



Atık Sulardan İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Merve CORA¹, İnci DURUKAN², Gülşen ULUÇAM ATAY³, Ali Osman KILIÇ⁴

^{1,2,4}Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, Türkiye, ³ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler Ve Teknikler Bölümü, Rize, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-5956-9133>, ²<https://orcid.org/0000-0002-9789-4738>, ³<https://orcid.org/0000-0002-8524-9096>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-5506-0866>

✉: mcora@ktu.edu.tr

ÖZET

İnsan ve hayvanlardaki enfeksiyonların tedavisinde ve endüstride çeşitli amaçlarla yer alan antibiyotiklerin kullanımının artması çevresel ortamlarda antibiyotik dirençli bakterilerin ve direnç genlerinin daha sık tespit edilmesine neden olmaktadır. Su kenarındaki yerleşim yerlerinde atık sular arıtma işleminden sonra yakındaki sulara boşaltılmaktadır. Bunun sonucunda, sular patojen ve dirençli mikroorganizmalarla kirlenerek insan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bu çalışmada, Trabzon şehir merkezinden alınan atık su örneklerinden Gram negatif bakteriler izole edilerek antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Atık sulardan alınan örnekler triptik soy agar ve eozin metilen mavisi besiyerlerine ekim yapılarak üreyen mikroorganizmalar analiz edilmiştir. Çalışmaya Gram negatif 36 bakteri izolatı dahil edilmiştir. Bakterilerdeki direnç disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Antimikrobiyal direnç saptanan mikroorganizmalar MALDI-TOF MS ve BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi ile tanımlanarak otomatize sistem ile direnç profilleri çıkarılmıştır. Dirençli bakterilerde *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*, *integraz 1*, *integraz 2* ve *integron* varlığı PZR yöntemi ile araştırılarak bu genlerin aktarım mekanizmaları transformasyon ve konjugasyon deneyleri ile incelenmiştir. Ayrıca, antibiyotiklere dirençli izolatlarda Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üretimi çift disk sinerji testi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada 14 izolatta antibiyotik direnci olduğu, bir izolatta GSBL ve *bla_{OXA}* varlığı tespit edilmiştir. İki izolatın plazmit taşıdığı ve bir izolatın ampisilin direncinin konjugatif plazmitle, kanamisin direncinin ise konjugatif olmayan bir plazmitle transforme olduğu belirlenmiştir. Direnç taşıyan bazı izolatlarda plazmit varlığının tespit edilmesi; antibiyotik direncinin atık sularda bulunan bakteriler arasında yayılabileceğini ve canlılar üzerinde olumsuz etkiler olabileceğini düşündürmektedir.

Mikrobiyoloji

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 07.02.2023

Kabul Tarihi : 06.07.2023

Anahtar Kelimeler

Antibiyotik direnci

PZR

Bakteriyel transformasyon

Antibiotic Resistance Profiles of Gram Negative Bacteria Isolated From Wastewater

ABSTRACT

Aims: The use of antibiotics, which have been used in the treatment of infections, has been increasing. Therefore, the occurrence of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes, both in infections and in the environment, is also increasing. In settlements near the water, wastewater is commonly collected in certain centers and discharged into nearby waters after treatment. As a result, the waters are polluted with pathogenic and resistant microorganisms, posing a great danger to human health. In this study, it was aimed at determining the antibiotic resistance profiles of Gram-negative bacteria isolated from wastewater samples taken from Trabzon City Center. **Material and methods:** Samples taken from wastewater were inoculated on tryptic soy agar and eosin methylene blue media to analyze the growing microorganisms. Thirty-six Gram-negative bacteria were included in the study. Resistance in bacteria was investigated by the disk diffusion method.

Microbiology

Research Article

Article History

Received : 07.02.2023

Accepted : 06.07.2023

Keywords

Antibiotic resistance

PCR

Bacterial transformation

Microorganisms with resistance were identified with the MALDI-TOF MS and BD Phoenix automated microbiology systems, and resistance profiles were obtained with the automated systems. The presence of *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*OXA, *bla*CTX-M, integrase 1, integrase 2, and integron in resistant bacteria was investigated by the PCR method, and the transmission mechanisms of these genes were examined by transformation and conjugation experiments. In addition, the production of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) in isolates resistant to antibiotics was investigated by a double-disc synergy test. Results: As a result, in the current study, antibiotic resistance was found in 14 of 36 isolates. The presence of ESBL and *bla*oxa was shown to be isolated. It was determined that two isolates had plasmids. It was also shown that ampicillin resistance in one isolate was transformed with a conjugative plasmid, and kanamycin resistance was transformed with a non-conjugative plasmid. Conclusions: The detection of the presence of plasmids in some isolates carrying resistance suggests that antibiotic resistance may spread among bacteria in wastewater and may have adverse effects on living things.

- Atıf İçin:** Cora, M., Durukan, İ., Uluçam-Atay, G & Kılıç, AS (2024). Atık sularından izole edilen Gram negatif bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 27 (3), 520-527. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1248203>.
- To Cite:** Cora, M., Durukan, İ., Uluçam-Atay, G & Kılıç, AS (2024). Antibiotic resistance profiles of gram negative bacteria isolated from wastewater. *KSU J. Agric Nat* 27 (3), 520-527. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1248203>.

GİRİŞ

Pek çok bakteri türünün, insanlar antibiyotikleri üretmeye başlamadan önce antibiyotikleri tolere etme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Antibiyotiklerin yakın sayılabilecek bir zaman önce klinik ajanlar olarak piyasaya sürülmesi, antibiyotik direncinin evrimini ve antibiyotik direnç genlerinin yatay transferini tetiklemiştir. Bu durum bakteriyel enfeksiyonları önlemeyi ve tedavi etmeyi giderek zorlaştırmaktadır (Larsson & Flach, 2022). Antibiyotiklerin yanlış kullanımının yanında, dışkı kalıntılarıyla yoğun şekilde kirlenmiş yüzey sularına maruz kalınması (kirli deniz sularının yutulması gibi) insan mikrobiyotasının değişerek antibiyotik dirençli bakterilerin görülmesine neden olmaktadır (Huemer ve ark., 2020; Larsson & Flach, 2022). Böylece insanlar da bir nevi antibiyotik direnç genlerinin kaynağı konumuna gelerek bu direncin atık su sistemi ile çevreye yayılmasına sebep olmaktadır (Rodriguez-Mozaz ve ark., 2015).

Antibiyotiklerin hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yıllardır artan miktarda tüketilmesi, nehirler, hastane akıntıları, limanlar ve göller gibi birçok çevresel ortamda antibiyotik dirençli bakteriler ve antibiyotik direnç genlerinin daha sık tespit edilmesine neden olmaktadır (Xu ve ark., 2015). Dünyanın her yerinde antibiyotik direnci ve direnç genlerinin yayılımı ile ilgili yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Yang ve ark., 2014).

Son yıllarda antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin oranı sadece klinik ortamlarda değil, çevresel örneklerde de giderek artmaktadır (Tarek & Garner,

2022). Sucul ortamlar, hastane atıkları, endüstriler ve çiftçilik gibi birçok farklı kaynaktan gelebilen antibiyotiklere dirençli bakterilerin yaygınlığı sürekli artmaktadır (Baquero ve ark., 2008; Bouki ve ark., 2013). Atık suya salınan çok sayıda antibiyotik veya bunların aktif metabolitleri, bakteri popülasyonları üzerindeki seçici baskıyı artırarak dirençli suşların seçilmesine ve geniş çapta yayılmasına olanak sağlamaktadır (Davies & Davies, 2010; Bungau ve ark., 2018).

Atık su arıtma tesisleri (AAT), farklı kökenlerden gelen dirençli bakterilerin önemli bir toplayıcısı ve antibiyotik direncini kodlayan genlerin genetik değişiminin gerçekleştiği odak noktası olarak rapor edilmiştir. Gerçekten de, bu tesislerdeki yüksek bakteri konsantrasyonu ve çeşitliliği nedeniyle; üreme, doğal transformasyon, transdüksiyon ve transpozisyon yoluyla yatay gen transferi, çeşitli kökenlerden antibiyotik direncini kodlayan genlerin paylaşımını ve yayılmasını büyük ölçüde artırmaktadır (Lepuschitz ve ark., 2019). Dünya çapında; AAT'lerin çoğu, mikro kirleticilerin tamamen ortadan kaldırılmasını her zaman sağlayamamaktadır. Bu nedenle, antibiyotikler, antibiyotiğe dirençli bakteriler ve antibiyotik direnç genleri topraklara, yüzey sularına ve içme suyu girişlerine bulaşabilmektedir. Dahası, arıtılmış atık su çoğunlukla nehirlere deşarj edilmekte ve bu da dirençli mikroorganizmaların ve antibiyotik direncini kodlayan genlerin uzun mesafeli bir yolculukla tarımsal topraklara ulaşmasına ve nihayetinde insan ve hayvan gıdalarında bulunmasına neden

olmaktadır (Gatica & Cytryn, 2013).

Antibiyotiğe dirençli *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonades* üyeleri atık su kaynaklarında tespit edilmiştir. Plazmitler, transpozonlar, bakteriyofajlar, integronlar ve bunların kombinasyonları olan mobil genetik elementler vasıtasıyla antibiyotik direnç genlerinin farklı mikroorganizmalar arasında horizontal gen transferi olmaktadır. Bunun sonucunda atık sular antibiyotik direnç genlerinin çevredeki büyüklüğü ve yayılımını belirgin bir şekilde değiştirmektedir (Yang ve ark., 2014).

Deniz ve su kenarındaki yerleşim yerlerinde atık sular yaygın olarak belirli merkezlerde toplanarak arıtma işleminden sonra deniz, nehir gibi yakındaki sulara boşaltılmaktadır. Bunun sonucunda, sular patojen ve dirençli mikroorganizmalarla kirlenerek insan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Akkan ve ark., 2011).

Bu çalışmada, Trabzon şehir merkezinden alınan atık su örneklerinden Gram negatif bakterilerin izole edilerek antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üreten Gram negatif bakterilerin arıtma prosedürlerine sahip bir kentsel atık su tesisinde dağılımının incelenerek, antibiyotik direncini kodlayan genleri ve genetik elementlerinin (integronlar ve plazmitler) araştırılması, bu genetik elementlerin aktarım mekanizmalarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Örnek Alınması ve Bakterilerin İzolasyonu

Atık su örnekleri Haziran 2015'te, Pazarkapı Atık Su Ön Arıtma Tesisi ve Kemer kaya Mahallesi Maraş Caddesi Bahar Sokağı logar kapağı olmak üzere Trabzon ilinin iki ayrı noktasından toplanmıştır. Toplanan atık sular steril etiketlenmiş polietilenli kaplara aktarılarak soğuk zincirde laboratuvara transfer edilmiştir. Örneklerin bir kısmı çalışmaya alınırken, diğer kısmı örneklerin korunabilmesi için toplama işleminden hemen sonra dondurulmuştur. Bu işlem için her bir atık su örneğinden 20 mL alınarak 50 mL falkon tüplerine dağıtıldı ve %15 gliserol ile saklama yapılmıştır. Her örnekten ikişer tüp -80°C'de stoklanmıştır.

Her bir atıksu örneğinden 10^{-7} 'ye kadar dilüsyonlar hazırlandı ve 10^{-3} - 10^{-7} dilüsyonlardan ikişer adet triptik soy agar (TSA, Becton, Dickinson and Company, ABD), eozin metilen mavisi (EMB, Sigma-Aldrich, Almanya) besiyerlerine yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmış ve 37°C'de aerobik koşullarda inkübe edilmiştir (Popova ve ark., 2012, Khorshidtalab, 2016). Besiyerlerinde birbirinden farklı koloni morfolojisine sahip olan izolatlar seçilerek tek koloni ekimi ile saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan bakterilerden gram boyama sonucu, Gram negatif olduğu belirlenen ve klasik yöntemlerle tanımlanmış ve *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., türleri ve *Enterobacteriaceae* ailesinden olan 36 bakteri çalışmaya dahil edilmiştir.

Bakterilerin Tanımlanması ve Direnç Profillerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemler ile Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen ve klasik yöntemlerle tanımlanmış 36 Gram negatif bakterinin; Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre belirlenen antibiyotikler ile antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Mueller Hinton agar (MHA, Becton, Dickinson and Company, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar CLSI standartlarına göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2009). Antibiyotiklerden dört veya daha fazlasına dirençli olduğu belirlenen 14 izolat Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, ABD) ve BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi (Becton Dickenson, ABD) ile tanımlanmıştır. Tanımlanan türlerin antibiyotik duyarlılık profilleri BD Phoenix otomatize sistem (Becton Dickenson, ABD) ile değerlendirilmiştir.

Otomatize sistem ile GSBL ürettiği tespit edilen izolatlarla doğrulama amacıyla çift disk sinerji testi uygulanmıştır. Testin kalite kontrolü için *Escherichia coli* ATCC 25922 referans suşu kullanılmıştır.

Antibiyotiklerden dört veya daha fazlasına dirençli olduğu belirlenen 14 izolattan fenol-kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilerek, izolatlarda *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CTX-M}, integraz 1, integraz 2 ve integron varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. PZR'da kullanılan primerler Çizelge 1'de gösterilmiştir. PZR reaksiyonu 5x FIREPol® Master Mix 5 µL (Solis Biodyne, Estonya), primer forward (10 pmol µL⁻¹) 0.6 µL, primer reverse (10 pmol µL⁻¹) 0.6 µL, template 2 µL, double distilled water 11.8 µL, toplam 20 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir gen için primerlerin temin edildiği kaynaklar referans alınarak, ayrı PZR reaksiyon koşulları uygulanmıştır. PZR sonucu pozitif bulunan örnekler Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizileme sonuçları Chromas Pro Programı (Sürüm 1.7.5) ile analiz edilmiş ve her birinin benzerliği kontrol etmek için ClustalW2 DNA Veri Bankasına tanıtılmıştır.

Plazmit İzolasyonu, Transformasyon ve Konjugasyon Deneyleleri

Çalışmaya dahil edilen 14 izolatla plazmit varlığı EZNA Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-tek Inc, ABD) kullanılarak araştırılmıştır. İzolatlardaki direncin plazmit ile aktarılma mekanizması transformasyon

ve konjugasyon deneyleri ile belirlenmiştir.

Transformasyon, kompetan hücre olarak *E. coli* JM109 kullanılarak NEB PCR Cloning Kit (Biolabs Inc., New England) ve QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN Inc., İngiltere) ile firmaların talimatı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bakteriden izole edilen plazmit kompetan hücreye transform edilmiştir. Transformantlar seçici besiyerlerine ekilmiştir. Direnç genlerini alarak seçici besiyerinde üreyen bakterilerden yeniden plazmit izolasyonu ve PZR yapılarak doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Plazmit DNA'nın konjugasyon ile aktarılma işlemi

broth mating (sıvıda çiftleşme) prensibine göre yapılmıştır (Ike ve ark., 1998). Verici hücre olarak GSBL içeren izolatlar, alıcı hücre olarak *E. coli* HB101 ve *E. coli* DH5α izolatları kullanılmıştır. Kontrol için verici hücre olarak *E. coli* KD39, alıcı hücre olarak *E. coli* C600 kullanılmıştır. Transkonjugantlar uygun antibiyotikleri içeren LB agar besiyerleri kullanılarak seçilmiştir. Primer seleksiyon plaklarında üreyen koloniler uygun antibiyotikleri içeren LB agar plaklarına replika ekim yapılarak doğrulama gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan primer listesi

Table 1. List of the primers used in the study

Primerin Adı Primers	Sekans (5'→3') Sequence (5'→3')	Referans no. Reference no.
SHV-F	TCAGCGAAAAACACCTTG	(Dehshiri ve ark., 2018)
SHV-R	TCCCGCAGATAAATCACC	(Dehshiri ve ark., 2018)
TEM-F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	(Tariq ve ark., 2012)
TEM-R	CCAATGCTTAATCAGTGAGG	(Tariq ve ark., 2012)
OXA-F	GTCTTTCGAGTACGGCATT	(Yan ve ark., 2006)
OXA-R	ATTTTCTTAGCGGCAACTTAC	(Yan ve ark., 2006)
CTX-M-	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	(Edelstein ve ark., 2003)
CTX-M-	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	(Edelstein ve ark., 2003)
IntI-1F	GGTCAAGGATCTGGATTTGG	(Machado ve ark., 2005)
IntI-1R	ACATGCGTGTAATCATCGTC	(Machado ve ark., 2005)
IntI-2F	CACGGATATGCGACAAAAGGT	(Machado ve ark., 2005)
IntI-2R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	(Machado ve ark., 2005)
5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	(Machado ve ark., 2005)
3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA	(Machado ve ark., 2005)

BULGULAR

Atık sudan izole edilen Gram negatif bakterilerdeki antibiyotik direnci Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, ampisin, amoksisilin-klavulonat direnci 11/36; piperasilin direnci 9/36; aztreonam direnci 8/36; gentamisin, siprofloksasin, imipenem, sefepim, sefotaksim direnci 5/36; seftazidim, sefoksitin direnci 4/36 izolatta tespit edilmiştir. Dört ve üzeri antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlenen 14 izolat MALDI-TOF MS ve BD Phoenix otomatize sistem ile *Pseudomonas aeruginosa* (2/14), *E. coli* (1/14), *Stenotrophomonas maltophilia* (3/14), *Citrobacter braakii* (1/14), *Pseudomonas putida* (1/14), *Pseudomonas viridiflava* (1/14), *Shewanella putrefaciens* (1/14), *Acinetobacter baumannii* (1/14), *Achromobacter xylosoxidans* (2/14), *Pseudomonas nitroreducens* (1/14) olarak tanımlanmıştır (Çizelge 2). Tanımlanan bakteriler ve otomatize sistemden elde edilen antibiyotik duyarlılık profilleri Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Tanımlanan 14 izolattan sadece *C. braakii* olarak tanımlanan izolatta GSBL fenotipi tespit edilmiştir. GSBL varlığı, çift disk sinerji testi ile doğrulanmıştır. İzolatta yalnızca *bla_{oxa}* varlığı tespit edilmiş ve DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada yer alan

diğer 13 izolatta antibiyotik direnci fenotipik olarak görülmesine rağmen, genotipik olarak tespit edilmemiştir. Ayrıca çalışmaya dahil edilen izolatların hiçbirinde integron varlığı görülmemiştir.

Çalışmada yer alan 14 izolatta plazmit varlığı araştırılmıştır. *E. coli* ve *C. braakii* izolatlarının plazmit taşıdığı belirlenmiştir. *C. braakii* izolatında büyüklükleri 3-60 kb arasında olan en az 3-4 tip plazmit bulunmuştur. İzolatta bulunan ampisilin direncinin konjugatif plazmitle *E. coli* HB101 ve DH5α suşlarına aktarıldığı, kanamisin direncinin non konjugatif bir plazmitle *E. coli* JM109 suşuna transforme olduğu belirlenmiştir. Ayrıca transformant ve transkonjugatlarda ampisilin ve kanamisin direncinin aktarıldığı doğrulanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) günümüzde insan ve hayvan sağlığını tehdit eden en büyük sorunlardan birinin antibiyotik direnci olduğunu bildirmiştir. Günümüzde antibiyotiklere dirençli bakteriler tarafından meydana gelen enfeksiyon hastalıklarının sıklığında artış tespit edilmektedir. Bu husus enfeksiyon hastalıklarının tedavisini güçleştirmekte ve buna bağlı komplikasyonların meydana gelmesine

neden olmaktadır. Son zamanlarda yapılan ve belediyelerin atık su sistemleri ve kanalizasyon sistemlerini hedef alan çalışmalarda antibiyotiğe dirençli bakteriler ve dirençle ilişkili genetik elemanların alınan örneklerde fazla miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Tarek & Garner, 2022).

Antibiyotiğe dirençli patojenler ve antibiyotik dirençli genler içeren fekal kirliliğin çevresel bulaşma yolları, antibiyotik direncinin yayılmasına katkıda bulunması muhtemel bir faktör olarak tanımlanmıştır (Tarek & Garner, 2022).

Çizelge 2. Bakterilerin MALDI-TOF MS ve ve BD Phoenix otomatize sistem ile tanımlanması, ve BD Phoenix antibiyogram sonuçları

Table 2. Identification of bacteria with MALDI-TOF MS and BD Phoenix automated system, and BD Phoenix antibiogram results

MALDI-Toff MS Tanımlama MALDI-Toff MS Identification	Antibiogram Sonuçları (Results of Antibiogram)																	
	AK	AMC	AMP	AZT	CP	CAZ	CRO	CXM	CIP	ETP	CL	GM	IPM	MEM	NET	PRL	TZP	SXT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	-	-	-	S	S	-	-	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-
<i>Escherichia coli</i>	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S	-	R	R	R
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>Citrobacter braakii</i>	S	R	R	R	S	R	R	-	S	S	-	S	S	S	-	R	I	S
<i>Pseudomonas putida</i>	S	-	-	R	S	S	-	-	S	-	-	S	S	S	-	S	S	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	-	-	I	S	S	-	-	S	-	-	S	S	S	-	S	S	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	S	-	-	S	S	S	-	-	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	S	-	-	-	S	I	-	-	S	-	S	S	S	S	R	-	-	S
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	I	-	-	R	S	S	-	-	R	-	S	R	S	S	R	S	S	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	R	-	-	R	R	S	-	-	R	-	S	R	I	S	R	S	S	-
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	S	-	-	R	S	S	-	-	R	-	S	S	S	I	S	S	S	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	S	-	-	R	S	S	-	-	S	-	S	S	S	S	S	S	S	-

AK: Amikasin, AMP: Ampisilin, AMC: Amoksisilin- Klavulonat, AZT: Aztreonam, CP: Sefepim, CAZ: Seftazidim, CRO: Seftriakson, CXM: Sefuroksim-Sodyum, CIP: Siprofloksasin, ETP: Ertapenem, CL: Kolistin, GM: Gentamisin, IPM: İmipenem, MEM: Meropenem, NET: Netilmisin, PRL: Piperasilin, TZP: Piperasilin-Tazobaktam, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, S: Duyarlı, R: Dirençli, I:Orta Duyarlı, -: Çalışılmadı.

Yapılan bu çalışmaya dahil edilen Gram negatif bakterilerden iki tanesi MALDI-TOF MS ile *Achromobacter xylosoxidans* olarak tanımlandı. *A. xylosoxidans* katalaz pozitif, oksidaz-pozitif ve nonfermentatif Gram negatif basildir. Nonfermentatif Gram negatif basiller ile benzer özelliklere sahiptir ve birbirlerinden ayırt edilmesi zor çevresel bir patojendir. *A. xylosoxidans*'lar birçok ilaca dirençli fırsatçı bakterilerdir. Çalışmada izole edilen *A. xylosoxidans* izolatlarından biri dört diğeri altı antibiyotiğe dirençlidir. Nakamoto ve ark. (2017) çalışmasında akarsu, gölet ve evsel atıklardan toplanan numunelerden dokuz *A. xylosoxidans* izole

edilmiş ve beş izolatın birden fazla aminoglikozit sınıfı antibiyotiğe karşı artan direnç gösterdiği belirlenmiştir. Amoureux ve ark. yaptığı çalışmada hastaneden 33 izolat, evsel alanlardan dokuz ve açık alanlardan sekiz izolat olmak üzere toplam 50 *A. xylosoxidans* izolatı saptanmıştır. İzolatların 49'u siprofloksasine dirençli bulunmuştur (Amoureux ve ark., 2013). Yapılan çalışmada, aztreonam ve siprofloksasine dirençli bulunan izolatların aminoglikozitlerden gentamisin ve netilmisine dirençli olduğu saptanmıştır.

Çalışmada yer alan izolatlardan bir tanesi *C. braakii* olarak tanımlanmıştır. *C. braakii* su, toprak ve

gıdalarda yaygın olarak bulunan Gram negatif, fakültatif anaerobik ve hareketli bir basildir. *Citrobacter* türleri, ciddi nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan ve yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlara dirençli mikroorganizmalardır. Aminoglikozidler, florokinolonlar, karbapenemler, sefepim ve sefpirom gibi birçok üçüncü ve dördüncü jenerasyon sefalosporinler, *C. braakii* ile ilişkili enfeksiyonları tedavi etmek için tercih edilen ilaçlardır. Fakat penisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç gösterirler (Nayar ve ark., 2014; Trivedi ve ark., 2015). Çalışmada tespit edilen *C. braakii* izolatının birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, GSBL ürettiği ve *bla_{oxa}* içerdiği tespit edilmiştir. Bu izolatın aynı zamanda içerdiği plazmitler vasıtasıyla ampisilin direncini konjugasyon ile aktarabildiği gösterilmiştir.

Çin'de penisilin üretimi yapılan bir tesisin atık suyundan ve atık suyun döküldüğü nehirde izole edilen bakteri profilinin yapılan bu çalışmada izole edilen bakteri profili ile benzer olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada üretim tesisinin atık suyundan izole edilen 179 bakterinin 31'inde ve atık suyun boşaltıldığı nehrin ağız kısmına yakın yerinden izole edilen 163 bakterinin 18'inde *bla_{TEM}* tespit edilmiştir (Li ve ark., 2009). Slovakya'da yapılan bir çalışmada belediye atık su arıtma tesisinden izole edilen 109 *E.coli* izolatının %26'sında GSBL tespit edilmiştir. GSBL ürettiği tespit edilen izolatların yaklaşık yarısında CTX-M geni bulunurken, sadece bir izolatta IMP geni ve integron 1 birlikte tespit edilmiştir (Cornejova ve ark., 2015). Bu çalışmada Trabzon ili atık sularından elde edilen 36 Gram negatif bakteriden sadece birinin GSBL ürettiği ve *bla_{oxa}* geni taşıdığı tespit edilmiştir. Trabzon ilinin farklı bölgelerindeki atık su arıtma tesislerinden numune alınıp atık sudan daha fazla sayıda Gram negatif bakteri izole edilerek yapılacak farklı çalışmalarda, örnek sayısının artmasıyla birlikte antibiyotik dirençli bakteri sayısında artış olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, atık sudan izole edilen bazı bakterilerde direnç genlerinin varlığı ile birlikte antibiyotik direnci tespit edilen izolatların ikisinde plazmit varlığının tespit edilmiştir. Antibiyotik direncinin plazmitler aracılığıyla konjugasyon ve/veya transformasyon yoluyla aktarılabilmesi gösterilmiş olduğundan, antibiyotik direncinin atık sulardaki bakteriler arasında da yayılabileceği ve bu durumun hayvan ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Seyran Sakine NAS ve Mona KHORSHİTHALAB'a katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Bu proje Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2015-5287 proje kodu ile desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

KAYNAKLAR

- Akkan, T., Kaya, A., & Dinçer, S. (2011). Hastane Atık Sularıyla Kontamine Edilen Deniz Suyundan İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Sefalosporin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Düzeyleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41(1), 18-21. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2011.018>.
- Amoureux, L., Bador, J., Fardeheb, S., Mabilille, C., Couchot, C., Massip, C., Salignon, A.L., Berlie, G., Varin, V., & Neuwirth, C. (2013). Detection of *Achromobacter xylosoxidans* in Hospital, Domestic, and Outdoor Environmental Samples and Comparison with Human Clinical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7142-7149. <https://doi.org/10.1128/AEM.02293-13>.
- Baquero, F., Martínez, J.L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>.
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and the fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>.
- Bungau, S., Mirela Tit, D., Fodor, K., Cioca, G., Agop, M., Iovan, C., Nistor Cseppento, D.C., Bumbu, A., & Bustea, C. (2018). Aspects regarding the pharmaceutical waste management in Romania. *Sustainability*, 10, 2788. <https://doi.org/10.3390/su10082788>.
- Clinical Laboratory Standards Institute. (2009). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 19th edition. Supplement M100-S19:Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.
- Cornejova, T., Venglovsky, J., Gregova, G., Kmetova, M., & Kmet, V. (2015). Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* from municipal wastewater. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(3), 447-450. <https://doi.org/10.5604/12321966.1167710>.
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00000-09>.

- doi.org/10.1128/MMBR.00016-10.
- Dehshiri, M., Khoramrooz, S.S., Zoladl, M., Khosravani, S.A., Parhizgari, N., Motazedian, M.H., Jahedi, S., Sharifi, A. (2018). The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 17(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0256-y>.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., & Stratchounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(12), 3724-32. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003>.
- Gatica, J. & Cytryn, E. (2013). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 3529–3538. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1505-4>.
- Huemer, M., Shambat, S.M., Brugger, S.D., & Zinkernagel, A.S. (2020). Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>.
- Ike, Y., Tanimoto, K., Tomita, H., Takeuchi, K., & Fujimoto, S. (1998). Efficient Transfer of the Pheromone-Independent *Enterococcus faecium* Plasmid pMG1 (Gm^r)(65.1 Kilobases) to *Enterococcus* Strains during Broth Mating. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4886-92, <https://doi.org/10.1128/JB.180.18.4886-4892.1998>.
- Khorshidtalab, M. (2016). *Atık Sulardan Litik Bakteriyofaj İzolasyonu ve Karakterizasyonu (Tez no 452525)*. [Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı]. Yükseköğretim Kurulu Ulusal Tez Merkezi.
- Larsson, D.G.J. & Flach, C.F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269, <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.
- Lepuschitz, S., Schill, S., Stoeger A., Pekard-Amenitsch, S., Huhulescu, S., Inreiter, N., Hartl, R., Kerschner, H., Sorschag, S., Springer, B., Brisse, S., Allerberger, F., Mach, R.L., & Ruppitsch, W. (2019). Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Science of The Total Environment*, 662, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.179>.
- Li, D., Yang, M., Hu, J., Zhang, J., Liu, R., Gu, X., Zhang, Y., & Wang, Z. (2009). Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and receiving river. *Environmental Microbiology*, 11(6), 1506-1517. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01878.x>.
- Machado, E., Canto'n, R., Baquero, F., Gala'n, J.C., Rolla'n, A., Peixe, L., & Coque, T.M. (2005). Integron Content of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing 74 *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1823-1829. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005>.
- Nakamoto, S., Sakamoto, M., Sugimura, K., Honmura, Y., Yamamoto, Y., Goda, N., Tamaki, H., & Burioka, N. (2017). Environmental Distribution and Drug Susceptibility of *Achromobacter xylosoxidans* Isolated from Outdoor and Indoor Environments. *Yonago Acta Medica*, 60(1), 67-70.
- Nayar, R., Shukla, I., & Sultan, A. (2014). Epidemiology, Prevalence and Identification of *Citrobacter* Species in Clinical Specimens in a Tertiary Care Hospital in India. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(4), 1-6.
- Popova, A.V., Zhilenkov, E.L., Myakinina, V.P., Krasilnikova, V.M., & Volozhantsev, N.V. (2012). Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 332(1), 40–46.
- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sanchez-Melsio, A., Borrego, C.M., Barcelo, D., & Balcazar, J.L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234-42. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.
- Tarek, M.H. & Garner, E. (2022) A proposed framework for the identification of indicator genes for monitoring antibiotic resistance in wastewater: Insights from metagenomic sequencing. *Science of The Total Environment*, 12158698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158698>.
- Tariq, A., Haque, A., Ali, A., Bashir, S., Habeeb, M.A., Salman, M., & Sarwar, Y. (2012). Molecular profiling of antimicrobial resistance and integron association of multidrug-resistant clinical isolates of *Shigella* species from Faisalabad, Pakistan. *Canadian Journal of Microbiology*, 58(9), 1047-54. <https://doi.org/10.1139/w2012-085>.
- Trivedi, M.K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Mondal, S.C., & Jana, S. (2015). Phenotyping and 16S rDNA Analysis after Biofield Treatment on *Citrobacter braakii*: A Urinary Pathogen. *Journal of Clinical and Medical Genomics*, 3, 129, <https://doi.org/10.4172/2472-128X.1000129>.

- Xu, J., Xu Y, Wang, H., Guo, C., Qui, H., H, Y., Zhang, Y., Li, X., & Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379-85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>.
- Yang, Y., Li, B., Zo S., Fang, H.H.P., & Zhang, T. (2014). Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Research* 62, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.019>.
- Yan, J.J., Hsueh, P.R., Lu, J.J., Chang, F.Y., Ko, W.C., & Wu, J.J. (2006). Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(3), 530–536. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl266>.