azaltarak bakteride direnç gelişimini sağlar. Bakterilerin sahip olduğu hücre duvarında varolan peptidoglikan yapısı antibiyotiklerin bağlanmasına yönelik hedef bölgeleri içermektedir. Bu hedef yapılar bakterinin hayatta kalması ve çoğalması için önemli olan yapılardır. Penisilin bağlayıcı proteinlerdir (PBP). Bu yapıya ait olan PBP'ler, bakteri hücre duvarı yapısına ve yapısal olarak sahip olduğu özelliklere göre farklılık gösterirler. Antibiyotik yoğunluğuna bağlı olarak, PBP'lerin çeşitli antibiyotiklere olan etkisi ve bağlanma durumu değişir.

Bakteri Hücre Duvarı Permabilitesi Değişimi ve Aktif Pompa Sistemlerinin Değişmesi Sebebiyle Oluşan Antibiyotik Direnci

Bakterilerin sahip olduğu aktif pompa sistemi, hücre dışına antibiyotiklerin atılımını sağlayan membranda bulunan proteinler olarak adlandırılır ve antibiyotiklerin hücre içi miktarını minimal düzeye indirgerler. Bakteriyel hücre membranının geçirgenliğinin değişmesi ve azalması antibiyotiklerin hücreden içeri geçişini azaltır. Antibiyotiklerin girişinin azalımı ve aktif atılımı ile bakterilerde düşük düzeyde direnç oluşmasına neden olur. Her ne kadar bakterilerde biyolojik membran varlığı olsa da ve hidrofilik moleküller için etkin bir bariyer özellik taşısa da, hem hidrofil hem lipofil özelliği olan amfilik bileşiklerin geçişi kolaydır. Bu duruma karşı bakteriler çeşitli

mekanizmalar geliştirmiştir ve mekanizmalardan biri de aktif pompa sistemleridir. Mekanizma antibiyotiklerin değişime uğramadan minimal konsantrasyonla geçmesini sağlar. Mevcut mekanizma antibiyotik sınıfı olarak beta-laktamlar ve tetrasiklinler başta olmak üzere birçok antibiyotikte etkilidir. Daha öncesinde Gram-negatif bakterilerde bu sistem yerine direncin dış membrana bağlı olduğu düşünülsede, bu dirence aktif pompa sistemlerinin sebebi olduğu ortaya konulmuştur (Langton, vd., 2005). Değişik protein yapıları sayesinde, aktif pompalama ile antibiyotiğin dışarı atılması gerçekleşir. Proteinlerin kombinasyon durumuna göre antibiyotiklere karşı olan direnç çeşidi gelişmektedir; örnek olarak 'MexA-MexB-OprM' aktif pompa mekanizması penisilinlere, sefalosporinlere, monobaktamlara ve meropeneme karşı direnç sağlarken, 'MexC-MexD-OprJ' sefepime ve sefpiroma karşı direnç sağlamakta, fakat diğer grup olan beta-laktamlara olan duyarlılığıı artırmaktadır.

Diğer Mekanizmalar Sonucu Oluşan Direnç Mekanizması

Varolan mekanizmalar hariç, bakteriler farklı direnç çeşidine sahip olabilirler. Bakterilerde biyofilm oluşturma durumu dirence etki etmekte ve biyofilm oluşturan bakteriler daha fazla direnç göstermektedir. Buna bağlı olan 3 temel mekanizma bilinmektedir. Birinci mekanizma uygulanan antibiyotiklerin biyofilme karşı penetre olamaması durumudur. Bakteriler antibiyotik direncini önlemek için, ekzopolisakkarit matriks üretimi ile biyofilm oluşturup antibiyotiklerin difüzyonuna engel olurlar. İkinci olarak biyofilm oluşturan bakterilerin besin kaynaklarının kısıtlılığından ve dış etkenlerden kaynaklı daha yavaş üremesi ile antibiyotik direnci meydana gelir (Costerton, vd., 1999). Üçüncü olarak biyofilm yapısında bulunan kimyasal yapılar antibiyotik potensini değiştirebilmektedir. Örnek olarak, oksijenin yoğun bulunduğu biyofilmlerde antibiyotiklerin genel etkisi sınırlanabilir.

2.4.2. Antibiyotik Direnç Genleri

Bakterilerin sahip olduğu direnç genleri, direnç mekanizmalarından bağımsız olarak; salgılama, detoksifikasyon ve işaret gönderme benzeri yolların neden olduğu fizyolojik fonksiyonlar sonucu genetiksel olarak oluşur (Martínez, 2008). Oluşan bu genler hedef proteinleri kodlayarak doğal antibiyotik direnci olarak gelişir. Bu sebepten dolayı

bütün bakterileri genomlarında antibiyotik direnç genleri olabilir (Wright, 2007). Patojen mikroorganizmalar ile sınırlı kalmayan antibiyotik direnç genleri çevresel bakteriler arasında da ekosistem içerisinde yayılmaktadır.

Antibiyotik direnci ile alakalı olan gen topluluklarına rezistom denir. Rezistom, gerçek veya mutasyonla değişmiş olan direnç belirteçlerinin ilk genlerine sahiptir. Her türlü ekosistem içerisindeki bakteri topluluklarında, rezistomlara rastlandığı bilinmektedir (Martínez, 2008). Dirençli bakteriler çoğalmaları esnasında, sahip oldukları dirençli genleri paylaşırlar.

Çevresel olarak birikim yapan antibiyotikler sadece yüksek dozlarda direnç oluşumuna neden olmazlar, çok düşük dozlarda bakterileri etkilerler Bakterilerin sahip olduğu direnç mekanizmalarını harekete geçirerek, direnç kazanmasına neden olur. Özellikle su ortamı, antibiyotik direncini kodlayan mobil genetik elementlerin (MGE'ler) yatay değişimi için ideal ortamlar sağlar ve direnç genleri oluşur. Bakteriyel plazmidler, insersiyon dizileri, insersiyon sekansı ortak bölge elemanları, transpozonlar, integronlar, genomik adalar, entegre konjügatif elementler ve bakteriyofajlar aracılığıyla ADG kazanımı ve yayılımı hızlı olmaktadır. Bu bakımdan son deşarj noktası olan denizlerin geniş bir ADG çeşitliliğine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu konu ilgili birçok çalışma yapılmıştır, fakat yapılan çalışmalardan çok azı fajları ve integronları içermektedir (Gullberg, 2011).

2.5. Antibiyotik Gruplarına Göre Direnç Mekanizmaları

Karasal ve sucul ekosistemler sürekli etkleşimde olup antibiyotik kalıntılarının dolayıysla direnç genlerinin dolaşımına da sebep olmaktadırlar. Bu genlere örnek olarak, Sulfonamid, Beta – Laktam, Makrolit-Linkosamit-Streptogramin, Vankomisin ve Kloramfenikol, Tetrasiklin, Aminoglikozit Dirençli olarak sıralanabilir (Davies, 1994). Çalışmamızda vankomisin ve tetrasiklin direnç geni mevcut bakterilerde araştırıldı.

2.5.1. Tetrasiklin Direnci

Antibiyotik etkisi ile spontan olarak kromozomal mutasyon oluşur ve hücre membranının geçirgenliğinde azalma olur. Böylece, antibiyotiğin hücre içine geçişi azalarak direnç ortaya çıkar. Tetrasiklin antibiyotiğine ait olan genler (tetA-G, tetK, tetL) vardır. *Salmonella, E. coli* ve *Shigella* gibi bakteri türlerinde marRAB operonu etkisi ile tetrasiklin hücre dışına aktif olarak atılmaktadır (Davies, 1994).

Bakteriler, tetrasikline karşı direnç kazanılmasına sebep olan ribozomal koruma mekanizmasına sahiptir. TetS, tetM, tetQ, tetO, genlerinin sentezlediği protein, ilacın ribozoma bağlanmasını engeller. Bakterilerde kromozomal ve plazmid aracılığı ile oluşan bir mekanizmadır. Tetrasiklin genlerinden birine dirençli olan bakteri, diğerlerine de direnç kazanır.

2.5.2. Glikopeptid Grubu Antibiyotik Direnci

Vankomisin başta olmak üzere, avoparsin, ristosetin, teikoplanin gibi antibiyotikler, hücre duvarının sentezini önleyecek etkiye sahiptir. Gram negatif bakteriler bu grup antibiyotiklere doğal olarak dirençli olduğundan dolayı, glikopeptid antibiyotiklerin dış membrandan geçemez. Enterokoklarda yaygın olan vankomisin direnci, üç şekilde adlanmıştır, vanA, vanB, vanC. Plazmid kökenli vanA ve kromozomal vanB ve vanC bakteri türüne göre aktif olacak şekilde, ligaz enzimi sentezinde etkilidir (Mayer, vd.,1995). VanA dirençlilik geni, plazmid aracılığı ile bakteriler arası aktarılır. Vankomisin direnci yüksek düzeyde olup indüklenebilir. VanB tipi dirençlilik geni kromozom tarafından kodlanan gendir.

Bugüne kadar bu alanda yapılan araştırmaların çoğunlukla klinik kökenli antibiyotiğe dirençli bakteriler üzerine gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte su ekosistemine ait olan sucul habitatlardaki, antibiyotik direncini de ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalarda, kliniklerde kullanılan antibiyotiklere dirençli bakterilerin varlığı bildirilmiştir (Akiyama ve Savin, 2010).

Hastanelerde, klinik kökenli enfeksiyonların tedavisinde yoğun antibiyotik kullanımından dolayı artan antibiyotik direnç gelişimi söz konusudur. Dünya üzerinde ülkemizde dahil tüm kliniklerde, bakterilerde var olan antibiyotik direnci ciddi bir problem

olarak artmaktadır. Özellikle birden fazla ilaca dirençli olan patojenitesi yüksek gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar, baş edilmesi gereken bir sorun olarak her geçen gün artmaktadır. Çoklu antibiyotik direncine (ÇAD) karşı, uygulanan tedavi seçenekleri azalıp etkisiz kaldığı için, yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır (Frieri, vd., 2017).

Marmara denizi güneybatı kıyı şeridinde yapılan bir çalışmada, kıyı sularından izole edilen enterik bakterilerin ampisilin direnç oranının %100 olduğu saptanmıştır (Sivri, vd., 2010).

İskenderun Körfezi olası hastane atık suyu karışan deniz suyu örneklerinden izole gram negatif bakteriler, sefazolin, sefuroksime, sefotaksime ve cefepime antibiyotiklerine karşı direnç oranları sırasıyla %85, %28, %8 %5 olarak bildirilmiştir (Akkan, vd., 2011).

Sağlam, vd. (2012), üriner enfeksiyonlarda etken olan *E. coli* bakterisinde direnç oranını sırasıyla amikasin (%0.3), gentamisine (%19.3), sefuroksime (%25.9), amoksisilin-klavulanik aside (%31.3), siprofloksasine (%32.8), trimetoprim–sulfametoksazole (%34.9), ampisillin-sulbaktama (%35.1) olarak tespit etmişlerdir.

İdrar numunelerinden izole edilmiş *E. coli* strainlerinde, seftriakson, ampisilin, trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiklerine karşı yüksek direnç saptanmıştır (Denk ve Tartar, 2015).

Hastane kökenli atık sular, antibiyotik ve kalıntılarını içerdiği için, direnç geni ve ona ait etkili elemanlarının yayılmasında oldukça etkilidir. Antibiyotikler genellikle minimum inhibitör konsantrasyonundan (MİK) düşük olacak şekilde su sistemlerinde olmalarına rağmen, sudaki mikroorganizmalar üzerinde baskı oluşturarak antibiyotik direncine sahip bakterilerin çoğalmasına neden olmaktadır. Bu alanda yapılan bir çalışmada, hastane atık sularındaki antibiyotik direnç genlerinin varlığı tetA geni ve cmlA, sul1, qnrS, ermB, blaCTX-M dirençlilik elemanları tespit edilmiştir.

Devlet hastanesi kanalizasyon sistemindeki sulardan izole edilen 8 strain üzerinde 11 farklı antibiyotiğin (ampisilin, trimethoprim, klindamisin, eritromisin, kloramfenikol,

gentamisin, tetrasiklin, streptomisin, sefotaksim, vankomisin ve sefoperazon) direnç profilleri araştırılmış ve *Citrobacter* spp. ve *E. coli* strainlerinde 0.75 ÇAD değeri hesaplanmıştır (Takcı, vd., 2019).

İsveç'te hastane ve evsel atık sularından etkilenen su habitatlarında yapılan bir çalışma sonucu ADG'i taşıyan birçok mikroorganizma bulunduğu ve bunun rezervuar kaynağının hastane atık suları olduğu tespit edilmiştir (Khan, vd., 2019).

Şenol ve Balın (2021), Kahramanmaraş ilindeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerindeki gram negatif *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Klebsiella pneumoniae* türlerinde imipenem, meropenem ve trimetoprim-sülfametoksazol direnç düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur.

Tıbbi kökenli antibiyotiklerin yanı sıra hayvancılık ve tarımda yoğun bir antibiyotik kullanımı söz konusudur. Kullanılan antibiyotik kalıntıları çevreye ve atık sulara karışarak kalıntı olarak birikim yapmaktadır. Balık yetiştiriciliğinde de bazı antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu antibiyotikler akuakültüre uygun olmayan dozda ve sürede, antibiyogram testi yapılmadan bilinçsiz bir şekilde vb. çeşitli nedenlerden dolayı yanlış kullanımı ile bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına yol açmaktadır.

Çin'de kıyı şeridinde yetiştiricilik sonucu büyük miktarda antibiyotik kirliliğine maruz kalan bölgede yapılan bir çalışmada, kıyı şeridindeki bakterilerde sülfonamid direnci genlerinin yaygın olduğu sonucuna varılmıştır (Gao, 2018).

Atık sularda varolan bakteri populasyonları, yoğun antibiyotik kullanımı sonucu oluşan birikimden etkilenerek antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedir. Bu direnç gen çeşitliliği, atık su arıtma tesislerindeki, farklı arıtma prosedürlerinin uygulanması bağlı olarak ülkelere veya bölgeye özel direnç tabloları şeklinde görülebilmektedir. Bu durum, atık suların arıtılması sırasında içeriğindeki bakteriyel popülasyon dağılımında değişikliğe ve dolayısıyla kantitatif ve kalitatif değişiklikler meydana gelmektedir (Topal, 2012).

Arıtma süreci sırasında uzaklaştırma olduğu için, antibiyotiğe dirençli olan bakterilerin sayıca azalması beklenir. Fekal kökenli koliform bakteri miktarının, arıtılmış

atık sularda, artılmamışlara oranla direnç geni bulundurma oranının yüksek bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise dirençli koliform bakterilere ait oranın, 3. kez arıtma işlemi yapılmış kanalizasyon suyunun, arıtma işlemi yapılmamış olana oranla daha düşük olduğu bulunmuştur (Guardabassi, vd., 2002).

Atıksulardaki yüksek direnç genlerinin kaynağını izleyen bir araştırmada ise direnç genlerinin varlığının, büyük ölçüde, çevrede net bir seçilim belirtisi olmaksızın dışkı kirliliği ile ilgili olduğu araştırmacılar tarafından bulunmuştur (Karkman, vd., 2019).

Altıparlak, vd. (2019), Gümüşhane ilindeki içme suyunda 38 *E. coli* izolatını tüm antibiyotiklere karşı duyarlı, diğer 12 izolat ise farklı antibiyotiklere dirençli olarak saptamışlardır. Bakteriler sefoksitine %16 dirençli ve %6 oranında orta duyarlı; cefepime, ceftazidime, ampisilin, sulbaktam, piperasilin %2 dirençli; %2 dirençli ve %2 oranında orta duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Takçı ve Toplar (2023), Kilis bölgesinde fekal kirlenmeye maruz kalan yüzeysel su örneklerinde fekal kökenli streptokokların eritromisin, tetrasiklin klindamisin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, ÇAD oranının ise 0.48 olduğunu tespit etmişlerdir.

Tüm ekosistemler arasında sürekli bir etkileşim ve değişim mevcuttur. Bir su ekosistemindeki mikroorganizmalar ile insan ve hayvan kökenli mikroorganizmaların arasında etkileşimler olmaktadır. Mikroorganizmalar için kanal görevi gören bir taşıyıcı olan suda gen transferi açısından etkileşim çok kolaydır. Bu nedenle su habitatında var olan antibiyotik kalıntılarının artışına bağlı olarak gelişen direnç genleri, mikrobiyal etkileşimler sonucu aktarılarak yayılıma sebep olmaktadır (Wang, vd., 2019). Mikroorganizmaların dahil olduğu gen havuzunda ciddi değişikliklere sebep olan bu durum, doğal seleksiyona uğrayarak fazla sayıda direnç genine sahip mikroorganizmaların çoğalmasına sebep olmaktadır.

Rize'de, halkın kullandığı içme sularından izole edilen ÇAD'li olan fekal koliform bakterilerin; antibiyotik direncinin hareketli genetik elemanlar tarafından taşındığı tespit edilmiştir. Ayrıca tetrasikline dirençliliği tespit edilen 8 adet *E. coli* straininde tet(A) (n=4), tet(B) (n=2), tet(A) ve tet(B) (n=1) genleri saptanmıştır (Özgümüş, vd., 2009).

Sucul ekosistemlerdeki enterokok dışındaki türlerde, vanA direnç geni, gen aktarım mekanizması ile diğer türlerde de oluşabilmektedir. Maruziyete bağlı olarak, vankomisine duyarlılık kazanan bakteriler, vanA genini taşıyan enterokoklardan gen transferi olduğu bildirilmiştir (Roy, 1999).

Okyanus ve denizlerde kıyı şeridindeki sular, derin havzalara oranla daha fazla kirliliğe sahiptir. Çin'deki Jiaozhou Körfezi'nde, deniz sedimentinde sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar, deniz kıyı sularında ise tetrasiklin direnç gelişimi araştırılmış ve kıyı sularında etrasiklin direnci tespit edilmiştir (Dang, 2008).

Rize deniz kıyı sularından izole edilen koliform bakterilerde, tet(B) yaygın olduğu, tet(C) ve tet(A) genlerinin ise olmadığı tespit edilmiştir. *E. coli* strainin birkaçında sınıf 1 integron sınıf 1, *E. coli* straininin diğerlerinde ise integron sınıf 2 taşıdığı ve dizi analizi sonucuna göre ile integronların dfrA1-sat2-aadA ve blaOXA-30-aadA1 gen kasetlerini içerdiği tespit edilmiştir (Çolakoğlu, vd., 2010)

Coğrafi farklılıklar ve bölgesel özellikler ve etmenler de en az kirleticiler kadar direnç mekanizmalarında etkindir. Doğu Akdeniz'de, Suriye, Türkiye ve Lübnan ülkelerinin kıyı şeridinin antibiyotik direnç profillerinin birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir (Altuğ, vd., 2010).

İzmit körfezinde, izole edilen *E. coli* strainlerinde sulbaktam-ampisilin (%62.5), trimethoprim-sulfametoksazol (%62.5), penisilin (%62.5), tetrasiklin (%50), kloramfenikol (%37.5) ve amikasin (%12.5) direnci saptanmıştır (Vural ve Akçın, 2011).

Karayakar, vd. (2004), Mersin iline ait kıyı şeridindeki deniz suyundan izole edilen *E. coli* bakterilerinin, seftriaxon, sefazol, ve sefizox'a karşı doğal dirençli olduğu saptanmıştır. Doğal yolla veya plazmid yoluyla aktarılmasına bağlı olan dirençlilik, en fazla Sefazol antibiyotiğine karşı gelişmiştir.

Çeşitli tatlı sulardan izole edilen *E. coli* strainlerinde AM10 direnci, bununla birlikte meropenem ve imipenem antibiyotiklerine karşı ise duyarlılık rapor edilmiştir (Kamruzzaman, vd., 2013).

Akdeniz kıyı şeridi sularından elde edilen *Pseudomonas* ve *Aeromonas* genusu bakterilerde sırasıyla % 91.3 ve % 76.9 oranında kanamisin ve TE30 direnci olarak tespit edilmiştir (Ahmed, 2019).

Denizel kıyı bölgeleri ve kumlu plajlar, birçok antimikrobiyal maddeye dirençli olan ve ÇAD'i taşıyan bakterilerin biriktiği alanlar olmuştur (Oliveira, vd., 2010). Türkiye'de bulunan denizlere ait kıyı ekosistemlerinde, sınırlı sayıda araştırma olmasına rağmen, Marmara, Ege ve Akdenize ait kıyılarda deniz suyu ve sedimentlerde ÇAD indeksi yüksek olarak saptanmıştır (Tuncer ve Bizsel, 2016).

Antartika ile Akdeniz deniz ekosisteminde karşılaştırmalı olarak faj parçalarındaki antibiyotik direnci üzerinde yapılan bir çalışmada antropojenik faaliyetler düşük olmasına rağmen, antibiyotik direnç geni içeren faj parçacıklarının Akdeniz'den daha yoğun olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Blanco-Picazo, 2020).

Güney Çin denizinde yapılan bir çalışmada, bakteri topluluk yapısı ve çevresel faktörlerin, antibiyotik direnç genlerinin dağılım dinamiklerini etkilediği ve ayrıca antropojenik faaliyetlerin, deniz suyu ortamlarında antibiyotik direnç genlerinin bolluğunu teşvik etmede önemli roller oynadığı bulunmuştur (Li, vd., 2020).

Kızıldeniz'in açıkları ve kıyı şeridinden toplanan örneklemlerle yapılan çalışma sonucu insani faaliyetlerden dolayı kıyı şeridinde daha yoğun kirlenme olduğu tahmin edilirken, kıyı şeridinde en çok antibiyotik direnç geni tespit edildiği, açıklardan alınan numunelerde ise daha çok ÇAD tespit edilmiştir (Ullah, vd., 2019).

Denizsel mikroorganizmalar ile ilgili yapılan çalışmalarda özellikle metabolik özelliklerin ve ekzo- enzim varlığının, virulans faktörlerinin, biyofilm oluşturma kabiliyetleri ve siderefor varlığının araştırılması önemlidir. Gram negatif bakterilerin

yüksek biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Jaisson (2014), Akdeniz kıyı şeridinde, biyofilm yapma özelliği gösteren 13 denizel bakteri izole etmiştir.

Yapılan araştırmalarda su ekosisteminde yer alan bakterilerin bu alandaki her tür cansız materyal üzerinde biyofilm oluşturabildiğini göstermektedir (Zhu, vd., 2020). Bu duruma paralel olarak da bakteriler, konakçı dışında da uzun süre hayatta kalabilir ve kolaylıkla ilaçlara karşı direnç geliştirtirebilir. İlaçlara özellikle de antibiyotiklere karşı oluşturulan direnç tedavide başarısızlıklara yol açar.

Bakterilerin virulans faktörlerine sahip olması, biyofilm oluşturma özelliği, siderefor varlığı gibi özellikler ile antibiyotik dirençliliği arasından ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Biyofilm oluşturabilen patojen mikroorganizmaların, tespiti ve atibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi, hastalıkların tedavisi açısından oldukça önemlidir. İstanbul'daki bir hastanede yapılan bir çalışmada, kan örneklerinde tespit edilen *E. coli* strainlerinin farklı kemoterapötik ajanlara karşı direnç gösterdiği direnç, biyofilm oluşturma özelliği olan izolatlarda yüksek olarak tespit edilmiştir (Altınok, vd., 2018).

Çeşitli çalışmalar, *E. coli*'de biyofilm oluşumu ile kinolon direnci arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalarda, üriner sistem izolatları arasında, biyofilm oluşturan strainler, biyofilm oluşturmayanlara göre nalidiksik aside önemli ölçüde daha az dirençli olduğu bulunmuştur (%19'a karşı %38, $p = 0.01$) (Soto, vd., 2007; Johnson ve Nolan, 2009).

Fransa'daki Atlantik kıyılarından izole edilen 156 bakteri içerisinden 25 tanesinde biyofilm oluşturma özelliği bulunduğu tespit edilmiştir (Doghri, vd., 2015).

Denizel mikroorganizmalar ekosistemin sahip olduğu kompozisyonun içeriğine göre farklı enzimatik aktiviteyi yapabilecek enzimlere sahip olabildiği bilinmektedir (Das, vd., 2009). Makromolekülleri parçalayarak bakteri için kaynak haline getiren enzimlerin, virülansı arttırmaktadır, fakat deniz kökenli bakterilerde enzimatik aktivite ile ilgili çalışma oldukça azdır (Catrangiiu, vd., 2015). Yapılan araştırmalar, denizel mikroorganizmalardan izole edilen bakterilerin sahip olduğu enzimlerin, biyoteknolojik çalışma ve uygulamalarda verimliliği üzerine çalışmalar son dönemde çok fazladır (Gozari, vd., 2016).

Vila, vd. (2002), *E. coli* strainlerinde virülans ve direnç üzerinde yaptığı bir çalışmada, kinolonlara duyarlı strainlerin hemolizin üreten strainlerden direnç yüzdesini yüksek bulmuşlardır.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3. 1. İzolatların Temini

Bu araştırmada, Tez Danışmanı Prof. Dr. Nurcihan HACIOĞLU DOĞRU ve ekibi tarafından 2018-2020 yılları arasında Çanakkale kıyı şeridinde yapılan bir çalışmada izolasyonu yapılmış olan toplam 50 adet bakteri izolatı ile çalışılmıştır. Tüm izolatların tez kapsamında öncelikle gram boyamaları yapılmıştır. Boyama sonucuna göre, gram negatif özellikteki (n=44) izolatlarla çalışmalara devam edilmiştir. Çalışmamızda, gram boyamanın yanısıra oksidaz ve katalaz testleri yapılan izolatların (Tamer, vd., 1989) Microgen ID Identification System programına göre doğrulaması da yapılarak stok kültürleri saklanan Gram negatif bakteri izolatlarının aktifleştirilmesi için; stok kültürden 50 µL alınarak Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine aktarılarak 1 gün süreyle gelişmeye bırakılmıştır.

3.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyonu

Tür düzeyinde identifikasyon; 16S rDNA gen dizi analizleri kullanılarak filogenetik tanımlamaları yapılmıştır (Yanez, vd., 2003). NCBI'da yer alan BLAST, GenBank ve Pubmed gibi uygulamalar bu amaçla kullanılmıştır.

Genomik DNA izolasyonu; Bu amaçla ticari Bakteriyal genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Genomik DNA izolasyon ve saflaştırma kiti olarak; yüksek verimli, yüksek saflıkta, genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonları sağlayan, ticari kit kullanılmıştır. İzolatlar TSB'de besiyerinde 30 ^{o}C'de 18 saat inkübe edilip kültür edilmiştir. DNA izolasyon kitinin belirttiği hücre yoğunluğuna geldikten sonra genomik DNA izolasyon aşamasına geçilmiştir. Ticari DNA izolasyon kitinin işlem basamakları doğrultusunda genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Jel, (120 V, 20 dk.) yürütülüp, UV ışık altında genomik DNA bantları incelenmiştir. Kantitatif DNA tayini spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

DNA Konsantrasyonu= OD260 x 50 x Seyreltme oranı

Primerlerin saptanması; 16s rDNA geninin Klindworth, vd. (2013) tarafından belirtilen primerlerin sentez ettirilmeden önce biyoinformatik araçlar (NCBI Primer Blast ve Primer3) yardımı ile kontrolleri yapılmıştır. Yukarıda referans verilen makalelerde belirtilen olası 16s rDNA gen bölgesine ait primer dizileri alttaki tabloda listelenmiş ve kontrolleri yapılarak en yüksek verimliliğe sahip olan primer çifti belirlenmiştir. Belirlenen bu primerlerin sentezi yaptırılmış ve 16s rDNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği ile çoğaltımlarının yapımında kullanılmıştır.

Tablo 1

Filogenetik analizde kullanılan 16s rDNA geni için primer dizileri (Klindworth, vd., 2003)

Gen	**Primerler**	**Sekans**
16S rDNA	0341f	CCTACGGGGGCGCAG
	0785r	GACTACGGGTATCTAATCC

Çoğaltımı yapılan bu genlerin PZR ürünleri hizmet alımı yolu (MEDSANTEK) sekanslama işlemine tabi tutulup bakteriyal tanımlara yapılmıştır. Dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesi için tür düzeyinde identifikasyon bölümünde belirtilen biyoinformatik araçlar kullanılarak yapılmıştır.

3.3. Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

3.3.1. Kültürel Yöntemlerle Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

50 adet izolatın, antibiyogram çalışması Kirby- Bauer metoduna göre yapılmıştır. Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri üzerine seçilen hazır antibiyotik diskleri yerleştirilmiş ve mezofilik koşullarda 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda disk çapları ölçülerek kaydedilmiş ve sonuçlar rehbere uygun olacak şekilde; duyarlı (S), orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) şeklinde kaydedilmiştir (CLSI, 2009). Direnç belirlemede kullanılan ticari antibiyotikler; Ampisilin (AM10), Gentamisin (G120), Penisilin (P10), Tetrasiklin (TE30), Vancomisin (VA30)'dir.

Direnç profilleri ortaya konan izolatların ÇAD indeksi hesabı Krumpermann (1985)'a göre yapılmıştır. Hesaplama: a/b oranıyla ortaya konmuştur. Bu indeks > 0.2 yoğun antibiyotik kullanımını, ÇAD < ya da = 0.2 ise antibiyotik yokluğu ya da az kullanımını ortaya koymaktadır.

3.3.2. İzolatların Antibiyotik Direnç Geni Taşıma Potansiyellerinin Belirlenmesi

İzolatların taşıyabileceği antibiyotik direnç genlerinden, Vankomisin (Van) ve Tetrasiklin (Tet)'e direnç özelliğinin kodlandığı sırasıyla VanA ve TetM genlerinin izolatlardaki varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır (Tablo 2). Bu amaçla kullanılan PZR primerlerinin dizileri Tablo 2'de verilmiştir. Literatür bilgileri (Pasquaroli, vd., 2014; Çardak, vd., 2021) kapsamında, PZR bileşenlerinde gerekli modifikasyonlar gerçekleştirilmiş olup; VanA ve TetM direnç genlerinin PZR bileşenleri Tablo 3 ve 4'te verilmiştir.

Tablo 2

Antibiyotik direnç geni primer dizileri

Antibiyotik Direnç Geni	Primer Dizileri	Baz Çifti
vana	F-5' GTA CAA TGC GGC CGT TA R-5' GGG ACA GTT ACA ATT GC	732 bp
tetM	F-5' GTT AAA TAG TGT TCT TGG AG R-5' CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA	657 bp

Tablo 3

Van A'ya ait PZR içerikleri

PZR Bileşenleri	µL/Tüp	Son Konsantrasyon
Steril bidistile H_2O	18.0	-
10 X Buffer	2.5	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	1.0	2 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer Van A F	0.5	10 pmol $25\mu L^{-1}$
Primer Van A R	0.5	10 pmol $25\mu L^{-1}$
Taq polimeraz	0.2	1 U $25\mu L^{-1}$
DNA	2.0	300 ng $25\mu L^{-1}$
Toplam hacim	25.0	

Tablo 4

Tet M'ye ait PZR içerikleri

PZR Bileşenleri	µL/Tüp	Son Konsantrasyon
Steril bidistile H_2O	18.0	-
10 X Buffer	2.5	1X
$MgCl_2$ (25 mM)	2.0	2 mM
dNTP (25 mM)	0.3	0.3 mM
Primer Tet M F	0.5	10 pmol $25\mu L^{-1}$
Primer Tet M R	0.5	10 pmol $25\mu L^{-1}$
Taq polimeraz	0.2	1 U $25\mu L^{-1}$
DNA	1.0	300 ng $25\mu L^{-1}$
Toplam hacim	25.0	

3.4. İzolatların Enzimatik Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzolatların virulans özelliklerini belirlemek amacıyla aşağıda belirtilen bazı enzim testleri uygulanmıştır.

3.4.1. DNaz Aktivitesi

Toluidin mavisi içeren DNaz Test Agar besiyerine çizgi ekimi yapılan izolatlar mezofilik koşullarda 48 saat inkübe edilmiş olup, besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri parlak pembe renkli zon (+) kabul edilmiştir (Tamer, vd., 1989).

3.4.2. Hemoliz Aktivitesi

Koyun kanı ilaveli Tripton Soy Agar (TSA)'a izolatlar ekilip 37 ^oC'de 1 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda şeffaf zon görüntüsü (+) olarak kabul edilmiştir (Tamer, vd., 1989).

3.4.3. Proteaz Aktivite

Skim Milk Agar (SMA) besiyerinde izolatlar 30 ^oC'de 2 gün inkübe edildikten sonra parlak zon (+) olarak kabul edilmiştir (Tamer, vd., 1989).

3.4.4. Lipolitik Aktivite

Tribütrin agar üzerine ekimi yapılan izolatlar 30 ºC'de 2 gün inkübe edilmiş olup, izolatlar etrafındaki şeffaf zon (+) kabul edilmiştir (Collins, vd., 1989).

3.4.5. Amilolitik aktivite

Nişasta agara izolatların ekimi yapılmış ve sonrasında 30 ºC'de 2 gün inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra lügol çözeltisi eklenerek amilaz aktivitesinin gözlenmiştir (Collins, vd., 1989).

3.4.6. Lesitinaz üretimi

TSA'a %10 oranında yumurta sarısı emülsiyonu eklenerek besiyeri hazırlanmış olup ekim sonrası izolatlar 1 gün 37°C'de inkübe edilmiştir. Plakaların etrafında veya altında beyaz bir çökelti olması lesitinaz üretimi pozitif değerledirilmiştir (Tamer, vd., 1989).

3.4.7. Jelatin Hidrolizi Aktivitesi

Jelatin eklenerek hazırlanan besiyerine bakteri transferi sağlandıktan sonra 1 gün boyunca tüpler buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda buzdolabından çıkarılan izolat içeren tüpler, tüp içerisindeki besiyerinin katılaşma durumuna göre; katılaşmamış ve hala sıvı olan besiyeri pozitif, katılaşanlar negatif şeklinde değerlendirilmiştir. Bu bilgilere göre jelatin hidrolizi aktivitesi sonuçları değerlendirilerek kaydedilmiştir (Tamer, vd., 1989).

3.4.8. İzolatların Amino Asit Dekarboksilaz (AAD) Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatlar modifiye sıvı besiyerinde (pH= 5.3) mezofil koşullarda 2-3 gün inkübe edilip, (+) enzim aktivitesi için tüplerde mor renk oluşumu taranmıştır (Tamer, vd., 1989).

3.5. İzolatların Siderofor Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi

Nokta ekim tekniğiyle Chrome Azurol S agar (MCASA) (değiştirilmiş) besiyerine yapılarak mezofilik koşullarda 4 gün inkübasyona bırakılan izolatlarda besiyerindeki renk değişimi (sarı-turuncu renk oluşumu) (+) sonuç olarak kaydedilmiştir (Perez, vd., 2007).

3.6. İzolatların Slime Oluşumunun Belirlenmesi

Bu amaçla iki farklı yöntem kullanılmıştır.

3.6.1. Kongo Kırmızılı Agar (KKA) Besiyerinde Slime Oluşumunun Tespiti

KKA besiyerinde ekimi yapılan izolatların mezofil koşullarda 24 saatlik inkübasyonu sonucunda siyah koloni oluşumu (+), pembe renk ise (-) olarak değerlendirilmiştir (Tamer, vd., 1989).

3.6.2. Standart Cam Tüp Metoduna Göre Slime Oluşumunun Tespiti

Nutrient Broth (NB) ortamında (0.5 McFarland yoğunluk) 2 gün mezofilde inkübe edilen izolatların sıvı kısmı dökülüp tüpler metilen mavisi ile muamele edilmiştir. Tüpteki sıvı tekrar dökülüp kurutma kağıdı üstünde ters şekilde bekletilen tüplerde, boyalı film tabakası ya da halka görünümü slime varlığı bakımından (+) kabul edilmiştir (Ünal, 2011).

3.7. İzolatlarda Biyofilm Varlığının Tespiti

Bu amaçla mikroplate yöntemi kullanılmıştır. Genç kültürler, Luria Bertani (%1 Glukoz katkılı) Broth (LB) ortamında inkübe edildikten sonra mikroplaklara (200 µL) inokule edilip 24-48 saatlik iki seride mezofilde inokule edilmiştir. Kontrol olarak plaklara bakterisiz besiyeri inokule edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kez saf su ile yıkama sonrası plaklara kristal viyole eklenip 15 dk. bekletme sonunda tekrar yıkama (3 kez saf su) yapılmıştır. Kurutma kağıdında ters çevrilip kurutma yapılmış plakların kuyularına etanol eklenip 10 dk.'lik bekleme süresinin sonunda spektrofotometrik (540 nm) olarak ölçüm alınmıştır. Sonuçlar, spektrofotometredeki değerlere göre pozitif (+) ve negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Sankar Ganesh, vd., 2018)

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İzolatların Kültürel İdentifikasyon Bulguları

İzolatlara ait biyokimyasal analiz ve Microgen TM GnA+B-ID Tanımlama Sistemine göre tür düzeyinde tanımlama bulguları sırasıyla Tablo 5 ve 6'da verilmiştir. Biyokimyasal analiz sonuçlarına göre toplam 50 tane izolattan 44 tanesi Gram negatif 6 adeti ise Gram pozitif özellikte olup 5 tanesi oksidaz (+) ve 40 tanesi ise katalaz (+) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 5

İzolatlara ait biyokimyasal analiz bulguları

İzolat No	Gram boyama	Oksidaz	Katalaz	İzolat No	Gram boyama	Oksidaz	Katalaz
No1	-	-	+	**No26**	-	-	-
No2	-	-	+	**No27**	-	-	+
No3	-	-	+	**No28**	-	-	+
No4	-	-	+	**No29**	+	-	+
No5	-	-	+	**No30**	+	-	-
No6	-	+	+	**No31**	-	-	+
No7	-	-	+	**No32**	+	-	+
No8	-	-	+	**No33**	-	-	-
No9	-	-	+	**No34**	-	-	-
No10	+	-	-	**No35**	-	-	-
No11	-	+	+	**No36**	-	-	+
No12	-	-	+	**No37**	-	-	+
No13	-	-	+	**No38**	-	-	+
No14	-	-	+	**No39**	-	-	-
No15	+	-	-	**No40**	-	-	-
No16	-	-	+	**No41**	-	-	+
No17	-	-	+	**No42**	-	-	+
No18	-	-	+	**No43**	-	+	+
No19	-	-	+	**No44**	-	+	+
No20	+	-	-	**No45**	-	-	+
No21	-	-	+	**No46**	-	-	+
No22	-	-	+	**No47**	-	+	+
No23	-	-	+	**No48**	-	-	+
No24	-	-	+	**No49**	-	-	+
No25	-	-	+	**No50**	-	-	-

Tablo 6

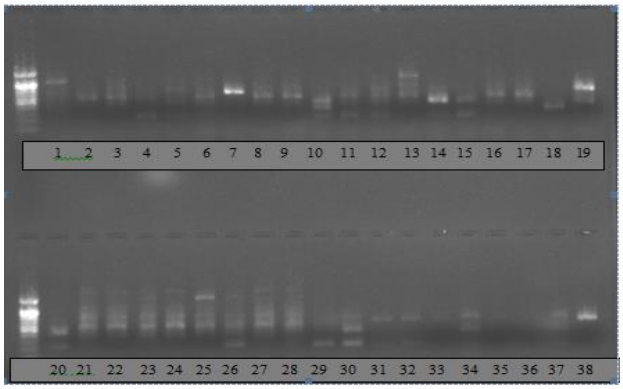
Microgen TM GnA+B-ID Tanımlama Kiti Bulgularına Göre İzolatların Tür İsimleri

İzolat No	Bakteri Adı	Familya	İzolat No	Bakteri Adı	Familya
No1	*Citrobacter freundii*		**No26**	*Klebsiella ozaenae*	
No2	*Klebsiella oxytoca*		**No27**	*E. coli*	Enterobacteriaceae
No3	*Escherichia coli*	Enterobacteriaceae	**No28**	*S. arizonae*	
No4	*E. coli*		**No29**	Gram pozitif	Aeromonadaceae
No5	*C. freundii*		**No30**	Gram pozitif	
No6	*Aeromonas hydrophila*	Aeromonadaceae	**No31**	*Enterobacter ludwigii*	
No7	*C. freundii*		**No32**	Gram pozitif	
No8	*S. arizonae*	Enterobacteriaceae	**No33**	*C. freundii*	
No9	*E. coli-inactive*		**No34**	*C. freundii*	
No10	Gram pozitif		**No35**	*K. ozaenae*	
No11	*A. hydrophila*	Aeromonadaceae	**No36**	*C. freundii*	
No12	*E. coli*		**No37**	*S. arizonae*	
No13	*A. hydrophila*		**No38**	*C. freundii*	
No14	*E. coli*		**No39**	*Enterobacter cloacae*	Enterobacteriaceae Aeromonadaceae
No15	Gram pozitif		**No40**	*C. koseri (diversus)*	
No16	*Shigella flexneri*		**No41**	*C. freundii*	
No17	*A. hydrophila*		**No42**	*S. arizonae*	
No18	*E. coli*		**No43**	*E.coli*	
No19	*E. coli*	Enterobacteriaceae	**No44**	*A. hydrophila*	Aeromonadaceae
No20	Gram pozitif		**No45**	*C. koseri (diversus)*	Enterobacteriaceae
No21	*E. coli*		**No46**	*C. koseri (diversus)*	
No22	*E. coli*	Enterobacteriaceae	**No47**	*A. hydrophila*	Aeromonadaceae
No23	*Citrobacter koseri (diversus)*		**No48**	*E. coli-inactive*	
No24	*E. coli*		**No49**	*E. coli*	Enterobacteriaceae
No25	*S. arizonae*		**No50**	*S. arizonae*	

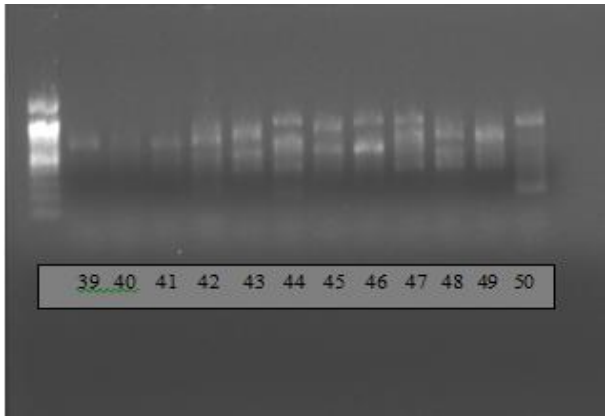
Kültürel yöntemlerle tür düzeyinde yapılan tanımlama çalışmalarında Microgen TM GnA+B-ID'den faydalanılmıştır. Tanımlama kiti kullanılarak yapılan analize göre 6 adet Aeromonadaceae ve 38 adet Enterobacteriaceae familyası üyesi bakteri tanımlanmıştır. En yüksek oranda izole edilen türlerin ise sırasıyla *E. coli* (n=14), *Salmonella arizonae* (n=6) ve *Citrobacter freundii* (n=8) olduğu belirlenmiştir (Tablo 6).

4.2. İzolatların Moleküler İdentifikasyon Bulguları

Gram pozitif ve negatif özellikte olan toplam 50 adet izolatın tamamının DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolatların DNA'ları, PZR hazırlama protokolüne göre çoğaltılmıştır. Şekil 5 ve 6'da her bir izolata ait saflaştırılmış PZR ürünleri görülmektedir. Tüm bu izolatlardan vanA (n=3) ve TetM (n=15) ve hem vanA hemde tetM (n=1) geni taşıyan toplam 19 adet izolatın hizmet alımı yoluyla 16S rDNA gen dizi analizleri kullanılarak filogenetik tanımlamaları yapılmıştır (Tablo 7). Direnç geni taşıyan bu izolatların *E. coli* (n=5), *E. cloacae* (n=1), *E. faecalis* (n=2), *E. ludwigii* (n=1), *E. durans* (n=1), *E. hormaechei* (n=1), *E, casseliflavus* (n=2), *E. gallinarum* (n=1), *S. flexneri* (n=1), *A. hydrophila* (n=2), *C. freundii* (n=2) türleri oldukları saptanmıştır.



Şekil 5. 1-38 numaralı izolatların jel görüntüsü görüntüsü



Şekil 6. 39-50 numaralı izolatların jel görüntüsü

Tablo 7

19 adet izolata ait moleküler tanımlama bulguları

Bakteri kodu	Benzerlik türü	Benzerlik yüzdesi	Erişim kodu
No1	*C. freundii*	82.67	gi|2485082252|CP099084.1
No3	*E. coli*	85.47	gi|1851748052|CP054363.1
No7	*C. freundii*	87.01	gi|1879651301|CP056232.1
No9	*E. coli*	90.06	gi|1829536586|CP050865.1
No10	*Enterococcus casseliflavus*	91.61	gi|2430361866|CP116026.1
No13	*Aeromonas hydrophila*	100	gi|2265458965|LR963141.1
No15	*Enterococcus gallinarum*	93.33	gi|1681051749|MN055932.1
No16	*Shigella flexneri*	89.75	gi|1860443381|CP055124.1
No17	*A. hydrophila*	100	gi|1112971476|CP018201.1
No20	*E. casseliflavus*	92.40	gi|1708149352|MN213350.1
No24	*E. coli*	91.03	gi|1829536586|CP050865.1
No27	*E. coli*	92.52	gi|2177886535|CP061264.1
No28	*Enterobacter hormaechei*	100	gi|1798302894|CP047570.1
No29	*Enterococcus durans*	96.18	gi|222142462|FJ607264.1
No30	*Enterococcus faecalis*	97.73	gi|1434113258|MG694608.1
No31	*Enterobacter ludwigii*	100	gi|1730123908|MN371803.1
No32	*E. faecalis*	89.93	gi|701636012|KM257650.1
No39	*Enterobacter cloacae*	94.66	gi|1226861130|CP017475.1
No43	*E. coli*	100	gi|2637717002|CP140519.1

Analizlere göre elde edilen bakteri türlerinin çoğunlukla enterik bakteri olması Çanakkale kıyı şeridindeki kirliliğin fekal kökenli olabileceğine kanıt olduğu düşünülmektedir.

Denizdeki mikrobiyal çeşitlilik içerisinde, Gram (-) bakteriler sahip oldukları uyum mekanizmaları ve biyokimyasal özellikleri sebebiyle büyük öneme sahiptir. Gram negatif bakteriler derin deniz, deniz yüzeyi ve kıyı şeridi gibi farklı habitatlarda yaşamını sürdürmektedir (Omuzbüken, 2016). Bu bilgilere dayanarak, deniz kıyı şeridindeki bakteriyel popülasyon üzerinde yaptığımız çalışmada özellikle Gram negatif bakteri izolasyonuna yoğunlaşılmıştır.

Gram negatifler büyük bir biyoçeşitliliğe sahiptir. Yaptığımız analizler sonrasında da özellikle Enterobacteriaceae ve Aeromonadaceae familyasına ait olan türler bulunmuştur. Bunlardan, *E. coli* ve *C. freundii* türleri diğer tür izolatlarına oranla daha yüksek sayoda izole edilmiştir.

Dünya üzerinde farklı deniz kıyılarında bakteri toplulukları üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla denizel kökenli ve gram negatif bakteri türleri tespit edilmiştir. *S. aureus, P. aeruginosa, Salmonella* spp. vb. bakteri türleri sıklıkla tanımlandığı bildirilmektedir (Weigel, vd., 2003; Elmanama, vd., 2005).

Türkiye'de denizel ekosistemlerde bakteriyal çeşitliliğinin ortaya konduğu birçok çalışma vardır. Bu çalışmalarda, Türkiye, Suriye, Lübnan deniz kıyılarında, bakteri çeşitliliği olarak Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadales, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae familyalarının yoğunluk gösterdiği bildirilmiştir (Çetecioğlu, vd., 2009).

Marmara Denizi'nde, deniz suyu ve sedimentlerinden Gamma Proteobacteria ve Enterobacteriaceae familyasına ait bakteriler saptamışlardır. Bu veri bulgularımızla örtüşmektedir (Altuğ, vd., 2016).

Türkiye'nin güneybatı kıyılarında yapılan bakteriyel bir çalışmada *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp. *Chryseomonas* spp., *Burkholderia* spp. genusuna ait bakteriler tespit edilmiştir (Ceylan, vd., 2012).

Antalya Körfezi deniz suyundan izole edilen bakteriler, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila*, *Acinetobacter* vb. birçok genusa ait olduğu bulunmuştur (Çardak, vd., 2015).

Deniz ekosisteminde, değişen çevresel faktörler ile mikroorganizmaların aktivitesi, bolluğu ve enzim mekanizmaları gibi özellikler değişebilir (Fuhrman, vd., 1993). Denizlerdeki biyotik ve abiyotik faktörler ortamdaki bakteriyel kompozisyon ve bolluğunu belirlemekte yardımcı olduğu bilinmektedir (Sanders, vd., 1992). Bulgularımız dünya ve

Türkiye'deki literatürle uyuşmakta olup, yoğunlukla gram negatif bakteriler tanımlanmıştır.

Çanakkale boğazında aerobik ve mikroaerofilik bakteriyel analiz üzerine yapılan bir çalışmada, *Vibrio gazogenes, Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*., *Pseudomonas viridiflava, A. salmonicida*, bakteri türleri izole edilmiş, sonuca göre bakteriyel yükün çevre ve halk sagligini olumsuz etkileyecek miktarda olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Gültepe ve Aydın, 2012). Çanakkale Boğazı su akıntısının yoğun ve devamlı olduğu bir bölge olup, bundan dolayı izole edilen patojen bakteri seviyesinin azlığı, patojen bakterilerin bulunmamasina da etkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Çanakkale Gökçeada'da deniz kıyısı ve denizsel alanlarda yapılan bir çalışmada Sphingomonadaceae, Caulobacteraceae, Pseudomonadaceae Bacillaceae, Streptococcaceae, Enterococcaceae, Paenibacillaceae, Staphylococcaceae, Alcaligenaceae, Burkholderiaceae, Comamonadaceae, Ralstoniaceae, Enterobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Aeromonadales familyasına ait olan bakterileri ilk kez belirlemişlerdir (Altuğ, vd., 2016).

Çanakkale ili kıyı şeridinde Midye ve deniz suyunun mikrobiyolojik kalitesini tespit etmek amaçlı yapılan bir çalışmada midye örneklerinin %50'sinde koliform bakteri saptanmıştır (Tosun, vd., 2021).

Çanakkale denizinde yapılan çalışmalara ait bulgularla elde ettğimiz bulgular örtüşmektedir. Bunların yanında, Çanakkale ili kıyı şeridinde yapılan deniz suyunun kalitesi ve kirlilik çalışması literatürde mevcut olsa da, bakteriyal çeşitlilik ya da patojen bakteri varlığını inceleyen çalışmalar kısıtlı kalmıştır.

Fekal atıkların bulaşı ile beraber enterik kökenli bakteriler, doğal yaşam alanı olmayan deniz ortamında potansiyel patojen bakteriler olarak yer almaktadır (Bonilla, vd., 2007). Deniz ve çevresindeki alanlarından izole edilen öncelikli patojen bakteri grupları, *P. aeruginosa, S. aureus, Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Clostridium*, *Neisseria* spp., *Shigella* spp., olarak bulunmuştur. (Elmanama vd., 2005; Heaney, vd., 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre izolatlardan en çok enterik bakterilere

rastlanmıştır. Bu bakterilerin bir kısmının patojenite özelliği vardır. Patojen bakterilerin, deniz suyu ve sahil kumlarındaki varlığı, deniz suyunu rekresyonel olarak kullanan kişiler açısından halk sağlığı sorunu oluşturması olası bir potansiyel problemdir. Enfekte olan konağın fekal atıklarının su sistemine kontaminasyonu sonucu, denizlere dökülmesi ile insan vücudunda direnç kazanmış olan mikroorganizmalar deniz ekosistemi gibi su sistemlerine karışmaktadır (Stewart, vd, 2008).

E.coli, insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde doğal olarak bulunmasından dolayı fekal örneklerden kolaylıkla izole edilebilir. Aynı zamanda *E. coli* fekal kirliliğin tespit edilmesinde kullanılan model bir mikroorganizmadır. Deniz suyunun sahip olduğu fiziksel özelliklere çok düşük toleransı vardır. Çalışmamızda yüksek oranda tespit edilmesinin nedeni, atık suların denizel ortamlara sürekli deşarjı olmasıdır.

Citrobacter genusu, koliform bakteridir ve doğrulanmış 15 adet türü bulunmaktadır. *C. freundii* türü, memelilerin fekal dışkılarına bağlı çevresel ortamlarda bulunmakta ve özellikle de immun sistemi baskılanmış bireylerde ve yeni doğanlarda septisemiye neden olmaktadır (Choi, vd., 2007).

4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profili Bulguları

4.3.1. Fenotipik Antibiyotik Duyarlılık Bulguları

Ticari 5 farklı antibiyotiğe karşı izolatların direnç profilleri ve ÇAD indeksleri Tablo 8'de verilmiştir. Deniz suyu izolatı 50 adet bakterinin sırası ile %90'ının P10, %76'sının VA30, %68'inin TE30, %54'ünün AM10 ve %8'inin G120 antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir. Bununla birlikte %78'inin G120, %10'unun AM10, %10'unun VA30ve %6'sının TE30 antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde P10'a karşı duyarlılık saptanamamıştır. İzolatların %34'ünün AM10, %26'sının TE30, %17'sinin ise VA30, %14'ünün G120, %10'unun P10'a karşı orta duyarlı oldukları saptanmıştır (Tablo 8).

Tablo 8

İzolatların antibiyotik direnç profilleri

İzolat no	Antibiyotik					ÇAD indeksi	Izolat no	Antibiyotik					ÇAD indeksi
	AM10	TE30	P10	G120	VA30			AM10	TE30	P10	G120	VA30	
No1	R	R	R	S	S	0.6	**No26**	I	I	R	S	R	0.4
No2	I	R	R	S	R	0.6	**No27**	I	R	R	I	R	0.6
No3	I	R	R	S	I	0.4	**No28**	R	R	R	R	R	1
No4	S	I	R	S	I	0.2	**No29**	R	R	R	S	R	0.8
No5	I	R	I	S	I	0.2	**No30**	R	R	R	S	R	0.8
No6	I	I	R	S	R	0.4	**No31**	R	R	R	S	R	0.8
No7	I	I	R	S	R	0.4	**No32**	R	I	R	R	R-	0.8
No8	I	I	R	I	I	0.2	**No33**	R	R	R	S	R	0.8
No9	R	R	R	S	S	0.6	**No34**	I	R	R	S	R	0.6
No10	S	I	R	S	R	0.4	**No35**	R	R	R	S	R	0.8
No11	R	R	I	S	I	0.4	**No36**	R	S	R	S	R	0.6
No12	R	R	R	S	R	0.8	**No37**	I	I	I	S	R	0.2
No13	R	R	R	S	R	0.8	**No38**	R	I	R	S	R	0.6
No14	I	R	R	S	S	0.4	**No39**	I	R	R	S	S	0.4
No15	S	R	R	S	R	0.6	**No40**	R	R	R	S	R	0.8
No16	R	R	R	S	R	0.8	**No41**	R	I	R	S	R	0.6
No17	R	I	R	S	R	0.6	**No42**	R	R	R	S	R	0.8
No18	S	S	R	I	R	0.4	**No43**	R	R	R	S	R	0.8
No19	R	S	R	R	R	0.8	**No44**	I	R	I	S	R	0.4
No20	R	R	I	S	R	0.6	**No45**	I	R	R	R	R	0.8
No21	I	R	R	I	R	0.6	**No46**	S	R	R	I	R	0.6
No22	R	R	R	I	R	0.8	**No47**	S	R	R	S	R	0.6
No23	I	I	R	S	I	0.2	**No48**	R	R	R	S	R	0.8
No24	R	R	R	S	S	0.6	**No49**	R	R	R	S	R	0.8
No25	I	I	R	S	I	0.2	**No50**	R	R	R	I	R	0.8

50 adet denizsuyu izolatı bakterinin kliniklerde de aktif olarak kullanılan 5 antibiyotikten 4'üne (AM10, P10, TE30, VA30) yüksek direnç, G120 antibiyotiğine ise düşük direnç gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Nijerya'da yapılan çalışmada, yüzey sularındaki *E. coli* izolatlarında bulunan antibiyotik direnç düzeyleri; AM10 %86.5 ve TE30 %71.9 oranında bulunmuştur (Vincent, vd., 2010).

Polonya'daki atık su tesisi çalışması sonucu *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç düzeyleri; amikasin: %33.3 G120 %11.1 olarak bildirilmiştir (Koczura, vd., 2012).

Amerika'da tatlı su plajından alınan izolatların, sefazolin: %2, G120: %1, TE30 %6 ve AM10 %26 antibiyotik direnç yüzdesi olarak bulunmuştur (Alm, vd., 2014); Avustralya'da 57 farklı sucul ekosisteme ait *E. coli* izolatlarında ise AM10 ve TE30 antibiyotiklerine %15'in üstünde direnç yüzdesi tespit edilmiştir (Watkinson, vd., 2017). Dünya'da yapılan araştırmalara paralel olarak bulgularımızda TE30 ve AM10 direnci yüksek bulunmuş olup, G120 antibiyotiğine direnç düşük olarak tespit edilmiştir.

Türkiye'ye ait çeşitli kıyılardaki deniz suyu çalışmalarında tespit edilen antibiyotik direnç verileri mevcuttur. Gram negatif patojenlerin klinik tedavisinde sıklıkla kullanılan AM10, TE30, VA30 türü antibiyotiklere olan direnç düzeyi yapılan birçok çalışmaya paralel olarak %50 oranından yüksek olarak bulunmuştur (Matyar, 2012; Vignesh, vd., 2012; Çardak, vd., 2016). Çalışmamızdaki bulgulardan farklı olarak Türkiye'nin güney kıyısından izole edilen *Aeromonas* spp.'ye ait olan direnç bulgularında TE30 grubu antibiyotiklere olan direnç düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada bulgularımıza paralel olarak G120 direnç oranı da düşük olarak tespit edilmiştir (Matyar, vd., 2007).

P10'a karşı elde edilen direncin yapılan birçok çalışmaya da benzer şekilde oldukça yüksek olduğu (%90) saptanmıştır (Ağay ve Kimiran, 2017; Filik, vd., 2021). Bulgular Gram-negatif bakterilerin P10'a karşı doğal dirençli olmasını destekleyecek şekildedir. Bu durum deniz kıyı sularındaki bakteriyal antibiyotik direnci insan kaynaklı taşındığına işaret eder.

Bulgularımıza paralel olarak Akdeniz deniz suyu ve deniz sedimentlerinde yapılan çalışmada, gram negatif bakterilerin yüksek oranda AM10, streptomycine (S10), tripmethoprim-sulphamethoxazole'e karşı direnç durumları tespit edilmiştir (Matyar, vd., 2008). Pek çok çalışmada VA30 ve P10 dirençli bakteri izolatları çeşitli deniz ortamlarından izole edilmiştir (Altuğ, vd., 2010). Çeşitli antimikrobiyal ajanlar arasındaki direnç sıklığındaki farklılıklar, deniz suyuna giren karasal bakterilerde antibiyotiğe dirençli plazmidlerin varlığına atfedilmiştir (Vignesh, vd., 2012).

İstanbul Marmara denizi güneybatı sahilinden elde edilen *E. coli* strainlerinde antibiyotik direncini araştırılmış; AM10 %89.6, amoksisilin %55.2, TE30 %49.2, amikasin %4.5 bulunmuştur Bu çalışma yüksek TE30 direnci açısından elde ettiğimiz

bulgulara paralellik gösterirken, düşük AM10 direnci çalışmamızdaki yüksek AM10 direncinden farklıdır. Aynı çalışmada; P10, VA30 ve TE30 antibiyotik direnci yüksek bulunurken, G120 direnci düşük bulunmuştur (Akbulut, 2012).

Ege denizi kıyılarındaki bakteriyel popülasyon üzerine yapılan direnç profili çalışmasında %100 oranında AM10 ve TE30 direnci bulunmuş olup, elde edilen bulgularımız ile örtüşmektedir (Altuğ, 2020). Bundan farklı şekilde, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde deniz ve su kaynaklarında yapılan antibiyotik dirençliliği çalışması sonucu iki habitata ait ÇAD indeksi 0.2'den yüksekken, denizde elde edilen izolatlar, AM10 ve Enrofloksasin antibiyotiği dışında çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği bulunmuştur (Güngör, vd., 2021).

Denizden izole edilen bakterilerdeki yüksek direnç, denize farklı yollardan katılan önemli antibiyotik taşıyıcılarının olabileceğinin göstergesidir. Deniz kıyılarındaki direncin bu denli yüksek olması, antibiyotiklerin yeterli bozunma olmadan çeşitli kaynaklarda birikerek sulara karışması açısından muhtemel bir varsayımdır.

Literatürde Dünyada ve Türkiye'de bakteri izolatlarının antibiyotik direnç genlerinin araştırıldığı çalışmalarda genel olarak; P10, AM10, S10, VA30, kanamisin gibi antibiyotik gruplarına yüksek direnç bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada da buna paralel olarak VA30, TE30, P10 ve AM10'a karşı direnç profili yüksek bulunmuştur. Bu bulgular bize bölgedeki antibiyotik kullanımı yoğunluğu ve tedavi süreçlerinde sıklıkla kullanılan antibiyotik grupları hakkında bilgi vermektedir.

İzolatların ÇAD indeksleri incelendiğinde ise 6 izolat hariç toplam 44 izolatın ÇAD indeksinin 0.2'den büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu indeks, birden çok antimikrobiyal madde kaynağına maruz kalan, bakteriyal popülasyondaki bakteriyel direnç düzeyini tespit etmek için yaygın olarak kullanılır. ÇAD indeksi yüksek izolatların varlığı risk oluşturur, çünkü bu tür izolatların neden olduğu enfeksiyon, antibiyotiğe duyarlı izolatların oluşturduğu enfeksiyondan daha yüksek ölüm oranına sahiptir (Manjusha, vd., 2005).

Daha önceki yapılan çalışmalarda, deniz ortamlarından izole edilen Enterobacteriaceae izolatlarında da çoklu antibiyotik direnci araştırılmış ve bu değerler

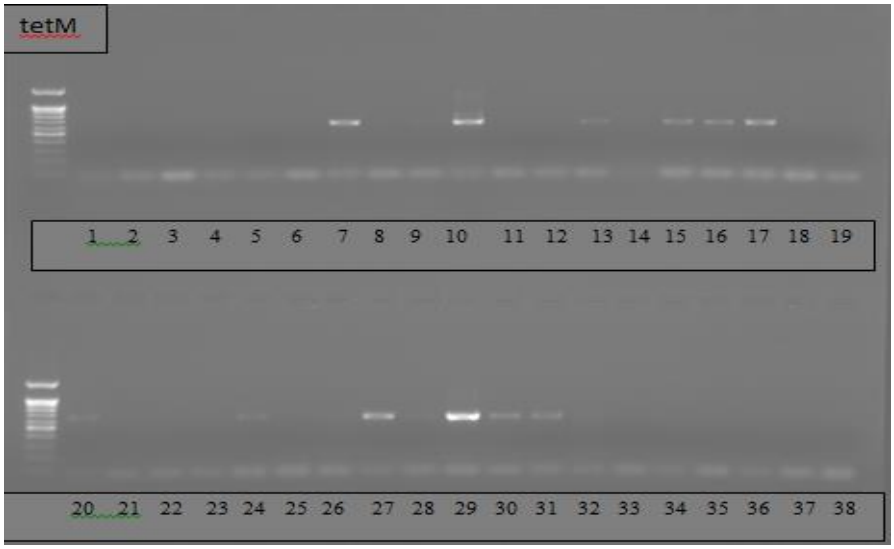
Bangladeş'te 0.44-0.52, Çin'de 0.19-0.45 ve Mısır'da 0.4-0.8 olarak bildirilmiştir (Tao, vd., 2010). Bulgularımız literatür verileriyle örtüşmektedir.

Aynı zamanda Akdeniz kıyı şeridinde yapılan çalışmada, bulgularımıza paralel olarak izole edilen patojen ve fırsatçı Gram negatif bakterilerin 0.2- 0.7 aralığında değişen yüksek oranda ÇAD indeksine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Matyar, vd., 2012).

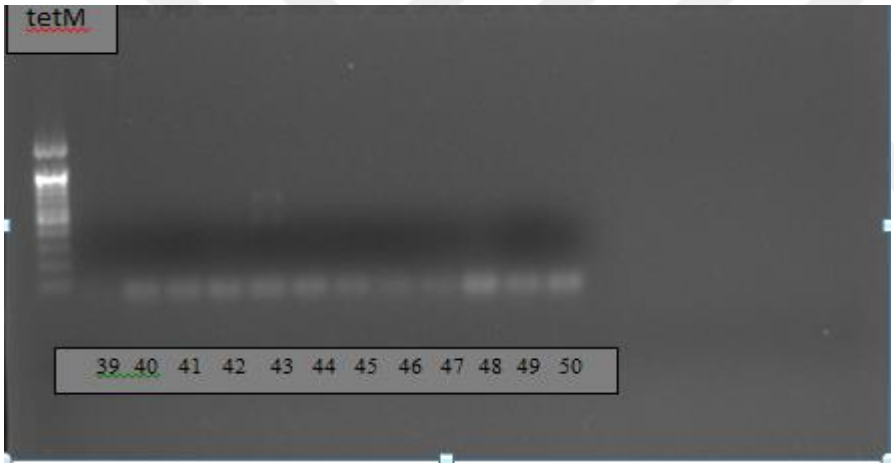
ÇAD indeksi, hayvanlar ve insan kullanımı kökenli antibiyotik maruziyetini gösteren ve ölçen önemli bir indekstir. Literatürde çeşitli çalışmalar Türkiye'deki kıyı şeridinin yüksek ÇAD endeksine sahip oluğunu ortay koymuştur (Kimiran-Erdem, vd, 2007; Altuğ, vd, 2010; Sivri, vd, 2010; Akkan, vd, 2013; Çardak, vd, 2016; Tunçer ve Bizsel, 2016). Yüksek ÇAD değerleri insan kullanımı kökenli antibiyotik kontaminasyonunu göstermektedir.

4.3.2. Antibiyotik Direnç Geni (TetM ve VanA) Bulguları

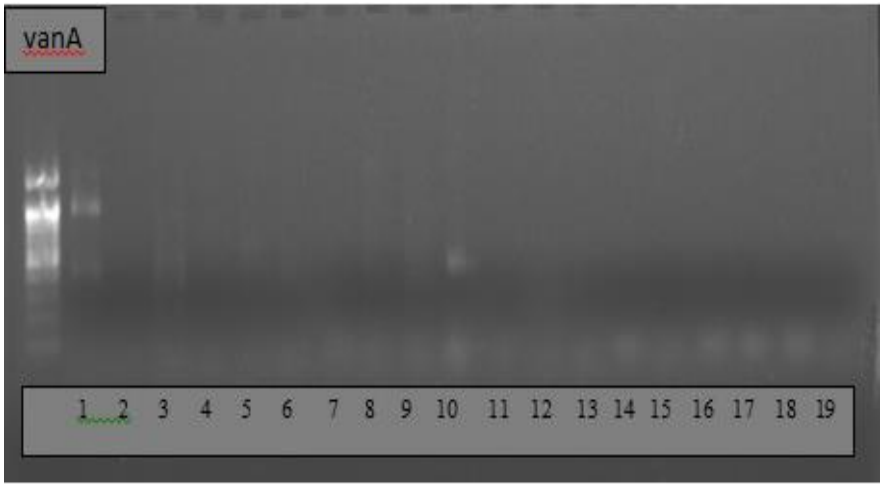
Antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucu TE30'a dirençli ve orta derecede duyarlı 50 izolatın, TE30 dirençliliğinden sorumlu tetM genine özgü spesifik primerler ile; VA30 dirençli ve orta duyarlı olduğu tespit edilen 50 izolatın, VA30 direncinden sorumlu vanA genine özgü spesifik primerler ile PZR analizleri yapılmıştır. 50 izolattan 16 tanesinde tetM geni bulunmuş olup; bu izolatlar No 7, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 20, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 43 olarak sıralanmaktadır (Şekil 7-8). İzolatların 4 tanesinde ise vanA direnç geni saptanmış olup, bu izolatlar No 1, 3, 10, 39 olarak sıralanmaktadır (Şekil 9-10). Hem tetM hem de vanA direnç geni olan izolat ise 10 numaralı izolat olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu bakterilerde tespit edilmiş olan direnç geni varlığı bölgede kullanılan yoğun ve kontrolsüz antibiyotik kullanımı sonucuna ulaştırabilir.



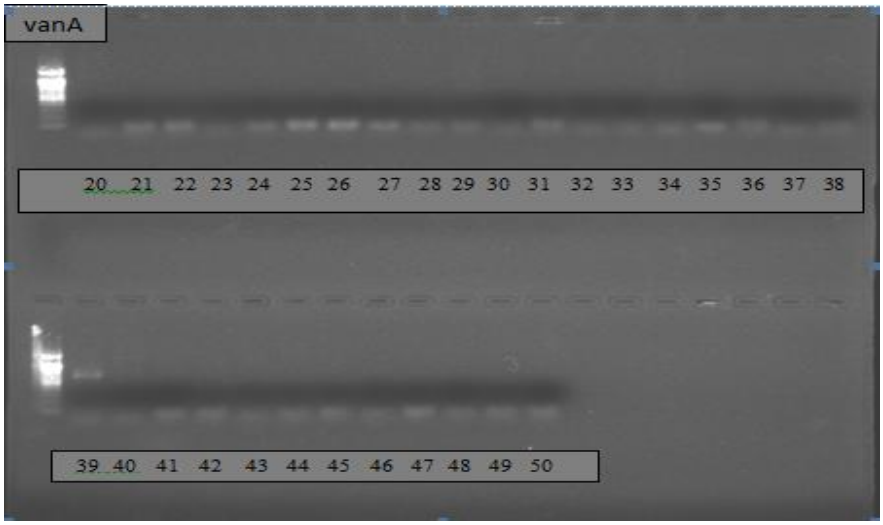
Şekil 7. 1-38 nolu izolat PZR tetM direnç geni dizileme sonucu



Şekil 8. 39-50 nolu izolat PZR tetM direnç geni dizileme sonucu



Şekil 9. 1-19 nolu izolat PZR vanA direnç geni dizileme sonucu



Şekil 10. 20-50 nolu izolat PZR tetM direnç geni dizileme sonucu

TetM, ribozomal koruma geni olarak görev alır, gram negatif ve pozitif olmak üzere 50'den fazla farklı bakteri türünde tanımlanmış ve antibiyotik direnci belirleyicilerinin cinsler arasında ve cinsler rasında yayılmasında önemli bir rol oynamıştır (Clewell, vd., 2013).

İnsan ve hayvansal kaynaklardan izole edilen *E. coli* strainlerinden 12 tet direnç belirleyicisinin varlığı incelemiş ve bir *E. coli* izolatında tetM determinantının ilk raporu olmuştur (Byran, vd., 2004).

Mısır'da deniz suyundaki balık çiftliğinden izole edilen gram negatif bakteriler üzerinde yapılan antimikrobiyal direnç genleri çalışması sonucu, test edilen izolatların %26.3'ünün en az bir tet direnç belirleyicisi olduğu ve en sık taşınan genin tetA olduğu tespit edilmiştir (Ishida, vd., 2010).

Japonya, Kore ve ABD'deki balık çiftliklerindeki Gram negatif bakterilerle yapılan çalışmalarda tet direnç geni varlığı saptanmıştır (Kim, vd., 2004; Miranda, vd., 2003, Nonaka, vd., 2007). İnsanlardan izole edilen klinik izolatlarla neredeyse aynı oranda tet direnç genine rastlanması açısından büyük klinik öneme sahiptir. Bu durum, antimikrobiyal direnç genlerinin insanlara yayılması için potansiyel bir kaynak olarak değerlendirilebilir (Furushita, vd., 2003).

Danimarka'da bulunan balık çiftliğinden izole edilen *Aeromonas* izolatlarda tet direnç genleri araştırılmış, sonuç olarak %37'sinin tet ve trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Ayrıca izolatların, tetA, tetD ve tetE genlerini bulundurdukları da saptanmıştır.

Çin güney sahilindeki balık çiftliklerinden elde edilen Enterobacteriaceae üyesi izolatlarda antibiyotik direnci, tet, sulfonamid antibiyotiği varlığını araştırmışlardır. Bakterilerin, %50'sinden fazlasında tetA, tetC ve sul2 direnç genlerine sahip olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmada izolatların %83.7'sinde int1 direnç geninin varlığı saptanmıştır (Su, vd. 2011).

Karadeniz Bölgesine ait batı ve doğu deniz sularındaki balık üretim tesislerinden izole edilen, oksitetrasiklin dirençli olduğu bilinen *Yersinia ruckerii* strainlerinde tetA ve tetB direnç geni varlığı bulunmuştur (Balta, vd., 2016). Aynı bölgede yapılan bir çalışmada, koliform bakterilerde tet e ait direnç genlerinden tetA (%18.87) geni en yüksek yüzdeye sahip olduğu bulunmuştur (Terzi, 2013).

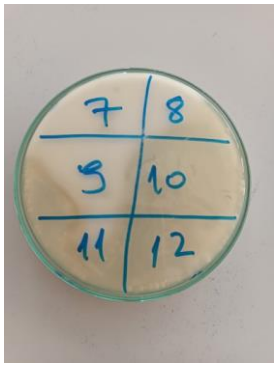
Tet direncini gösteren birden fazla gen varlığı ve farklı fonksiyonlarla sağladığı düşünüldüğünde, çalışmamızda elde ettiğimiz tetM geni varlığı bu çalışmalardan farklı olarak elde edilmiş bir sonuçtur. Bu durumun çalışılan strainlerin farklı olması ile birlikte daha önceki çalışmalardan farklı kematerapötik ajanlarla etkileşimde olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kliniklerde ve hayvanlar üzerinde sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotik olan tet direnç varlığının tespiti antibiyotiğin ne kadar yaygın kullanıldığının bir göstergesidir.

VanA direnç geni bakterilerde kromozomal ya da sonradan kazanılmış olabilir. Vankomisin antibiyotiği gram pozitif bakterilerin tedavisinde kullanılan bir antibiyotik grubudur. Bakterilerin, plazmid ve transpozonlar gibi mekanizmalar aracılığı ile olası gen transferinden kaynaklı olarak, farklı tür ve cinse ait bakterilere vankomisine ait olan dirençlilik genini aktarabilir. Bu mekanizma ile vankomisine direnç kazanan bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisi, kliniklerde sıklıkla karşılaşılan zorluklardandır. (Şardan, 2002).

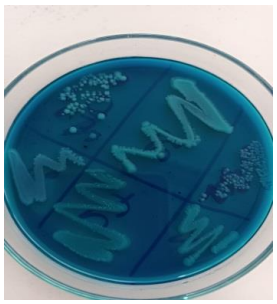
Yapılan bir çalışmada, antibiyotik direnç geninin, *E. faecalis* türünden *S. aureus* türüne konjugasyon aracılığıyla, glikopeptid-makrolid ve vankomisin antibiyotiklerine ait olan direnç genlerinin geçişinin tespit edilmiştir (Noble, vd.,1992). Klinik ortamda yapılan bir çalışmada ise, *E. faecium* türünden *S. aureus* türüne aktarılan direnç geni varlığı bildirilmiştir. Bu bilgiler, yaptığımız çalışmada vanA geninin gram negatif bakterilerde de görülmesi durumunu desteklemektedir (Weigel, vd., 2007).

4.4. İzolatların Enzimatik Aktivite Bulguları

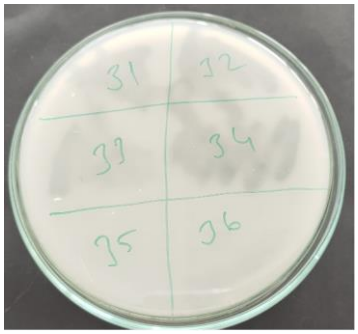
İzolatların yüzdesel olarak enzim aktiviteleri sırası ile %18 hemoliz, %20 proteaz (Şekil 11), %26 aminoasit dekarboksilaz (AAD) (Şekil 14), %40 lipaz (Şekil 13), %70 DNaz (Şekil 12), %84 lesitinaz, %100 amilaz, %100 jelatinaz olarak tespit edilmiştir (Tablo 9).



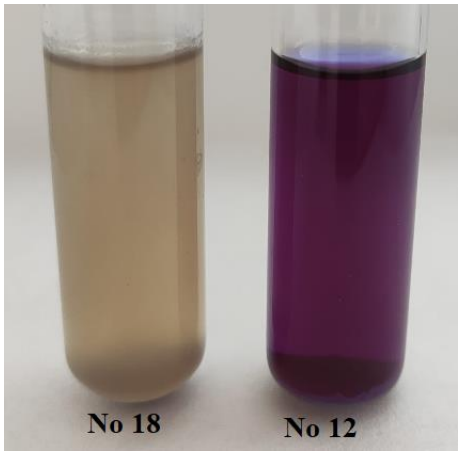
Şekil 11. No 7-12 izolatlara ait proteaz aktivite görüntüsü



Şekil 12. No19-24 nolu izolatlara ait DNaz aktivite görüntüsü



Şekil 13. No 31 - 36 nolu izolatlara ait lipaz aktivite görüntüsü



Şekil 14. No 18 - 12 nolu izolatlara ait AAD aktivitesi görüntüsü

Enzim aktivitesi tayini izolatların virülansları hakkında fikir edinmek amacıyla taranmıştır. Özellikle saptanan yüksek amilaz, jelatinaz, lesitinaz ve DNaz aktiviteleri patojenite derecesini ortaya koymak için dikkate değerdir. Ayrıca metabolik aktivitelerde kullanılan enzimlerin varlığı ve oranca yüksek olması söz konusudur. Bu enzimler aynı zamanda doku invazivliğini arttırarak virulansı artırır (Dolapçı, 2023).

Patojen mikroorganizmaların birçoğu, konakçının hücrelerini yıkıma uğratan ve virulansını arttıran toksin veya hemolizinler üretirler. Gram negatif bakteri olan, Salmonella bakterilerinin salgıladığı hemolizinler fagositoz edilmesini önleyerek virulansını arttırır (Libby, 1994). Bakteri hücreleri sistemik enfeksiyonlara neden olurken, hücreleri istila ederek ve invaziv olarak aynı zamanda hücre içi ve dışı kaynakları kullanarak doku ve hücrelere yerleşir ve bunları sahip oldukları enzimler aracılığı ile gerçekleştirir (Upadhyaya, vd., 2009). Çalışmamızda elde edilen değerler izolatların virulanslarının yüksek olduğu durumunu düşündürmektedir.

Altuğ, vd. (2020), Çanakkale bölgesindak, denizden izole edilen gram (-) bakterilerin, %78 tirozini, %61'inin glikozu, %60'ının fosfatı metabolize edecek enzime sahip olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bu bilgiler ışığında denizsel bakterilerin deniz suyu kompozisyonuna göre değişen karbonhidrat vb. bileşiklere karşı enzim mekanizmasına sahip oldukları sonucuna varılabilir.

Tablo 9

İzolatların Enzimatik Aktivite Sonuçları

İzolat No	Enzim								İzolat No	Enzim							
	DNaz	Proteaz	Lipaz	Amilaz	Lesitinaz	Hemoliz	AAD	Jelatinaz		DNaz	Proteaz	Lipaz	Amilaz	Lesitinaz	Hemoliz	AAD	Jelatinaz
No1	+	-	-	+	-	-	-	+	**No26**	-	-	-	+	+	-	-	+
No2	+	-	-	+	-	-	-	+	**No27**	+	-	-	+	+	-	-	+
No3	+	-	-	+	-	-	-	+	**No28**	+	+	+	+	+	+	-	+
No4	-	-	-	+	+	-	-	+	**No29**	+	-	-	+	+	-	-	+
No5	-	-	-	+	+	-	-	+	**No30**	-	+	-	+	+	-	-	+
No6	+	-	-	+	+	-	-	+	**No31**	-	-	+	+	+	+	+	+
No7	+	-	-	+	+	-	-	+	**No32**	-	-	+	+	+	+	+	+
No8	+	+	+	+	+	+	-	+	**No33**	+	-	+	+	+	+	+	+
No9	+	+	-	+	+	+	-	+	**No34**	-	-	+	+	+	-	-	+
No10	-	+	+	+	+	-	-	+	**No35**	+	+	-	+	-	-	-	+
No11	-	+	-	+	+	-	+	+	**No36**	+	-	-	+	+	-	-	+
No12	-	+	-	+	+	-	+	+	**No37**	-	-	+	+	+	-	+	+
No13	+	-	+	+	+	-	-	+	**No38**	+	-	+	+	+	-	+	+
No14	+	-	+	+	+	-	-	+	**No39**	+	-	+	+	+	-	+	+
No15	-	-	-	+	+	-	-	+	**No40**	+	-	-	+	+	-	+	+
No16	+	-	+	+	+	-	-	+	**No41**	+	-	-	+	+	-	-	+
No17	+	-	+	+	+	-	-	+	**No42**	+	-	-	+	+	-	+	+
No18	+	-	+	+	+	-	-	+	**No43**	+	-	-	+	+	+	+	+
No19	-	-	-	+	+	-	-	+	**No44**	-	-	+	+	+	+	+	+
No20	-	-	-	+	+	-	-	+	**No45**	+	-	+	+	+	+	-	+
No21	+	-	-	+	+	-	-	+	**No46**	+	-	+	+	+	-	-	+
No22	+	-	-	+	+	-	-	+	**No47**	+	-	-	+	-	-	-	+
No23	+	-	-	+	+	-	-	+	**No48**	+	-	-	+	+	-	-	+
No24	+	+	-	+	+	-	-	+	**No49**	+	+	+	+	-	-	-	+
No25	+	-	-	+	-	-	-	+	**No50**	+	-	+	+	-	-	+	+

Hindistan'a ait Orissa bölgesi deniz kıyılarında yapılan bir çalışmada, 16 adet Bacillus türüne ait strainlerinde ekstrasellüler enzim varlığı araştırılmış, çoğunluğunda proteaz, amilaz, kitinaz, hidrolaz, kazein ve pektinaz enzimlerine sahip oldukları bulunmuştur (Bal, vd, 2009). Çalışmamıza ait bulgulara paralel olarak izolatlar amilaz ve proteaz enzim aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Gökçeada deniz suyundan izole edilen bakterilerin, lipaz ve proteaz enzimlerine sahip oldukları bildirilmiştir (Türetken ve Altuğ, 2014). Elde ettiğimiz bulgularla benzerlik gösteren bu çalışma aynı zamanda Gökçeada ve çevresindeki denizsel kirlilikte artış olmasının enzimatik aktiviteyi olumsuz etkileceği sonucuna ulaşmıştır.

Yapılan bir çalışmada İzmir Körfezinden izole edilen bakteri strainlerin ekstrasellüler enzim aktivitelerinin yoğun olduğu ve amilaz, esteraz, jelatinaz, lipaz ve proteaz enzimlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Ersoy Ömeroğlu, 2011). Gram negatif ve biyolüminesan özelliği olan bu bakterilerin ekstraselüler enzim aktiviteleri bulgularımız ile örtüşmektedir.

4.5. Siderefor Aktivitesi Bulguları

İzolatların siderefor kapasiteleri Tablo 10 ve Şekil 15'te verilmiş olup, tüm izolatların siderefor üretebilme kapasitesinin bulunduğu saptanmıştır.



Şekil 15. No 5-8 nolu izolatların siderefor analiz sonuç görüntüsü

Siderofor aracılığı ile elde edilen demir, bakteri hücreleri tarafından elektron taşımasında, oksijen taşımasında ve enzim işlevlerinde kullanılır. Sideroforlar bazı tür bakterilerin hastalık yapma yeteneğini arttırır, bundan dolayı siderefor bir virulans faktörü olarak kabul edilir. Çalışmamızda kullanılan izolatların yüksek siderefor üretme potansiyelleri, virulanslarını arttırmaktadır yorumu yapılabilir.

Enterobacteriaceae familyasına ait birçok bakteri, virulansı arttırıcı enterobaktin ve aerobaktin olarak adlandırılan türlere özgü sideroforlara sahiptir (Kokosharov ve Phetisova, 2002).

Denizden izole edilen gram negatif bakterilerde, izolatların %50'sinde siderofor fonksiyonuna sahip genler tanımlanmıştır (Machado, 2015).

Kokosharov ve Phetisova (2002), *Salmonella* bakterilerinin siderofor üretiminin yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Erdem, vd. (2010), 120 tatlı su balığından izole edilen *A. hydrophila, Aeromonas caviae* strainlerinde tamamında *Aeromonas veronii* bv. *sobria* strainlerinin ise sadece iki tanesinde siderefor tespit etmiştir.

Çalışmamızda tüm izolatlarda elde edilen siderefor üretebilme yeteneği bu izolatların patojeniteleri hakkında da önemli bir bilgi vermektedir.

Tablo 10

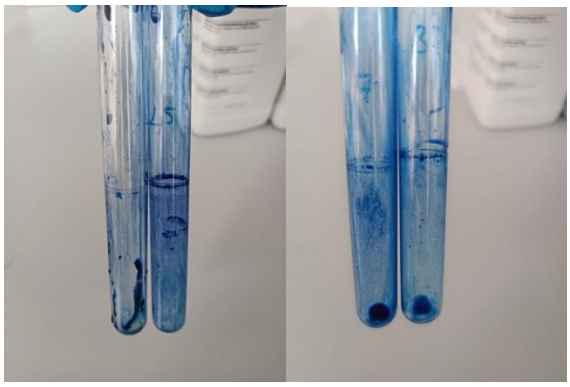
İzolatların siderofor, slime oluşumu ve biyofilm analiz sonuçları

İzolat No	Siderefor	Slime		Biyofilm	İzolat No	Siderefor	Slime		Biyofilm
		Kongo kırmızı agar	Cam tüp				Kongo kırmızı agar	Cam tüp	
No1	+	+	+	+	**No26**	+	+	+	++
No2	+	+	+	++	**No27**	+	+	+	+++
No3	+	+	+	++	**No28**	+	+	+	+
No4	+	+	+	+++	**No29**	+	+	+	+++
No5	+	+	+	+++	**No30**	+	+	+	+
No6	+	+	+	+++	**No31**	+	+	+	+++
No7	+	+	+	+	**No32**	+	+	+	+++
No8	+	+	+	+++	**No33**	+	+	+	+++
No9	+	+	+	++	**No34**	+	+	+	+++
No10	+	+	-	-	**No35**	+	+	+	+
No11	+	+	+	+++	**No36**	+	+	+	++
No12	+	+	+	++	**No37**	+	+	+	++
No13	+	+	+	+	**No38**	+	+	+	++
No14	+	+	+	+++	**No39**	+	+	+	+
No15	+	+	+	+++	**No40**	+	+	+	++
No16	+	+	+	++	**No41**	+	+	+	+
No17	+	+	+	+++	**No42**	+	+	+	+
No18	+	+	+	+++	**No43**	+	+	+	+
No19	+	+	+	++	**No44**	+	+	+	++
No20	+	+	+	+	**No45**	+	+	+	++
No21	+	+	+	++	**No46**	+	+	+	+
No22	+	+	+	++	**No47**	+	+	+	++
No23	+	+	+	++	**No48**	+	+	+	+
No24	+	+	+	++	**No49**	+	+	+	+
No25	+	+	+	+++	**No50**	+	+	+	++

4.6. İzolatların Slime Oluşturma Bulguları

Çalışmamızda 50 izolattan 49 tanesinin slime oluşturma yeteneğine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 16).

Slime oluşturmak bakterilerin virulansına etki ederek, patojenitesini arttırır. Özellikle de konakçı savunmasına ait olan fagositoz ve toksinlerden korunmasını sağlar. Slime oluşturma, antibakteriyellerin bakteriye olan difüzyonunu engelleyerek bir bariyer oluşturarak antibiyotik duyarlılığını azalttığı ve böylece tedaviyi zorlaştırdığı bilinmektedir (Ay, vd., 2002).



Şekil 16. No 3, 7, 14, 15 nolu izolatların cam tüp yöntemine göre slime oluşturma görüntüsü

4.7. İzolatlarda Biyofilm Oluşturma Bulguları

İzolatların %32'sinde mükemmel; %38'inde çok iyi; %28'inde iyi dercesinde biyofilm oluşturma kapasitesi saptanırken; %2'sinde ise biyofilm oluşumu belirlenememiştir (Tablo 10). Biyofilm oluşturan türler arasında *E. coli, C. freundii, A. hydrophila, S. Arizonae* kuvvetli adheran özelliğe sahip olduğu; *E.coli*'ye ait olan inaktive izolatın ise biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Biyofilm tabakası bakteriye gelişmiş bir iletişim sağlarken aynı zamanda biyokimyasal ve ekolojik olarak fonksiyonlarını destekleme özelliği sağlayarak çevresel kararlılığını arttırır. Bakteriler için bu durum, yer aldıkları ekosistemlerde varlıklarını sürdürebilmek için önemli bir yaşam stratejisi kazandırır. Özellikle sucul ortamdaki bakteriyel biyofilmlerin, organik madde döngüsü için gerekli olan biyoparçalanma sürecinde aktif bir yeri vardır. Biyofilm oluşturma özelliği bir vürulans faktörü olarak bakterilerin patojenlik özelliğini arttırır (Rampadarath, vd., 2017). Biyofilm yapısı bakteriler arası genetik materyalin kolaylıkla aktarımının gerçekleşmesini sağlar. Bununla birlikte ilaçlara direnç gen aktarımı kolaylaşır ve bakterilerin sahip olduğu direnç genleri biyofilm varlığı ile aynı veya farklı türden bakterilere aktarımını kolaylaştırır (Şahin, 2007).

Kızıl Denizden izole edilen Pseudoalteromonas üyesi 21 strainden 11 tanesinde biyofilm yapma özelliği bulunmuştur (Abdulrahman, vd., 2021).

Ağay ve Kimiran (2017), yılında farklı kaynaklardan izole ettikleri *Salmonella* cinsi bakterilerin izole edildiği kaynağa göre, siderefor ve biyofilm varlığının değiştiği bildirmiştir. Deniz suyu örneklerinden %78.5'inin biyofilm üretme kapasitesine sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz bulgular dünyada yapılan çalışmalarla paralellik göstermekte olup, gram negatif izolatlar yüksek oranda biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir (Lee, vd., 2003).

Biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zor ve karmaşık bir süreç olmaya başlamıştır. Tek başına antibiyotik tedavisi yeterli olmamaktadır. Çünkü biyofilm yapısı güçlenip, olgunlaştıkça, EPS birikimi artar ve bununla birlikte biyofilme antimikrobiyal ajanların etkisi ve girişinde azalma meydana gelir (Aydemir, 2018). Türkiye denizlerinden izole edilen gram negatif bakterilerin direnç profillerini araştırıldığı çalışmada, antimikrobiyal ajanlara duyarlı olan bakterilerin biyofilm üretme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Omuzbüken, 2016).

Jafarzade, vd. (2012), Malezya'da denizel ortamlardan izole edilen biyofilm yapma kapasitesi yüksek *Serratia marcescens*'e ait 3 bakteri strainine, P10, AM10 ve TE30 antibiyotiklerine karşı da oldukça dirençli olduğunu saptamışlardır.

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bulgularımız, Çanakkale ilinin kıyı şeridinin özellikle enterik bakteri bakınından antropojenik kirlenmeye yüksek oranda mazruz kaldığını kanıtlar niteliktedir. Bu çeşitlilik beraberinde dikkate değer ölçüde yüksek antibiyotik dirençliliği, biyofilm ve siderefor oluşturma ve enzim aktivitesi varlığını ortaya koymaktadır. Yüksek mikrobiyal kirlilik ve patojenite, Çanakkale kıyı şeridi ve etrafındaki alanların toplum ve özellikle bu kıyısal habitatları kullanan insan sağlığı bakımından yüksek oranda tehlike içerdiğini ortaya koymaktadır.

Bunun en önemli sebeplerinin Çanakkale kıyı şeridinin, yeterince arıtılmayan atık suların ve antropojenik atıkların, antibiyotik kalıntıları ile beraber karıştığı alanlar olduğunu ve bu durumun yüksek patojenite ve direnç profiline sahip bakteriyal türlerin ortamda bulunmasına yol açtığını kanıtlamaktadır. Ayrıca bakteriyel popülasyondaki direnç genlerinin varlığı ve yüksek virulans faktörlerin tespiti bakteri popülasyonları arasında direnç genlerinin yayılımının önemli kanıtı olduğu ön görülmektedir. Bu sebeple Çanakkale kıyı şeridi, özellikle toplum sağlığı, ekolojik denge bakımından ve ekosistem kaynaklarının sağlıklı bir şekilde kullanımı açısından sürekli denetlenmesi, bununla beraber zararlı etmenlerin azaltılması açısından önlemlerin alınması gereken bir alan konumundadır.

Bakteriyel popülasyonlardaki direnç genlerinin varlığı ve yayılımının uzun süreli olarak takibi yapılması amacıyla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Rekreasyon amaçlı kullanılan ve yetiştiricilik yapılan denizlerde bakteriyel popülasyondaki patojen bakterilerin izlemi ve kontrolü ekosistem, insan ve hayvan refahı ve biyoçeşitliliğin korunması yönünden önemlidir. Özellikle antibiyotik atıklarının deniz suyuna karışmasını engellemek amacı ile arıtım faaliyetlerine gereken önem verilerek kontrolü yapılmalıdır. Kliniklerde, tarım, yetiştiricilik gibi faaliyetlerde kullanılan antibiyotikler sınırlandırılarak, gerekli düzenlemeler yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

Abdulrahman, I., Jamal, M. T., Alshaery, M., Al-Maaqar, S. M. and Satheesh, S. (2021). "Isolation and identification of biofilm bacteria from microfouling assemblage developed on artificial materials submerged in the Red Sea". *JKAU Mar. Sci*, 31, 45-54.

Akiyama, T. and Savin, M. C. (2010). "Populations of antibiotic-resistant coliform bacteria change rapidly in a wastewater effluent dominated stream". *Science of the Total Environment*, 408(24), 6192-6201.

Akkan, T., Kaya, A. ve Dinçer, S. (2011). "Deniz suyundan izole edilen gram (-) bakterilerin antibiyotiklere direnç düzeyleri". *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 41(1), 18-21, doi:10.5222/TMCD.2011.018.

Altınok, Ö., Gürpınar, Ö. ve Eser, Ö. (2018). "Bakteriyel biyofilmler". *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 1(2), 45- 51.

Altıparlak, Ü., Odacı, L. ve Orhan, F. K. (2019). "Gümüşhane ili içme sularından izole edilen *Escherichia coli* izolatlarında antibiyotik direnci ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması". *ANKEM Derg*, 33(1), 12-17.

Altuğ, G., Çardak, M., Çiftci, P. S., Gurun, S., Saad, A. A., Ibrahim, A. and Fakhri, M. (2010). "Distribution and antibiotic resistance of heterotrophic and indicator bacteria in the coastal areas of Turkey, Syria and Lebanon". *Rapp Comm IntmerMedit*, 39, 333.

Altuğ, G., Türetken, P. S. Ç., Gürün, S. ve Kalkan, S. (2016). "Türkiye denizlerinden izole edilen bakterilerin çeşitliliği''. *Türkiye Denizleri Bakterilerinin Biyoteknolojik Kullanımı*, 41-51.

Altuğ, G., Çardak, M., Türetken, P. S. Ç., Gürün, S. ve Kalkan, S. (2020). "Deniz Ekosisteminde Bakteriyel Roller; Türkiye Denizleri Bakterileri Örneği". *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2), 217-230.

Altuğ, G. and Bayrak, Y. (2003). "The contribution of capsulated bacteria to the total bacterial community in the water column of the Northern Marmara Sea, Küçükçekmece Lagoon and strait of Istanbul, Turkey". *Turkish Journal Marine Sciences*, 9(2), 111-112.

Altun, H. U. ve Şener, B. (2008). "Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci". *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.

Anonim, (2023a). Çanakkale Fiziki Haritası. Milli Savunma Bakanlığı Haritalar Genel Müdürlüğü (MSB-HGM)). Erişim:10 Ekim 2023, https://www.harita.gov.tr/urun/canakkale-fiziki-il-haritasi/428.

Anonim, (2023b). Çanakkale İli Kültür ve Turizm Müdürlüğü. T.C. Kültür ve Turizm Müdürlüğü.Erişim:10 Ekim 2023, https://canakkale.ktb.gov.tr/#.

Anonim, (2023c). Çanakkale Belediyesi. Kent Haritası. Erişim:10 Ekim 2023 https://www.canakkale.bel.tr/file/288/EabvHArI1MJdDIlrRUVXT20fJKkNyclE.pdf.

Anonim, (2010d). Kuzey Ege Havzası Kirlilik Önleme Eylem Planı. T.C. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Çevre Yönetimi Genel Müdürlüğü. Ankara

Anonim, (2023e). Biyofilm Nedir?. *Method.* Erişim: 10 Ekim 2023, http://www.diatek.com.tr/Makale.

Antunes J., Leao P. and Vasconcelos, V. (2019). "Marine biofilms: diversity of communities and of chemical cues''. *Environmental Microbiology Reports*, 11(3), 287–305. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12694

Arnosti, C., Durkin, S. and Jeffrey, W. H. (2005). “Patterns of extracellular enzyme activities among pelagic marine microbial communities: implications for cycling of dissolved organic carbon’’. *Aquatic Microbial Ecology*, 38(2), 135-145.

Ash, R. J., Mauck, B. and Morgan, M. (2002). “Antibiotic resistance of gram negative bacteria in rivers. United States’’. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 713.

Ay, S., Tekerekoğlu, M. S., Bayraktar, M., Abut, L. ve Duman, B. (2002). “Klinik örneklerden izole edilen koagülaz negatif stafiolokok türlerinde “Slime” oluşumu ve antibakteriyellere duyarlılığı”. *Ankem. Dergisi*, *16*, 40-43.

Aydemir, D. H. (2018). “Bakteriyal biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri”. *Turkish Journal of Life Sciences*, *3*(1), 218-230.

Bal, Ç. (2006). “Toplum Kökenli Enfeksiyonlar Gram Negatif Çomak Direnci’’. *Ankem Derg* ,20 (2), 278-281.

Bal, S., Mishra, R. R., Rath, B., Sahu, H. K. and Thatoi, H. N. (2009). “Characterization and extracellular enzyme activity of predominant marine *Bacillus spp*. isolated from sea water of Orissa Coast, India’’. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2), 87-93.

Balta, F., Balta, Z. D., Özgümüş, O. B. and Çağırgan, H. (2016). “The Antimicrobial resistance and investigation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in the Eastern Black Sea Region’’. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, *1*(3), 72-76.

Blanco-Picazo, P., Roscales, G., Toribio-Avedillo, D., Gómez-Gómez, C., Avila, C., Ballesté, E. and Rodríguez-Rubio, L. (2020). “Antibiotic resistance genes in phage particles from Antarctic and Mediterranean sea water ecosystems”. *Microorganisms*, 8(9), 1293.

Blasi, M. F., Migliore, L., Mattei, D., Rotini, A., Thaller, M. C. and Alduina, R. (2020). "Antibiotic resistance of gram-negative bacteria from Wild captured loggerhead seaturtles''. *Antibiotics, 9*(4), 162.

Bonnet, R. (2004). "Growing group of extended spectrum β-lactamases: the CTX-M enzymes". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1-14.

Bonilla, T. D., Nowosielski, K., Cuvelier, M., Hartz, A., Green, M., Esiobu, N. and Rogerson, A. (2007). "Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure". *Marine Pollution Bulletin, 54*(9), 1472-1482.

Boyce, J. M., Cookson, B., Christiansen, K., Hori, S., Vuopio-Varkila, J., Kocagöz, S. and Pittet, D. (2005). "Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *The Lancet Infectious Diseases*, 5(10), 653-663

Boxall, A. (2010). "Impacts of Emerging Contaminants on The Environment. Ecology of Industrial Pollution'', L.C. Batty ve K. B. Hallberg (ed.).in: *Ecology of Industrial Pollution.* (s.102-124). Cambridge University Press: Cambridge.

Catão, E.C.P., Pollet, T., Misson, B., Garnier, C., Ghiglione, J.F., Barry-Martinet, R., Maintenay, M., Bressy, C. and Briand, J.F. (2019). "Shear Stress as a Major Driver of Marine Biofilm Communities in the NW''. *Mediterranean Sea. Frontiers in Microbiology*, 10, 1768. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01768.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2009). Antibiotic resistance threats The United States. *Threats Report.* Retrieved: October 22, 2023, *https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf.* .

Çetecioğlu, Z., Ince, B. K., Kolukirik, M. and Ince, O. (2009). "Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly

polluted anoxic marine sediments from the Marmara Sea". *Marine Pollution Bulletin, 58*(3), 384-395.

Ceylan, Ö. and Uğur, A. (2012). "Bio-monitoring of heavy metal resistance in Pseudomonas and Pseudomonas related genus". *Journal of Biological and Environmental Sciences, 6*(18), 233-242.

Chambers, S. J., Wyatt, G. M. and Morgan, M. R. A. (2001). "Investigation of the interactions between β-Lactams and a metallo-β-lactamase from *Bacillus cereus* using a monoclonal antibody". *Analytical Biochemistry*, 288(2), 149-155.

Cho, H. H., Kwon, K. C., Kim, S. and Koo, S. H. (2014). "Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*". *Annals of Laboratory Medicine,* 34(4), 286.

Choi, S.H., Lee, J. and Park, S. (2007). "Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended spectrum β-lactamase-producing *Enterobacter spp.*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, and *Morganella morganii* in Korea". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 26(8), 557-561, https://doi.org/10.1007/s10096-007-0308-2.

Church, M. J. (2009). "The trophic tapestry of the sea". *Proc Natl Acad Sci*, 106(37) ,15519-20, https://doi.org/10.1073/pnas.0908881106.

Clewell, D. B., Flannagan, S. E. and Jaworski, D. D. (1995). "Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916–Tn1545 family of conjugative transposons". *Trends in Microbiology,* 3(6), 229-236.

Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections". *Science,* 284(5418), 1318-1322.

Çardak, M., Özgür Özbek, E. and Kebapçioğlu, T. (2015). "Seasonal abundance and diversity of culturable heterotrophic bacteria in relation to environmental factors in

the Gulf of Antalya, Eastern Mediterranean, Turkey". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 569-582.

Çardak, M., Altuğ, G., Ay, M. and Erol, Ö. (2016). "Distribution of antibiotic resistance and the presence of vancomycin-resistance genes (van A and van B) in Enterobacteriaceae isolated from the Sea of Marmara, the Canakkale Strait and the Istanbul Strait, Turkey". *Oceanological and Hydrobiological Studies*, *45*(2).

Çolakoğlu, F., Özgümüş, O. B., Sandallı, C., Çelik-Sevim, E. ve Alpay-Karaoğlu, Ş. (2010). "Deniz suyu kökenli koliformlarda sınıf 1 ve sınıf 2 integron gen kasetleri ve antibiyotik direncinin karakterizasyonu". *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 40(2), 97-108.

Dang, H., Ren, J., Song, L., Sun, S. and An, L. (2008). "Dominant chloramphenicol resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 209-217.

Das, S., Lyla, P. S. and Khan, S. A. (2006). "Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives". *Current Science*, 90, 1325-1335.

Davies, J. (1994). "Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes". *Science*, 264, 375-8214.

Denk, A. ve Tartar, A.S. (2015). "İdrar kültürlerinden izole edilen toplum kökenli *Escherichia coli* suşlarında antibiyotik direnci". *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Derg*, 29(2), 51.

Dissanayake, D. R. A., Octavia, S. and Lan, R. (2014). "Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka". *Veterinary Microbiology*, 168(2-4), 403-412.

Doghri, I., Rodrigues, S., Bazire, A., Dufour, A., Akbar, D., Sopena, V. and Lanneluc, I. (2015). "Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-

biofilm abilities and different biofilm 3D architectures". *BMC microbiology*, *15*, 1-10.

Donlan, R.M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces". *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890.

Durdu, B., Kritsotakis, E. I., Lee, A. C., Torun, P., Hakyemez, I. N., Gultepe, B. and Aslan, T. (2018). "Temporal trends and patterns in antimicrobial-resistant gram-negative bacteria implicated in intensive care unit-acquired infections: a cohort-based surveillance study in Istanbul, Turkey''. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 14, 190-196.

Drenkard, E. and Ausubel, F. M. (2002). "Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation''. *Nature*, 416(6882), 740-743.

Elmanama, A. A., Fahd, M. I., Afifi, S., Abdallah, S. and Bahr, S. (2005). "Microbiological beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality''. *Environmental research*, 99(1), 1-10.

Erdem, B. (1999). "Enterobacteriacea". Ş Ustaçelebi (ed.). içinde *İçinde Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. (s.471-516). Güneş kitapevi: Ankara.

Erdoğan, A. E. ve Everest, A. (2013). "Antimikrobiyal ajan olarak bitki bileşenleri''. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 27-32.

Ersoy Ömeroğlu, E. (2011). İzmir Körfezi'nden Biyolüminesen Bakterilerin İzolasyonu, Fenotipik ve Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

FEDESA. (2001). *Antibiotic use in farm animals does not threaten human health*. European Federation of Animal Health, Brüssels.

Filik, N., Önem, E. and Kubilay, A. (2021). "*Aeromonas hydrophila* Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri''. *Acta Aquatica Turcica*, 17(2), 202-213.

Fuhrman, J. A., McCallum, K. and Davis, A. A. (1993). "Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans''. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), 1294-1302.

Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T. and Ohta, M. (2003). "Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates''. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5336–5342

Frieri, M., Kumar, K. and Boutin, A. (2017). "Antibiotic resistance''. *J Infect Public Health*, 10, 369-378.

Goñi-Urriza, M., Capdepuy, M., Arpin, C., Raymond, N., Caumette, P. and Quentin, C. (2000). "Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of river in *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp.''. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 125-132.

Gozari, M., Mortazavi, M. S., Bahador, N. and Rabbaniha, M. (2016). "Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*''. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15(2), 630-644.

Guardabassi, L., Wong, D. M. L. F. and Dalsgaard, A. (2002). "The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria''. *Water Research*, 36(8), 1955-1964.

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. and Andersson, D. I. (2011). "Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations''. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002158.

Gültepe, N. ve Aydın, S. (2012). "Çanakkale Boğazı'ndaki Aerob ve Mikroaerofilik Bakteriyel Floranın Araştırılması''. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 14(1), 9-16.

Güngör, N., İpek, Z.Z., Er, A. ve Kayış, Ş. (2021). "Farklı Sucul Sistemlerden İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliklerinin Karşılaştırılması''. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 6(1), 25-30.

Hacıoğlu, N. (2011). Sarıçay ve Biga Çayında (Çanakkale) Bazı Kirlilik Parametrelerinin Saptanması ve Nitrit, Nitrat Bakterileri ile Sülfür Oksitleyen Bakterilerin İzolasyonu. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Çanakkale.

Hall Stoodley, L. and Stoodley, P. (2005). "Mechanisms by which biofilms could facilitate pathogen survival, transmission and revolution''. *Trends in Microbiology*, 1(13), 7-10.

Heaney, J. L., Phillips, A. C., Carroll, D. and Drayson, M. T. (2015). "Salivary functional antibody secretion is reduced in older adults: a potential mechanism of increased susceptibility to bacterial infection in the elderly''. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 70(12), 1578-1585.

Huys, G. (2014). "The Family *Aeromonas aceae*. The Prokaryotes-Gamma proteobacteria Berlin Heidelberg''. *Springer-Verlag*, 27-57.

Ilgar, R. (2000). Çanakkale Boğazı ve Çevresi Ekosisteminin Coğrafi Açıdan İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü Denizsel Çevre Anabilim Dalı, İstanbul.

IOM (Institute of Medicine). (2010). *Antibiotic Resistance: Implications for global health and novel intervention strategies.* Washington DC: The National Academies Press.

Ishida, Y., Ahmed, A. M., Mahfouz, N. B., Kimura, T., El-Khodery, S. A., Moawad, A. A. and Shimamoto, T. (2010). "Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6), 727-734.

Jafarzade, M., Mohamad, S., Usup, G. and Ahmad, A. (2012). "Heavy-Metal Tolerance and Antibiotic Susceptibility of Red Pigmented Bacteria Isolated from Marine Environment''. *Natural Resources*, 3, 171-174.

Josenhans, C. and Suerbaum, S. (2002). "The role of motility as a virulence factor in bacteria''. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605-614.

Kalkan, S. and Altuğ, G. (2015). "Bio-indicator Bacteria; Environmental Variables of the Coastal Zones: The example of the Güllük Bay, Aegean Sea, Turkey''. *Marine Pollution Bulletin*, 95 (1): 380-384, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.017.

Karayakar, F., Ay, Ö. ve Cicik, B. (2004). "Mersin kıyı şeridinden alınan su örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarının bazı antibiyotiklere karşı plasmid kökenli dirençliliğin saptanması''. *Ekoloji*, *13*(52), 28-32.

Karkman, A., Pärnänen, K. and Larsson, D. J. (2019). "Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments''. *Nature Communications*, 10(1), 80.

Kayış, S., Çapkin, E., Balta, F. and Altınok, I. (2009). "Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey- A Survey''. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 61(4), 339-344.

Khan, F. A., Söderquist, B. and Jass, J. (2019). "Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater''. *Frontiers in Microbiology*, 10, 688.

Kemper, N. (2008). “Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment’’. *Ecological Indicators*, 8(1), 1-13.

Kim, S. R., Nonaka, L. and Suzuki, S. (2004). “Occurrence of tetracycline resistance genes tet (M) and tet (S) in bacteria from marine aquaculture sites’’. *FEMS Microbiology Letters*, *237*(1), 147-156.

Kimiran-Erdem, A., Arslan, E. O., Sanli Yurudu, N. O., Zeybek, Z., Dogruoz, N. and Cotuk, A. (2007). “Isolation and identification of enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals’’. *Environmental Monitoring and Assessment*, *125*, 219-228.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. and Glöckner, F. O. (2013). “Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies’’. *Nucleic Acids Research*, 41(1).

Kraemer, S. A., Ramachandran, A. and Perron, G. G. (2019). “Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy’’. *Microorganisms*, 7(6), 180.

Koczura, R., Mokracka, J., Jablonska, L., Gozdecka, E., Kubek, M. and Kaznowski, A. (2012). “Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water’’. *Science of the Total Environment*, 1(414), 680-685, doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.10.036.

Kokosharov, T. and Phetisova, K. (2002). “Hemolysins and aerobactin in *Salmonella gallinarum* strains isolated from Poultry’’. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153(6), 411-414.

Krewulak, K. D. and Vogel, H. J. (2008). "Structural biology of bacterial iron uptake''. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1778, 1781–1804.

Kumar, R., Mishra, A. and Jha, B. (2019). "Bacterial community structure and functional diversity in subsurface seawater from the western coastal ecosystem of the Arabian Sea, India''. *Gene,* 701, 55–64, https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.099.

Kümmerer, K. (2001). "Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into waste water by hospitals in relation to other sources–a review''. *Chemosphere*, 45(6-7), 957-969.

Kümmerer, K. (2009a). "Antibiotics in the aquatic environment–a review–part I''. *Chemosphere*, 75(4), 417-434.

Kümmerer, K. (2009b). "Antibiotics in the aquatic environment–a review–part II''. *Chemosphere*, 75(4), 435-441.

Langton, K. P., Henderson, P. J. and Herbert, R. B. (2005). "Antibiotic Resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism?''. *Natural Product Reports*, 22(4), 439-451.

Li, Z., Li, M., Zhang, Z., Li, P., Zang, Y. and Liu, X. (2020). "Antibiotics in aquatic environments of China: A review and meta-analysis''. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 199, 110-668.

Libby, S.J., Goebel, W. and Ludwig, A. (1994). "A Cytolysin Encoded by Salmonella Is Required for Survival within Macrophages''. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 489-493.

Machado, H., Sonnenschein, E.C. and Melchiorsen, J. (2015). "Genome mining reveals unlocked bioactive potential of marine Gram-negative bacteria''. *BMC Genomics*, 16, 158. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1365-z.

Maddox, M. (2022). The Use of the Centers for Disease Control (CDC) Outpatient Antibiotic Stewardship Program to Reduce Unnecessary Antibiotic Prescriptions Written for Sinusitis in a Rural Urgent Care Clinic Setting. Ph.D. thesis. Jacksonville State University JSU Digital Commons, United States.

March, J. C. and Bentley, W. E., (2004). "Quorum Sensing and Bacterial Cross-Talk in Biotechnology''. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 495-502.

Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., Sánchez, M. B. (2008). "A global view of antibiotic resistance''. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 44-65.

Matyar, F., Kaya, A. and Dinçer, S. (2007). "Distribution and antibacterial drug resistance of *Aeromonas spp.* from fresh and brackish waters in Southern Turkey''. *Annals of microbiology*, 57, 443-447.

Matyar, F. (2012). "Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast''. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 551-556.

Mayer, K.H., Opal, S.M. and Medeiros, A.A. (1995). "Mechanisms of antibiotic resistance''. G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin (ed.). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. (s.212-225). Churchill Livingstone: New York.

Miranda, C. D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S. and Roberts, M. C. (2003). "Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from *Chilean salmon* farms''. *Antimicrob. Agents Chemother*. 47, 883–888

Neilands, J. B. (1995). "Siderophores: Structure And Function of microbial iron transport compounds''. *J Biol Chem* , 270, 26723.

Noble, W. C., Virani, Z. and Cree, R. G. (1992). "Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*''. *FEMS Microbiology Letters*, *93*(2), 195-198.

Nonaka, L., Ikeno, K. and Suzuki, S. (2007). "Distribution of tetracycline resistance gene, tet(M), in Gram-positive and Gramnegative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan''. *Microbes Environ*. 22, 355– 364.

Omuzbüken, B. (2016). Denizel Biyofilm Bakterilerinin Biyositlere ve Ağır Metallere Karşı Toleranslarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İzmir.

Özden, S. (2013). "Uzman Görüşlerine Göre Çanakkale'de Deniz Kirliliği ve Kirliliğin Sebepleri''. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (1), 74-76.

Özgümüş, O. B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E. and Sivri, N. (2009). "Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey''. *The Journal of Microbiology*, 47, 19-27.

Pasquaroli, S., Citterio, B., Di Cesare, A., Amiri, M., Manti, A., Vuotto, C. and Biavasco, F. (2014). "Role of daptomycin in the induction and persistence of the viable but non-culturable state of *Staphylococcus aureus* biofilms''. *Pathogens*, 3(3), 759-768.

Peterson, E. and Kaur, P. (2018). "Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens''. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928.

Rampadarath, S., Bandhoa, K., Puchooa, D., Jeewon, R. and Bal, S. (2017). "Early bacterial biofilm colonizers in the coastal waters of Mauritius''. *Electronic Journal of Biotechnology*, 29, 13-21.

Ribeiro, M. ve Simões, M. (2019). “Sideroforların antimikrobiyal ve terapötik potansiyelindeki ilerlemeler’’. *Environ Chem Lett*, 17, 1485–1494. https://doi.org/10.1007/s10311-019-00887-9.

Roy, P.H. (1999). “Horizontal transfer of genes in bacteria.” *Microbiol. Today*, 26, 168–170.

Sağlam, H. S., Demiray, V. ve Karabay, O. (2012). “Üriner Enfeksiyonlarda Toplum Kökenli *Escherichia coli*' nin Yeri ve Gelişen Antibiyotik Direnci’’. *Nobel Medicus Journal*, 8(1).

Sanders, C. C. and Sanders Jr, W. E. (1992). “β-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact’’. *Clinical Infectious Diseases*, *15*(5), 824-839.

Sankar Ganesh, P. and Ravishankar Rai, V. (2018). “Alternative strategies to regulate quorum sensing and biofilm formation of pathogenic Pseudomonas by quorum sensing inhibitors of diverse origins’’. *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*, 33-61.

Saygı, Ş., Battal, D. ve Şahin, N. (2012). “Çevre ve insan sağlığı yönünden ilaç atıklarının önemi’’. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16(2), 82-90.

Sengupta, S. and Chattopadhyay, M. (2012). “Antibiotic Resistance of Bacteria: A global challenge’’. *Resonance*, 17(2), 177-797.

Sivri, N., Balci, M., Durmus, T., Seker, D. Z. and Balkis, N. (2012). “Analysis of enteric bacteria distribution in the gulf of Gemlik (Marmara sea) by means of gıs’’. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21(11), 3224-3232.

Soto, S. M., Smithson, A., Martinez, J. A., Horcajada, J. P., Mensa, J. and Vila, J. (2007). “Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with

prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance''. *The Journal of Urology*, 177(1), 365-368.

Stewart, J. B., Freyer, C., Elson, J. L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A. and Larsson, N. G. (2008). "Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA''. *PLoS Biology*, 6(1), 10.

Su, S., Li, C., Yang, J., Xu, Q., Qiu, Z., Xue, B. and Shen, Z. (2020). "Distribution of antibiotic resistance genes in three different natural water bodies-a lake, river and sea''. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(2), 552.

Su, H.C., Ying, G.G., Tao, R., Zhang, R.Q., Fogarty, L.R. and Kolpin, D.W. (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.

Şahin, R. (2007). *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

Şardan, Y. Ç. (2002). "Enterokoklarda Direnç Sorunu; Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar''. Ö. Uzun (ed.) içinde İnfeksiyon Hastalıkları Serisi. (s.10-16).Bilimsel Tıp Yayınevi: Ankara.

Şenol, A., Balın, Ş. Ö. (2021). "Yoğun Bakım Ünitelerinde Sık Görülen Enfeksiyonlar, Gram-negatif Mikroorganizmalar, Antibiyotik Direnci''. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(1), 35-39.

Takcı, H., Toplar, S. (2023). "Kilis Yüzeysel Su Kaynaklarından İzole Edilen Fekal Streptokokların Antibiyotik Hassasiyet Profilleri''. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 11(2), 638-643.

Takcı, H., Bakırhan, P. B., Kaptanoğlu, M. ve Genç, S. (2019). "Kilis Devlet Hastanesi Kanalizasyon Suyundan İzole Edilen Enterobacteriaceae Suşlarının Antibiyotik Dirençlilik Profilleri''. *International Journal of Advances in Engineering Neuro Sciences*, 31(3), 261-266.

Tao, R., Ying, G. G., Su, H. C., Zhou, H. W. and Sidhu, J. P. (2010). "Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China''. *Environmental Pollution*, 158(6), 2101-2109.

Taşdemir, C. (2009). Toplum ve Hastane Kaynaklı Enfeksiyonlardan İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Fenotiplerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, İstanbul

Taylor, M. W., Radax R., Steger D. and Wagner M. (2007). "Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology and biotechnological potential''. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* 71(2), 295–347. https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-06

Telli, A. E. ve Doğruer, Y. (2013). "Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenlerde Patojeniteye Genel Bakış''. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 51-59.

Terzi, E. (2013). Alabalık İşletmelerinden İzole Edilen Bakterilerde Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Balıkçılık Teknolojisi Anabilim Dalı, Trabzon.

Tunçer, İ. ve Bizsel, N. (2019). "Doğu Akdeniz sedimanlarından izole edilen bakterilerin filogenetik çeşitliliği ve antibiyotik dirençliliği''. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 8(2), 151-169.

Ture, M. and Alp, H. (2016). “Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey’’. *Journal of Veterinary Research*, 60(2), 141-146, doi: 10.1515/jvetres-2016-0020

Tursun, M. F. (2018). Non-Fermantatif Gram Negatif Bakterilerde Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

Türetken, K. F. (2009). Gökçeada Civarı (Kuzey Ege denizi) Derin Deniz Balıklarının Nitel-Nicel Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Temel Bilimler Anabilim Dalı, İstanbul.

Türkoğlu, K. and Öktem, Y. E. (2008). “Studies on the symptomatology and the biochemical characteristics of bacterial Mulberry blight cause (*Pseudomonas mori* (Boyer and Lambert) Stevens)’’. *Plant Protection Bulletin*, 13(1).

Todar, K. (2004). “Todar's online textbook of bacteriology’’. Erişim: 10 Ekim 2023, http_textbookofbacteriology.net)

Topal, M., Gülşad, U. ve Erdal, Ö. (2012). “Antibiyotiklerin kaynakları ve çevresel etkileri’’. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1(2), 137-152.

Tosun, M., Taylan, G. ve Zorba, N. N. (2021). “Çanakkale Bölgesinden Alınan Midye ve Deniz Suyu Örneklerinin Mikrobiyolojik Kalitelerinin Belirlenmesi’’. *Gıda,* 46(4), 949-958.

Ullah, R., Yasir, M., Bibi, F., Abujamel, T. S., Hashem, A. M., Sohrab, S. S. and Azhar, E. I. (2019). “Taxonomic Diversity of antimicrobial-resistant bacteria genes in the Red Sea coast’’. *Science of The Total Environment*, 677, 474-483.

Upadhyaya, P.M.G., Ravikumar, K.L. and Umapathy, B. L. (2009). “Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen’’. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 27, 301-305.

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P. and Laxminarayan, R. (2015). "Global trends in antimicrobial use in food animals''. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654.

Vignesh, S., Muthukumar, K. and James, R. A. (2012). "Antibiotic resistant pathogens versus human impacts: a study from three eco-regions of the Chennai coast, southern India''. *Marine Pollution Bulletin*, 64(4), 790-800.

Vila, J. and Soto, S. M. (2012). "Salicylate increases the expression of marA and reduces in vitro biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* by decreasing type 1 fimbriae expression''. *Virulence*, 3(3), 280-285.

Vincent, N.C., Veronica, J.U., Stella, I.S., Etinosa, O.I. and Anthony, I.O. (2010). "Multidrug resistance and plasmid patterns of *Escherichia coli* O157 and other *E. coli* isolated from Diarrhoeal stools and surface waters from some selected sources in Zaria, Nigeria''. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7, 3831-3841. doi: 10.3390/ijerph7103831.

Vural, H.C. ve Akçın, A. "İzmit körfezinden izole edilen *Escherichia coli*'lerde r plazmidlerine bağlı bulaşıcı tipte antibiyotik direnç özelliğinin belirlenmesi''. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1).

Wang, Y., Lu, J., Mao, L., Li, J., Yuan, Z., Bond, P. L. and Guo, J. (2019). "Antiepileptic Drug Carbamazepine Promotes Horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera''. *The ISME Journal*, 13(2), 509-522.

Watkinson, A.J., Micalizzi, G.B., Bates, J.B. and Costanzo, S.D. (2017). "Occurrence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in waterways of Southeast Queensland, Australia''. *Medical Research Archives*, 5(9), 1-16.

Weigel, L. M., Donlan, R. M., Shin, D. H., Jensen, B., Clark, N. C., McDougal, L. K. And Patel, J. B. (2007). "High-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial biofilm''. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *51*(1), 231-238.

Wingender, J. and Flemming, H. C. (2011). "Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens''. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214(6), 417-423.

Yamantürk Çelik, P. ve Büget, B. (2015). "Geçmişten Günümüze Genel Eğitimi Kullanımı Pratikte Antibiyotik Antibiyotikler''. *Ankem Dergisi*,66.

Yanez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J. and Martínez-Murcia, A. J. (2003). "Phylogenetic analysis of members of the genus Aeromonas based on gyrB gene sequences''. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 875-883.

Yıng, Q.l., Kemme, M. and Sımon, Sr. (1996). "Alginate, the slime exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*, binds human leukocyte elastase, retards inhibition by alpha 1-proteinase inhibitor, and accelerates inhibition by secretory leukoprotease inhibitor''. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15 (2), 283-291.