



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Kilis Yüzeysel Su Kaynaklarından İzole Edilen Fekal Streptokokların Antibiyotik Hassasiyet Profilleri

 Hatice Aysun MERCİMEK TAKCI ^{a,*},  Sevil TOPLAR ^b

^a Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Fakültesi, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis, TÜRKİYE

^b Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Lisansüstü Enstitüsü, Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: mersimek@hotmail.com/aysummercimek@kilis.edu.tr

DOI: 10.29130/dubited.1081523

ÖZ

Bu çalışmada Kilis ilinde 2 farklı lokasyondan alınan yüzeysel su örneklerindeki fekal streptokok kirlenmesi ve izolatların antibiyotik hassasiyet profillerinin araştırılması amaçlanmıştır. Eylül 2020’de alınan su örneklerinin fekal streptokok bakteri sayısı 11 EMS (en muhtemel sayı)/100 mL olarak tespit edilmiştir. Fekal streptokok izolatlarının klindamisin, tetrasiklin ve eritromisin standart antibiyotiklere direnç gösterdikleri ve çoklu antibiyotik direnç indeksi 0.48 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, Kilis yüzeysel su lokasyonlarındaki fekal kaynaklı ve çoklu dirence sahip streptokoklara ilişkin bakteriyolojik kirlenme, ekosistemdeki dengeyi tehdit eder düzeydedir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik hassasiyeti, İndikatör bakteri, Kilis, Su kalitesi

Antibiotic Susceptibility Pattern of Fecal Streptococci Isolated From Kilis Surface Water Bodies

ABSTRACT

In this present study, it is aimed to investigate the fecal streptococcus pollution frequency and antibiotic susceptibility pattern of isolates in surface water samples taken from 2 different location, Kilis. Fecal streptococcus number of water samples taken in September 2020, was determined as 11 MPN (most probable number)/100 mL. It was detected that fecal streptococcal isolates were resistant to clindamycin, tetracycline and erythromycin standard antibiotics and the multiple antibiotic resistance index was 0.48. As a result, bacteriological contamination of fecal originated and multi-resistant streptococci in the Kilis surface water locations threatens the balance in the ecosystem.

Keywords: Antibiotic susceptibility, Indicator bacteria, Kilis, Water quality.

I. GİRİŞ

Yüzeysel sular göller, akarsular, nehirler ve göletler gibi, çoğu şehir ve kırsal topluluk için başlıca içme suyu kaynakları ve diğer evsel kullanımlar olarak hizmet eden su kütleleridir [1]. Sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yüzeysel suların çevresel kontaminasyonu küresel bir sorundur [2]. Yüzeysel sular kirleticilerin su kütlelerine boşaltılması için kullanılan borular veya insan yapımı kanallar gibi) hem noktasal kaynaklardan ve kentsel akıntılar gibi noktasal olmayan kaynaklardan gelen insan yapımı kirlenmeye oldukça açıktır [3]. Çevresel ve antropojenik faktörlere bağlı olarak evsel, endüstriyel ve hastane atıklarının arıtılmadan yüzeysel su kaynaklarına deşarj edilmesi mikrobiyal yükü arttırmaktadır [4-5]. Su kütlelerindeki su kaynaklı patojen kontaminasyonu ve ilişkili hastalıklar, dünya çapında önemli bir su kalitesi sorunu haline gelmiştir [6].

Su güvenliği veya kalitesi, hijyen denetimi ve mikrobiyal su kalite değerlendirmesinin bir kombinasyonu ile tanımlanmaktadır. Bu yaklaşım, su kaynaklarındaki gerçek fekal kirlilik seviyesi hakkında sayısal bilgilerin yanı sıra olası kirlilik kaynakları hakkında bilgi vermektedir.

Genellikle koliformlar, fekal koliformlar ve fekal streptokoklar su kaynaklarındaki mikroorganizmaların temel indikatörü olarak tanımlanmaktadır. Bu indikatörlerin varlığı su kaynaklarının mikrobiyal yükünün değerlendirilmesi açısından önemlidir [7].

Fekal streptokoklar veya enterokoklar, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S.bovis*, *E. avium*, *S. equines*, *S. mitis*, *S. salivarius* türlerini içeren fekal örneklerde normal olarak gözlenen *Streptococcus* spp. türleri olarak bilinmektedir [8]. Bu organizmaların doğal yaşam alanı insan ve hayvanların kalın bağırsağıdır. Fekal kirliliğin geleneksel indikatör bakterileri arasında yer alan fekal streptokoklar gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, safra tuzları ve sodyum azit içeren besi ortamlarında 35°C'de gelişmektedirler [9]. Enterokoklar yalnızca yüzeysel sularda fekal kontaminasyonun indikatörü olmalarından dolayı değil gıda bozulmasındaki katkılarından dolayı da kapsamlı incelenmiştir.

Bu çalışmada, Kilis yüzeysel su kaynaklarından alınan örneklerde kültüre dayalı analizlerle potansiyel insan patojenini hedefleyen total ve fekal streptokok indikatör bakteri düzeyleri ve fekal streptokok türlerinin antibiyotik hassasiyet profilleri incelenmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A.1. Örneklerin Toplanması

Yüzeysel su örnekleri, 36.842353, 36.823024 (İstasyon A) ve 36.902786, 36.954326 (İstasyon B) coğrafi koordinatlı iki farklı su kaynağından toplanmıştır, 21 Eylül 2020, Kilis. Örnekler steril bakteriyolojik numune şişeleri (250 mL) kullanılarak APHA (1998) [10] ve WHO (2006) [11] kurallarına uygun olarak temin edilmiştir. Su örnekleri bir buz kabında laboratuvara getirilmiş ve mikrobiyolojik analizlere kadar ışığa duyarlı bir kaptan +4°C'de saklanmıştır.

A.2. Total ve Fekal Streptokokların Belirlenmesi

Streptokok sayımı için En Muhtemel Sayım (EMS) tekniği kullanılmıştır [12]. Çift kuvvetli 10 mL azid dekstroz broth içeren 3 tekrarlı tüplere su örneklerinden 10 mL; diğer iki tek kuvvetli sete ise su örneklerinden 1 ve 0.1 mL aktarılmıştır. Karıştırılmış deney tüpleri 35±0.5°C'de 24-48 saat için inkübe edilmiştir. Setlerdeki bulanıklık not edilmiş ve EMS tablosu ile karşılaştırılarak su örneklerindeki total streptokok kirliliği belirlenmiştir. 1 mL su örneklerinin aktarıldığı tek kuvvetli azid dekstroz broth içeren 3 seri tüp 44.5°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Bakteriyel gelişim gözlenen tüpler fekal streptokok pozitif olarak değerlendirilmiştir.

A.3. Fekal Streptokokların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

44.5°C’de geliştirilen deney setlerinde gelişim gözlenen tüplerden seri sulandırma yapılarak Brain Heart Infusion (BHI) agara yayma kültür şeklinde inokülasyon yapılmıştır. Seçilen tek düşmüş kolonilerin tanımlanması için gr boyanma ve kültürel karakteristikleri (H₂S üretimi, hareket, %6.5 NaCl içeren BHI brothda üreme, pH’sı 9.6’a ayarlanmış BHI brothda üreme, BHI broth içeren tüplerde 10 ve 45°C’de üreme, hemoliz zonu oluşturma, katalaz ve oksidaz) test edilmiştir.

A.4. Antibiyotik Hassasiyet Profillerinin Belirlenmesi

Streptokok izolatlarının antibiyotik hassasiyet profilleri Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzları ve tavsiyelerine göre %5 koyun kanı içeren Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) plaklar üzerinde disk difüzyon yöntemi [13] kullanılarak sürdürülmüştür. İnsan sağlık sistemi için önemli olan 6 standart antibiyotiğe Ampisilin (AMP; 10 µg), Klindamisin (DA; 2 µg), Tetrasiklin (TE; 30 µg), Eritromisin (E; 15 µg), Penisilin (P; 10 µg) ve Vankomisin (VA; 30 µg) (HiMedia, Hindistan) karşı suşların hassasiyetleri belirlenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 suşu kalite kontrol için kullanılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyonu takiben standart disklerin etrafındaki inhibisyon zonu hesaplanmış ve sonuçlar CLSI kılavuzu ile karşılaştırılmıştır. Duyarlılık testleri 3 tekrarlı sürdürülmüştür. Çoklu antibiyotik direnç (ÇAR) indeksi Krumperman (1983) tarafından belirtilen formüle göre hesaplanmıştır [14].

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

Hepsi dışkı kökenli olmayan koliform grubu mikroorganizma florası insanların ve sıcakkanlı hayvanların alt sindirim sistemlerinde enterik patojenleri de içerebilen "fekal koliform" olarak tanınmakta ve yüzeysel sulardaki fekal kirlenmenin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [15]. Fekal kontaminasyon indikatörleri (koliform ve streptokok) yüzeysel su örneklerinin biyolojik kirlilik parametrelerinin belirlenmesinde bu bakterilerin varlığı incelenmektedir.

Kilis ili yüzeysel sularından alınan A ve B istasyon örneklerindeki total streptokok seviyesi 11 EMS/100 mL olarak tespit edilmiştir. Tek kuvvetli azid dekstroz broth içeren seri tüpler 44.5°C’de üreme göstermiş olup bu istasyonlarda fekal streptokok varlığı da belirlenmiştir. Türkiye’de uygulanan yönetmeliğe (TS-266 2005) [16] ve WHO (2017) [17] kılavuzları insan tüketimi için amaçlanan içme suyu ve su için aşırı kullanılan yüzey suyu kaynaklarının fekal koliform bakteri (0 EMS/100 mL) içermemesini öngörmektedir. Çalışmamızda fekal kirlenmeye ilişkin bulgular, evsel ve endüstriyel atık su sistemlerinin kontrolsüz bir şekilde yüzey sularına deşarj edilmesini açıkça vurgulamaktadır. Su ortamlarında fekal koliformların varlığı, suların insan veya diğer hayvanların dışkı maddesi ile kirlendiğini göstermektedir. Koloren ver ark. (2011) tarafından Gaga Gölü’nde yapılan araştırmada, çalışmamıza benzer olarak fekal streptokok kirlenmesi saptanmıştır [15]. Nil Nehrin’de yapılan çalışmada Azzam ve ark. (2017) çalışmamızı destekler nitelikte fekal streptokok kirlenmesi rapor etmişlerdir [18]. Aksaray Karasu sulama ve drenaj kanalının bakteriyolojik kalitesinin belirlendiği çalışmada da fekal streptokok bakterilerin varlığına ilişkin sonuçlar ortaya konmuştur [19]. Kırsal Virginia havzasında Hagedorn ve ark. (1999) insan, çiftlik hayvanları ve vahşi yaşam kaynaklı fekal kirlenme belirleyicisi olarak fekal streptokok bakterileri izole etmişlerdir [20]. Çalışmamıza benzer şekilde Gazze şeridi-Filistin kıyı suyu örneklerinin mikrobiyal kompozisyonunda fekal streptokokların varlığı belirtilmiştir [21]. Giresun Yağlıdere akarsuyu su örneklerinin bakteriyolojik incelemesinde Akkan ve ark. (2019) fekal streptokok kirlenmesi tespit etmişlerdir [22].

Toplanan su örneklerinden gram boyanma karakterlerine ve yöntemde belirlenen biyokimyasal testlere göre toplamda 10 adet fekal streptokok izole edilmiştir. Bu suşların ampisilin, klindamisin, tetrasiklin, eritromisin, penisilin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı hassasiyet profilleri belirlenmiştir. Tablo 1’de izolatların farklı antibiyotiklere karşı gösterdiği hassasiyet yüzdeleri verilmiştir. İncelenen 6 standart antibiyotik arasında izolatların %100’nün tetrasikline karşı dirençli olduğu belirlenirken bunu

%90'nın dirençli olduğu klindamisin antibiyotiği takip etmektedir. Eritromisine karşı suşların %100'ü orta dirençli iken, test edilen diğer antibiyotiklere karşı suşlar hassasiyet göstermişlerdir.

Table 1. Su izolatu fekal streptokokların antibiyotik duyarlılık profilleri.

Antibiyotikler	Direnç (%)	Orta direnç (%)	Hassasiyet (%)
Ampisilin (AMP)	0	0	100
Klindamisin (DA)	90	0	0
Tetrasiklin (TE)	100	0	0
Eritromisin (E)	0	100	0
Penisilin (P)	0	0	100
Vankomisin (VA)	0	0	100

Sonuçlarımıza göre standart antibiyotiklerin %50'sine karşı direnç gözlenirken, %50'sine karşı da hassasiyet tespit edilmiştir. Krumperman (1983)'a göre ÇAR indeksi antibiyotik dirençlilik vaka sayısı/(test edilen antibiyotik sayısı x total izolat sayısı) formülüne göre hesaplanmıştır. Fekal streptokok izolatlarının ÇAR indeksi 0.48 olarak belirlenmiştir. >0.2 ÇAR indeks değerine sahip çoklu ilaç dirençli bakteriler, insanlara zararlı olabilecek fekal mikroorganizmaların artan dağılımı ile birlikte su kütlelerinin yüksek riskli kirlenmeye maruz kaldığını göstermektedir. Hassan ve ark. (2020) tarafından Lebri Nehri'nin iki farklı noktasından izole ettikleri fekal streptokokların çalışmamıza benzer şekilde ampisiline karşı hassasiyet tetrasikline karşı ise direnç gösterdikleri belirtilmiştir [23]. İzolatların ÇAR indeksi >0.2'den düşük olup, çoklu direnç gözlenmemiştir. Mainz şehri yüzeysel su ve içme sularında fekal streptokok yükünü belirleyen Schwartz ve ark. (2003) tarafından izolatların tetrasiklin ve eritromisine karşı direnç profilleri çalışmamızı desteklemektedir [24]. Gazze şeridi-Filistin kıyı suyu örneklerinden izole edilen fekal streptokokların çalışmamızda gözlenen hassasiyetlerine karşı suşların %76.7'si ampisiline, %75.1'i penisiline ve %39.6'sı vankomisine karşı dirençlilik göstermiştir. Farklı lokasyonlardan elde edilen izolatların ÇAR indeksi değeri (>0.33) çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir [21]. Orogü ve ark. (2017) Nijerya'nın Ilorin ve Kwara bölgelerinden aldıkları arıtılmamış su kaynaklarında fekal streptokok kirliliği belirlemiş ve antibiyotik hassasiyet çalışmalarında izolatların sadece eritromisine karşı direnç gösterdiklerini kaydetmişlerdir [25].

IV. SONUC

Çalışmamızın sonuçları, direnç genlerini diğer duyarlı sucul mikroorganizmalara yayabilen farklı antibiyotik direncine sahip fekal streptokok bakterilerin Kilis yüzey sularındaki varlığını göstermektedir. Örneklerdeki bakteriyolojik kirlenme, potansiyel hayvansal ve endüstriyel atık rezervuarı olarak antropojenik kirliliğin etkilerine işaret etmektedir. Su bakterilerinin ekolojisi, çeşitliliği ve antibiyotik dirençliliğin yayılımına ilişkin sonuçlarımız ve literatür çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda, su habitatları etkileyici bakteri çeşitliliğine ev sahipliği yapmakta ve klinik ilişkili antibiyotik direnç genlerini barındırmaktadır. Koliform ve fekal streptokok gibi bilinen insan kommensal bakterilerdeki direnç genlerinin çevresel bakterilerde yayılması ve bu direncin insanlara transferinin söz konusu olduğu yüzeysel su kaynakları için kalite standartlarının etkin bir şekilde uygulanması salgın hastalıkların engellenmesi açısından önemlidir.

V. KAYNAKLAR

[1] T. Ichor, E.U. Umeh, and E.E. Duru, "Microbial contamination of surface water sources in rural areas of Guma local government area of Benue State, Nigeria," *International Journal of Medical Science and Public Health*, vol. 2, no.2, pp. 43-51, 2014.

- [2] T. Akkan, and T. Topkaraoglu, "Determination of antibiotic resistance levels of *Escherichia coli* isolates obtained from freshwater sources: Batlama Creek," *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, vol. 4, no. 3, pp. 539-544, 2019.
- [3] Bundesverband der Deutschen Gas-und Wasser wirtschaft C.V (ed) (2001) *Wasserstaistik 1999/2000 V.G.W.*, Bonn Germany. pp. 589-593.
- [4] J.N. Muniz, K.G. Duarte, F.H. Ramos Braga, N.S. Lima, D.F. Silva, W.C.A. Firmo, M.R.V. Batista, F.M.A.M. Silva, R. de C.M. Miranda, and M.R.C. Silva, "Limnological quality: Seasonality assessment and potential for contamination of the pindaré river watershed, pre-amazon region, Brazil," *Water (Switzerland)*, vol. 12, no. 3, pp. 1-13, 2020.
- [5] A. Sunday, and F. Oyinade, "Bacteriological assessment of selected hand-pumped boreholes water sources in malete environs, Kwara State Nigeria, " *Journal of Natural and Applied Sciences*, vol. 3, no. 1, pp. 47-58, 2020.
- [6] P.K. Pandey, P.H. Kass, M.L. Soupir, S. Biswas, and V. Singh, "Contamination of water resources by pathogenic bacteria, " *AMB Express*, vol. 4, no. 1, pp. 1-16, 2014.
- [7] M. José Figueras, and J.J. Borrego, "New perspectives in monitoring drinking water microbial quality," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 7, no. 12, pp. 4179-4202, 2010.
- [8] C.M. Manjusha, U. Megha, P. Sadasivan, and P. Harikumar, "Isolation and characterisation of total Streptococci and fecal Streptococci from Kuppam river basin in South west coast of India," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 164-175, 2014.
- [9] J.P.S. Cabral, "Water microbiology. Bacterial pathogens and water," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 7, no. 10, pp. 3657-3703, 2010.
- [10] *Standard methods for the examination of water and wastewater*, APHA, 1998.
- [11] *Guidelines for drinking-water quality*, WHO, 2006.
- [12] *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14 th Edition, American Public Health Association, American Works Association, Water Environment Federation, 9:110-9:112.
- [13] A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method," *American Journal of Clinical Pathology.*, vol. 45, no. 4, 493-496, 1966.
- [14] P.H. Krumpermann, "Multiple antibiotic resistances indexing of *E. coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 46, no. 1, 165-170, 1983.
- [15] Z. Koloren, B. Tas, and D. Kaya, "Microbiological pollution of Gaga Lake in Ordu (Turkey) Abstract," *The Black Sea Journal of Sciences*, vol. 1, no. 3, pp. 74-85, 2005.
- [16] *Sular-insani tüketim amaçlı sular*, Türk Standartlar Enstitüsü TS 266, 2005.
- [17] *Guidelines for drinking water quality*, WHO, 2006.

- [18] M.I. Azzam, S.M. Ezzat, B.A. Othman, and K.A. El-Dougdoug, "Antibiotics resistance phenomenon and virulence ability in bacteria from water environment," *Water Science*, vol. 31, pp. 109-121, 2017.
- [19] H. Çelebi, "Karasu kanal sularında belirli mikroorganizma türlerinin araştırılması," *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, c. 6, s. 2, pp. 182-189, 2018.
- [20] C. Hagedorn, S.L. Robinson, J.R. Filtz, S.M. Grubbs, T.A. Angier, and R.B. Reneau Jr, "Determining sources of fecal pollution in a rural virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal Streptococci," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 12, pp. 5522-5531, 1999.
- [21] A.E. Abdelraouf, H. Philippe, J.E. Kamal, A. Adnan, A. Samir, E. Fatma, and R.A. Alaa, "Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*, fecal streptococci, Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the coastal water of the Gaza strip-Palestine," *International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 6, no. 3, pp. 1-13, 2016.
- [22] T. Akkan, S. Mehel, and C. Mutlu, (2019). "Determining the level of bacteriological pollution level in Yağlıdere Stream, Giresun," *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Researchs*. vol. 5, no.2, pp. 83-88, 2019
- [23] N.L.A. Hassan, K.K. Yern, and N.A.M. Zain, "Isolation of antibiotic resistant bacteria from rivers in Terengganu, Malaysia," *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 291- 307, 2020.
- [24] T. Schwartz, W. Kohnen, B. Jansen, and U. Obst, "Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 43, pp. 325-333, 2003
- [25] J.O. Orogu, G.P. Oyeyiola, and O.O. Adebisi, "Antibiotic resistance pattern of bacteria isolated from pipe-borne chlorinated (treated) water and untreated water in ilorin," *MOJ Bioequivalence & Bioavailability*, vol. 4, no. 1, pp. 183-191, 2017.