

ÇİFTLİK HAYVANLARINDAN İZOLE EDİLEN ESCHERICHIA COLI SUŞLARININ ÇEŞİTLİ METAL BİLEŞİKLERİNE DİRENÇ DURUMU VE R-PLAZMİDLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Ersin İstanbulluoğlu*

Müjgan İzgür**

Studies on Resistance to Various Metal Compounds and R Plasmids in Escherichia coli Isolated From Farm Animals.

Summary: *The mercury and silver resistance of 205 strains of Escherichia coli isolated from faecal specimens of healthy and infected farm animals were determined. Resistance to mercury was found in 15.1 % of the isolates. R plasmids carrying mercury resistance were demonstrated in 64.5 % of the mercury-resistant strains of E. coli. 75 % of E.coli strains were found resistant to 0.10 mM AgNO₃. But, attempts to demonstrate R plasmids carrying silver resistance failed.*

Özet: *Normal ve hastalıklı çiftlik hayvanlarının dışkı örneklerinden izole edilen 205 Escherichia coli suşunun civa ve gümüş'e direnci incelenmiş ve % 15.1'nin civaya dirençli olduğu saptanmıştır. Dirençli suşlardan % 64.5'nin aktarılabilir tip direnç özelliği (RTF-Faktör) taşıdıkları belirlenmiştir. Suşlardan % 75'inin 0.10 mM AgNO₃'a dirençli olduğu saptanmış, ancak bu suşlarda R-plazmid varlığını ortaya koymak için yapılan deneyler olumlu sonuç vermemiştir.*

Giriş

Antibiyotiklere karşı oluşan dirençliliğin yanısıra, R-plazmidler diye tanımlanan ekstra-kromozomal genetik elementler toksik ağır metal iyonlarına karşı da dirençliliği sağlayan genleri taşımaktadırlar. (1,4). *Staphylococcus aureus* türlerinin yapısındaki penisilinaz plazmidleri antimon, arsenik, bizmut, kadmiyum, kurşun, civa ve çinko bileşiklerine karşı da mikroorganizmanın direnç göstermesini sağlamaktadır. N-grubu streptokokların laktoz plazmidleri arsenik

* Doç.Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara-Türkiye.

** Dr. med. vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara-Türkiye.

ve kromium bileşiklerine karşı bakteriye direnç özelliği kazandırmaktadırlar. Enterobakterilerin R-plazmidleri, aynı zamanda, arsenik, kobalt, civa, nikel, gümüş ve tellirium tuzlarına karşı mikroorganizmayı dirençli kılan genleri yapılarında bulundurmaktadırlar(4,5,7). Yine, *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının civa ve tellirium bileşiklerine karşı dirençliliği yapılarındaki plazmidler tarafından sağlanmaktadır (10).

Bu çalışmanın amacı, normal ve hastalıklı çiftlik hayvanlarının dışkılarından izole edilen *E.coli* suşlarının civa ve gümüş iyonlarına karşı dirençliliğini incelemek ve bu özelliğin ne oranda aktarılabilir plazmidler aracılığıyla sağlandığını saptamaktır.

Materyal ve Metot

E.coli suşları: Çalışmada kullanılan 205 adet *E.coli* suşu 1980-1981 yılları arasında Tarım ve Orman Bakanlığı Çifteler Zootečni Araştırma Enstitüsü, Malya D.Ü.Ç., E.B.K. Ankara Mezbahasındaki sağlıklı koyunların (118 adet) dışkı örneklerinden ve A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji teşhis laboratuvarına gönderilen hastalıklı 66 adet tavuk, 23 adet sığır barsak içeriğinden izole edildi.

İzolasyon ve identifikasyon: Steril eküvyonlar ile alınan örneklerden MacConkey (Difco) agar üzerine ekimler yapıldı. 37°C'de 18-24 saatlik inkubasyon süresi sonunda tipik laktoz olumlu görünümdeki kolonilerin identifikasyonu "Norveç üçlü tüp" yönteminden yararlanılarak yapıldı.

Civa dirençlilik deneyleri: Testlerde civa bileşiği olarak $HgCl_3$ kullanıldı. $HgCl_3$ distile suda eritildikten sonra, eriyik membran filtrasyon yöntemi (Millipore-0.45 mikrometre) ile sterilize edildi. Steril solusyondan nutrient agar (Difco) besiyerine belirli konsantrasyonlarda ilave edildi(7).

Gümüş dirençlilik testleri: Deneylerde gümüş bileşiği olarak $AgNO_3$ un 0.01 N asetik asit ile hazırlanmış 0.1 veya 1.0 M luk stok solusyonlarından, otoklavda sterilize edilip 50°C'ye kadar ıtılan trypton maya ekstrakt besiyerleri (NaCl katılmamış) içine son konsantrasyonlar 0.05, 0.10, 0.25 ve 0.50 mM olacak miktarlarda ilave edildi(4).

MIC değerlerinin belirlenmesi: MIC değer hesaplanmalarında kullanılan mikroorganizma suspansiyonları özetle aşağıda açıklanan şekilde hazırlandı. Trypton maya ekstraktı (TYE) buyyonunda üretilen mikroorganizmalar Log üreme devresindeyken 1/10 oranında

sulandırıldı ve bu örneklerin çeşitli konsantrasyonlarından $HgCl_3$ ve $AgNO_3$ içeren nutrient agar (Difco) ve TYE agar besi yerlerine 0.01 ml miktarında ekimler yapıldı. Kontrol olarak bileşiminde metal iyonları bulunmayan besi yerlerine ekildi ve tüm plaklar $36^\circ C$ de 24 saat inkubasyona bırakıldı.

Konjugasyon deneyleri: 12.5 mcg/ml $HgCl_3$ ile 0.10 mM $AgNO_3$ 'a dirençli bulunan *E.coli* suşlarından nalidiksik asite duyarlı olanlar plazmid aktarım deneylerine alındı.

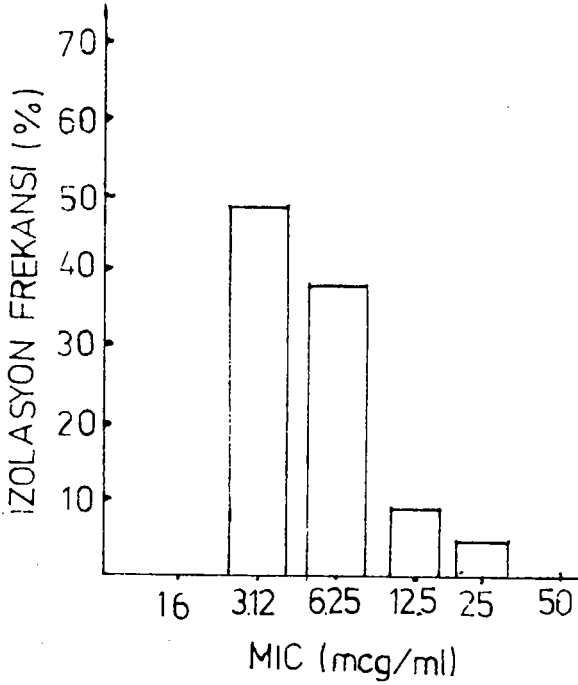
Alıcı suşlar ve test suşları nutrient buyyonlara ayrı ayrı ekilerek 24 saat $37^\circ C$ de inkube edildiler. Daha sonra alıcı suştan 0.5 ml ve verici suştan 0.1 ml 5 ml lik tripticase soy broth (Difco)'a ekim yapıldı. $37^\circ C$ de 18 saat inkubasyona bırakılan tüpler zaman zaman çalkalanarak havalandırılmaları sağlandı. İnkubasyon süresi sonunda, transkonjugat mikroorganizmaları belirlemek için 12.5 mcg/ml $HgCl_3$ + 30 mcg/ml nalidiksik asit içeren nutrient agar ve 0.10 mM $AgNO_3$ + 30 mcg./ml. nalidiksik asit içeren TYE agar besi yerlerine ekimler yapılarak $37^\circ C$ 'de 1 gece inkube edildi. Kontrol olarak alıcı ve verici suşlar, metal tuzlarını tek tek ve nalidiksik asitle beraber içeren nutrient agar ve TYE agar besi yerlerine ekildiler.

Alıcı suşların metal tuzlarına dirençliliklerinin farklı konsantrasyonlarda olabileceği düşünülerek çeşitli alıcı suşlar (*E.coli* Rg488, *E.coli* Rg176, *E.coli* K12 Nal^+lac^- ve *E.coli* J53.2) deneylerin başlangıcında dirençlilik testlerine tabi tutuldu ve tüm alıcı suşlar metal tuzlarına aynı konsantrasyonlarda duyarlı oldukları için, *E.coli* K12 Nal^+lac^- suşu konjugasyon deneylerinde kullanılmak üzere tercih edildi.

Bulgular

Şekil 1 ve Şekil 2'de Hg ve Ag'e dirençli *E.coli* suşlarının dirençlilik özelliklerinin dağılımı gösterilmiştir.

İncelenen *E.coli* suşlarının %6.0'sı 25 mcg/ml, %9.1 i 12.5 mcg/ml, %38.2 si 6.25 mcg/ml ve % 50 si 3.12 mcg/ml civaya dirençli bulundu. Yapılan ön çalışmalar sonucunda 6.25 mcg/ml civa içeren plaklarda üreyen suşlarda plazmid aktarımı görülmediğinden konjugasyon deneylerine 12.5 ve 25 mcg/ml civa klorürlü ortamda üreyen 31 *E.coli* suşu (%15.1) dahil edildi. Konjugasyon deneyleri sonucunda 20 suşun aktarılabilir tip direnç özelliğine (RTF-Faktör) sahip olduğu belirlendi.

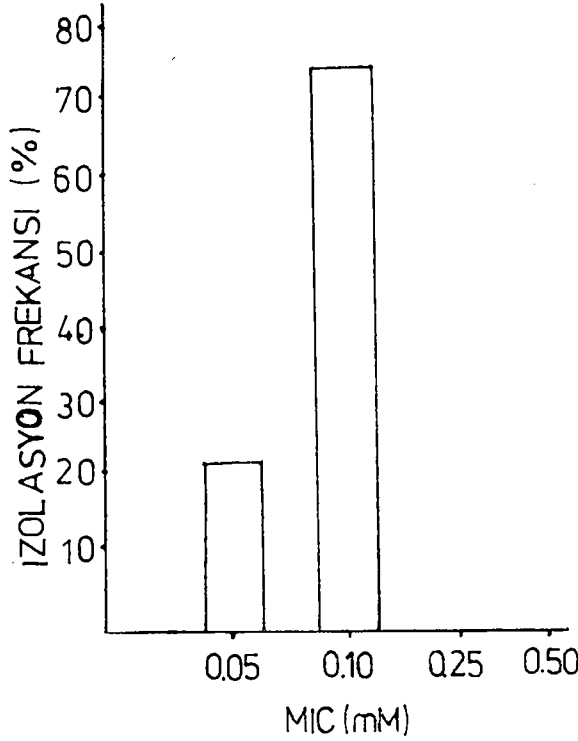


Şekil 1. HgCl₂ e dirençli *E.coli* suşlarının dağılımı.

Şekil 2'de görüldüğü üzere, gümüş dirençliliği bimodal bir dağılım göstermiştir. İncelenen suşlardan %21 i 0.05 mM ve %75 i 0.10 mM AgNO₃a direnç göstermişlerdir. Gümüşe karşı oluşan (0.10 mM da) dirençliliğin plazmid aracılığıyla sağlandığını ortaya koymak için çeşitli alıcı suşlar kullanılarak yapılan konjugasyon deneylerinden olumlu sonuç alınamamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Ağır metaller, bilhassa endüstri bölgelerinde, çevreyi kirleten artıkların belli başlılarından. Toksik ağır metal bileşiklerinin, endüstriyel artıklarda, yüzeysel sularda, nehir, göl ve deniz sedimentlerinde bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (3,9). Son yıllarda ağır metallerin, çevrede (göl, nehir gibi), doğal ve yapay yollarla yapılan artık suların arındırılması işlemleri sırasında, bakteriler tarafından biyolojik transformasyona uğratarak toksik metal bileşiklerine dönüştürüldükleri de açıklanmıştır (2,6,11). Ayrıca, antibiyotik ve metal dirençliliği fenomenlerinin birbirleriyle ilişkisi olduğu bazı araştırmacılar tarafından iddia edilmektedir. Kont-



Şekil 2. AgNO₃ e dirençli *E.coli* suşlarının dağılımı.

rolsüz olarak tedavi ve fizyolojik amaçlarla kullanılan antibiyotiklerden ziyade çevreyi kirleten metal kontaminantların, dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir (7, 8).

Bu çalışmada, büyük şehirlerin çevresinde kurulmuş olan tavuk işletmelerinden alınan örneklerden izole edilen *E.coli* suşlarının civa ve gümüş'e dirençlilik oranı çok daha fazla bulunmuştur. Türkiye'de endüstriyel kirlenmenin fazla olduğu bölgelerdeki antibiyotik ve metal dirençlilik ilişkisinin incelenmesi insan ve hayvan sağlığı yönünden büyük yararlar sağlayacak nitelikte görülmektedir.

McHugh ve ark.(1) ve Annear ve ark.(5) insan orijinli enterobakterilerde görülen gümüş dirençliliğinin aktarılabilir tipte olmadığını bildirmektedirler. Hayvan orijinli *E.coli* suşlarında da aynı özelliğin bulunduğu tarafımızdan saptanmıştır. Tilton ve Rosenberg (12) besi yerlerinin yapısındaki bazı maddeler ile ısı, ışık gibi çevre faktörlerinin gümüşün etkisini nötralize ettiğini açıklamışlardır. In

vitro koşulların nötralize edici etkisinin dirençli suşların seçimiyle, konjugasyon sonuçlarını ne derecede etkili olduğu incelenmesi gereken önemli bir noktadır. Nakahara ve ark.(7) hastahane olgularından izole ettikleri 338 E.coli suşunun dirençlilik özelliğini incelemişler ve % 58.6 oranında bir dirençliliğin varlığını saptamışlardır. Bu çalışmada ise incelenen suşlardan %15.1 i civaya dirençli bulunmuştur. İki araştırma sonucu arasında görülen farklılık gelişmiş endüstri nedeniyle Japonya'da artık olarak doğaya çok fazla miktarda metal bileşiklerinin atılması ve bunların dirençli suşların seleksiyonuna neden olması gerçeğine bağlanabilir.

Literatür

- 1- **Annear, D.I., Mee, B.J. and Bailey, M.** (1976): *Instability and linkage of silver resistance, lactose fermentation and colony structure in Enterobacter cloacae from burn wounds.* J. Clin. Pathol., 29: 441-443.
 - 2- **Barth, E.F., Ettinger, M.B., Salotto, B.V. and McDermott G.N.** (1965): *Summary report on the effect of heavy metals on the biological treatment process.* J. Water Pollut. Control Fed., 37: 86-96.
 - 3- **Farmer, J.G., Swan, D.S. and Baxter, M.S.** (1980): *Records and sources of metal pollutants in a dated Loch Lomond sediments core.* Sci. Total Environ., 16: 131-147.
 - 4- **Hendry, A.T. and Stewart, I.O.** (1979): *Silver resistant Enterobacteriaceae from hospital patients.* Canad. J. Microbiol., 25: 915-921.
 - 5- **McHugh, G.L., Moellering, R.C., Hopkins, C.C. and Swartz M.N** (1975): *Salmonella typhimurium resistant to silver nitrat, chloramphenicol and ampicillin.* Lancet, i: 235-239.
 - 6- **Morozzi, G. and Genci, G.** (1978): *Comparison of the toxicities of some metals and their tetracyanide complexes on the respiration of nonacclimated activated sludges.* Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. B, 167: 478-488.
 - 7- **Nakahara, H., Ishikawa, T., Srail, Y., Kondo, I., Kozukue, H. and Mitsuhashi, S.** (1977): *Mercury resistance and R plasmids in Escherichia coli isolated from clinical lesions in Japan.* Antimicrob. Agent and Chemoth., 11: 999-1003.
 - 8- **Pohl, P.** (1977): *Relationship between antibiotic feeding in animals and emergence of bacterial resistance in man.* J. Antimicrob. Chemoth., 3: 67-72.
 - 9- **Shepard, B.K., McIntosh, A.W., Atchison, G.J. and Nelson, A.P.** (1980): *Aspects of the aquatic chemistry of cadmium and zinc in heavy metal contaminated lake.* Water Res., 14: 1061-1066.
 - 10- **Summers, A.O. and Jacoby, G.A.** (1978): *Plasmid determined resistance to boron and chromium compounds in Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agent Chemoth. 13: 637-640.
 - 11- **Summers, A.O. and Silver, S.** (1978): *Microbial transformation of metals.* Ann. Rev. Microbiol., 32: 637-672.
 - 12- **Tilton, R.C. and Rosenberg, B.** (1978): *Reversal of the silver inhibition of microorganisms by agar.* Appl. Environ. Microbiol., 35: 1116-1120.
- Yazı 29.12.1982 günü alınmıştır.