

İzmit Körfezinden İzole Edilen *Escherichia coli*'lerde R Plazmidlerine Bağlı "Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç Özelliğinin" Belirlenmesi

Hasibe Cingilli VURAL *  Abdülkadir AKÇİN **

* Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı, TR-42079 Selçuklu, Konya - TÜRKİYE

** Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, TR-41400 Gebze, Kocaeli - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3040

Özet

Bu çalışmada İzmit Körfezi'ndeki 9 istasyondan alınan 23 deniz suyu örneğinden izole edilen ve körfezde kirliliğe neden olan koliformlardan 8 *Escherichia coli* suşu antibiyotiklere karşı çoklu dirençlilik ve bulaşıcı tipte plazmid "R faktörü" taşıma özellikleri yönünden incelenmiştir. *E. coli* suşlarının örneklerden (deniz suyundan) izolasyonu ve identifikasyonu klasik metodlarla yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metoduna göre gerçekleştirilmiştir. İzole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotiklere dirençlilikleri Tetracylin için %50, Sulbactam/Ampicillin için %62.5, Penicillin için %62.5, Gentamicin için %50, Amikacin için %12.5, Chloramphenicol için %37.5, Cefoperozone için %25, Kanamycine için %37.5, Trimethoprim + Sulphamethoxazole için %62.5 olarak tesbit edilmiştir. Bu çalışma, İzmit Körfezi'ndeki kirlenmenin ve kirlilik indikatörü olan koliform varlığının önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir. Ayrıca su kaynaklı olan *E. coli* suşlarının en az 2 antibiyotiğe birden çoklu direnç taşıdıkları ve bu dirençlilik durumlarını R plazmidleri ile aktarabilme yeteneğinde oldukları ispatlanmıştır. Koliform bakterilerde çoklu dirençliliği sağlayan R plazmidlerinin varlığı da saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, önemli bir sağlık tehdidi olan İzmit Körfezi'ndeki *E. coli* suşlarının direnç modelinin ortaya konulmasında önemlidir.

Anahtar sözcükler: *E. coli*, Konjugasyon, Körfez kirliliği, Koliform, Çevre kirliliği


Investigation of "Contagious Type Antibiotic Resistance Properties" Related with R Plasmids in *Escherichia coli* Strains Isolated from İzmit Gulfs (Turkey)

Summary

In this study, 8 *Escherichia coli* strains one of the pollutions of the Gulf were from the twenty-three seawater samples taken from 9 chosen sites in the Gulf of İzmit, and 8 *E. coli* coliforms which is one of the pollutions of the Gulf, have been studied with respect to their resistance to antibiotics and their carrier properties of Contagious Types Plasmids with "R factor". *E. coli* samples were isolated and identified by use of classic methods. Sensitivity tests for antibiotics were conducted according to the Kirby-Bauer Disc Diffusion method. The results of *E. coli* isolates to various antibiotics were as follows; 50% resistance to Tetracycline, 62.5% for Sulbactam/Amphicillin, 62.5% for Penicillin, 50% for Gentamicin, %12.5 for Amikacin, 37.5% for Chloramphenicol, 25% for Cefoperozone, 37.5% for Kanamycin, and 62.5% for Trimethoprim + Sulphamethoxazole. This study demonstrates the importance of water pollution in the Gulf of İzmit by these pollution indicators, the presence of coliforms. Furthermore, *E. coli* a water related bacterium, has been proven to be highly resistant to at least 2 antibiotics and to be able to transfer this resistance to R plasmids. In coliform bacteria, presence of high resistance provider R plasmids have been found. This study may effectively help to understand the resistance models of the *E. coli* found at the Gulf of İzmit/Turkey.

Keywords: *E. coli*, Conjugation, Gulf pollution, Coliforms, Environmental pollution

 İletişim (Correspondence)

 +90 3322231873

 hcvural@gmail.com

GİRİŞ

Çeşitli antimikrobik ajanlara karşı, dirençliliğin *in vitro* olarak enterik bakteriler arasında aktarılabileceği, ilk olarak Japonya'da gerçekleştirilmiştir¹. Araştırmacılar, izole ettikleri *Shigella flexneri* suşlarının büyük bir kısmının, 4 antibiyotiğe birden dirençli olduklarını, bu suşların aynı hastalardan izole edilen *E. coli*'lerle aynı antibiyotik direnç modeline sahip olduklarını görmüşler ve bu direncin bir bakteriden diğerine geçmiş olabileceğini düşünerek, antibiyotik direncin blok olarak aktarılabileceğini ispatlamışlardır. Yapılan araştırmalar, bu bulaşıcı direnç özelliğinin bakteri kromozomu üzerindeki direnç genlerinden tamamen bağımsız olarak bakteri stoplazmasında bulunan ve Resistance Factor (R Faktörü) denilen küçük bir dairesel DNA elementi ile ilişkili olduğunu göstermiştir². "R" faktörü, aynı anda 7 antibiyotiğe birden direnç özelliğini konjugasyon ve transdüksiyon yolu ile, duyarlı bakterilere aktarabilmektedir³. "R" faktörü taşıyan bakteriler "R⁺ bakteriler" direnç genlerinin hepsini bir dakika gibi kısa bir süre içinde "R duyarlı bakterilere" geçirebilmekte, bu bulaşma sadece Gram (-) bakteriler arasında mümkün olabilmektedir⁴.

Antibiyotiklere olan dirençliliğin yanı sıra plazmidler diye tanımlanan ekstrakromozomal genetik elementler bazı toksik ağır metal iyonları olan arsenik, civa, kobalt, nikel, gümüş ve tellurium tuzlarına karşı da dirençliliği sağlayan genleri taşımaktadırlar^{5,6}. Patojenik mikroorganizmaların potansiyel kaynakları, körfez ve kıyı sularında mevcuttur. Gerçekte insanın fekal atıkları ve diğer organik kirleticilerin özellikle martılar tarafından kirlilik seviyesi çok daha az olan bölgelere, bu patojenlerin taşınması ile suyun kontaminasyonunda da önemli derecede farklılıklar gözlenmektedir. Kirlenen suların rekreasyonel amaçla kullanımı hastalıklara neden olmaktadır⁶. Özellikle de ağır metaller, bilhassa endüstri bölgelerinde çevreyi kirleten en önemli atıklar olup, bu toksik ağır metal bileşikleri yüzeysel sular, nehir, göl ve deniz sedimentlerinde bulunmaktadır⁷. Ayrıca, antibiyotik ve metal dirençliliği fenomenlerinin birbirleriyle ilişkili olduğu, kontrolsüz olarak gerek tedavi ve gerekse fizyolojik amaçlarla kullanılan antibiyotiklerden ziyade, çevreyi kirleten metal kontaminantların, dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğu da bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir⁸. Teknolojik atıklar, başta üzerinde yaşadığımız ve gıda gereksinimimizin hemen hemen tamamını sağladığımız toprak olmak üzere, denizler, göller, akarsular ve yeraltı su kaynaklarını sürekli kirlenmektedir. Bu kirliliklere bağlı olarak yeni hastalıklar ortaya çıkmakta veya var olan bazı hastalıkların da etkinliği artmaktadır. Bu nedenle, Dünya Sağlık Örgütü, plaj alanları hakkında yüksek oranda tatminkar olmak için, her 100 ml'de *E. coli* sayısının 100'den az olmasının sürekli sağlanması gerektiğini tavsiye etmektedir. Bu tavsiye doğrudan epidemiyolojik veriyle desteklenmemesine rağmen, fekal mikroorganizmaların uygulanabilir bir seviyede tutularak halk sağlığının korunmasına önem verilmiştir. Mikrobiyolojik kirlenmeye neden olan patojenik mikro-

organizmaların tümünü ayrı ayrı tespit etmek pratik açıdan çok zor olmaktadır. Bununla birlikte, kirlenmenin boyutu patojenik mikroorganizmaların indikatörü sayılan koliform bakterilerin konsantrasyonunu tespit etmekle yapılmaktadır. Patojenik mikroorganizmaların konsantrasyonu ise, atıksuların deniz suyu içerisinde seyrelmesi ile giderek azalmaktadır. Ayrıca, tedavi görmemiş hastaların dışkılarında çoklu dirençli *Shigella*'larla aynı direnç özelliğini gösteren *E. coli*'lerin bulunması, bir toplumdaki *E. coli*'lerde R faktörü aranmasının önemini de ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, İzmit körfezindeki çeşitli bölgelerden alınan deniz suyu örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının bazı antibiyotiklere dirençliliğinin saptanması ve bu dirençliliğin "R" plazmidleriyle ilişkisinin araştırılması ve aynı örneklerde koliform bakterileri varlığının ortaya konulması amaçlanmıştır. Körfezden izole edilen koliform bakterilerden olan *E. coli*'lerde direnç aktarımı, birden çok antibiyotiğe karşı direnç sağlayan ve bu direnç genlerini içeren "R" plazmidleri vasıtasıyla gerçekleştiği tanımlanmıştır. Böylece, herhangi bir antibiyotiğe karşı direnç göstermeyen ve duyarlı olan bakteri bu yolla dirençli hale gelmiştir. Tüm ilaçlara karşı hassas olan ve normal barsak florasında bulunan *E. coli*'ye "R" faktörünün, diğer Gram (-) bakterilerden konjugasyonla aktarımı da mümkün olmaktadır. Bu durum, sudan insana geçen ve gastrointestinal sistemde (GIS) bazı hastalıklara neden olan bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan etkili antibiyotiklerin tespitinde de ikinci önemli unsuru oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışmayla, konjugasyon sonucu oluşan yeni rekombinant türün etkili olduğu ve farklılık gösterdiği antibiyotiklerin de belirlenmesi amaçlanmıştır. Halen bu araştırma sonrası elde edilen *E. coli* bakteri ve suşları moleküler çalışmalara tabii tutularak direnç genlerinin sekans analizleri yapılmaktadır. Hatta klinik ve su kaynaklı bakterilerinin genom çalışmalarının yapılması özellikle de tür identifikasyonlarının tanımlanması çalışması moleküler genetik anlamda devam etmektedir.

MATERYAL ve METOT

E. coli İçin Örneklerin Toplanması

Bakteri izolasyonu; İzmit Körfezindeki 9 istasyonda (kirliliğin yoğun olduğu bölgelerde) yüzeyden, derinden ve kıyı kesimden (30 cm, 50 cm ve 100 cm) su örnekleri alınarak yapılmıştır. Numune alınan istasyonlar *Tablo 1*'de verilmiştir. Numuneler, steril olarak önceden temin edilen kahverengi cam şişelere alınıp ağızlarına mantar tıpa kapatılarak portatif bir buzdolabı içerisinde +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmek suretiyle aynı gün Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı Bakteriyoloji Bölümü'ne getirilerek deneysel protokollere göre her bir numune için özel besiyerleri hazırlanarak, membran filtrasyon yöntemiyle su numunelerindeki koliform tayini yapılmıştır⁹.

Table 1. Sampling stations**Tablo 1.** Numune alınan istasyonlar

Numune Alınan İstasyonlar	Yüzey No	Derin No	Kıyı No
Bayramoğlu	13	22	11
Darıca	6	16	15
Eskihisar	7	10	18
İzmit	21	19	20
Dilovası-Liman	-	12	-
Dilovası-Solventaş	-	14	-
Hereke	4	5	17
Körfez	8	2	3
Gölcük	1	23	9

Antibiyotik Diskler: Antibakteriyellere duyarlılık ölçümünde antibiyotik emdirilmiş disklerden (Oxoid, UK) yararlanılmıştır. Kullanılan disklerin içerdikleri antibiyotik yoğunlukları ve inhibisyon alanı standartları *Tablo 2*'de gösterilmiştir.

Table 2. Inhibition standards of used antibiotics in the research**Tablo 2.** Kullanılan antibiyotiklerin inhibisyon alan standartları

Antibiyotik Adı	Yoğunluk (mcg)	İnhibisyon Zonu Çapı (mm)	
		Dirençli	Duyarlı
Sulbactam/Ampicillin (SAM)	20	≤13	≥21
Penicillin (P)	10	≤11	≥22
Gentamicin (CN)	10	≤12	≥15
Amikacin (AK)	30	≤14	≥17
Nalidixic Acid (NA)	30	≤13	≥19
Chloramphenicol (C)	30	≤12	≥18
Cefoperazone (CEP)	75	≤15	≥21
Kanamycin (K)	30	≤13	≥18
Trimethoprim Sulfamethoxazole (SXT)	25	≤10	≥16
Tetracycline (T)	30	≤14	≥19

Su Örneklerinin Alınması ve Analiz İşlemleri

Membran Filtrasyon metodunda, inkübasyondan sonra membran filtre üzerinde 20-80 koloni olması idealdir. Temiz deniz suları için orjinal örneğin su miktarları filtre edilip 100 ml, 1 ml ve 0.1 ml olarak ayrıca kontamine olan körfez suyu numuneleri için dilüsyon örnekleri artırılmıştır. Bunun için, orjinal örnekten direk ekimler yapılmadan önce dilüsyon serileri hazırlanarak, steril pipetle orjinal örnekten 1 ml alıp 9 ml fosfat tamponu içeren tüpe aktarılıp, karıştırıcı veya el ile kuvvetlice çalkalanmıştır. Daha sonra D-1 dilüsyonundan alınan 1 ml, 9 ml fosfat tamponu içeren sulu tüpe konarak D-2 dilüsyonu elde edilmiştir.

Filtrasyon İşlemi

Herbir dilüsyon serisi için sterilize filtrasyon hunisi (funnel) kullanılmıştır. Sterilize edilmiş pens ile membran

filtre, filtrasyon apereyinin üzerine konur. Dikkatli bir şekilde funnel yerine yerleştirilir ve kilitlenir. 20 ml steril fosfat tampon suyu funnel'in içine konur sterilize pipet ile D-2 dilüsyonundan 1 ml funnel'a ilave edilerek kısmi vakum ile filtre edilir. Funnel'in duvarları yaklaşık 20 ml steril fosfat tampon suyu ile yıkanır, kısmi basınç uygulanarak filtre edilir. Funnel'in duvarları ikiden fazla yıkanarak tekrar kısmi vakum ile filtre edilir, kiliti açılarak funnel kaldırılır ve alevde sterilize edilmiş pens ile membran filtre alınarak vasat içeren petri plağının üzerine konur. D-1 dilüsyonunu filtre etmeden önce 20 ml fosfat tamponu filtrasyon ünitesinden geçirilir. Tüm ekimlerde aynı işlemler tekrarlanır. Daha sonra üzerine membran filtre konulan, agar plakları 31°C 24 saat inkübe edilerek sterilite kontrolü membran filtersiz agar içeren bir plakta inkübe edilerek yapılmıştır.

Membran Filtrasyon Yöntemi ile Total Koliform Tayini

Bu metod, ılıman ve sıcak denizlerin kıyı bantlarında ve kaplıca sularında total koliformların tayini için tanımlanmış olup plajların sanitasyon kontrolü için de kullanılmaktadır. Koliform grubu olmayan bakterilerin çoğu bu metotta kullanılan besiyerlerinde üremezler. Üreyen koliform grubundaki bakteriler ise spesifik testlerle ayırılmıştır. Bu testler ile, fekal orjinli *E. coli* TipI ve non-fekal orjinli TipII ile TipVI tayin edilmektedir. Bu testte, steril şartlar altında alınan deniz suyu örneklerinden sudaki total koliformun tahmin edilen sayısına göre dilüsyon serileri hazırlanarak bu dilüsyon serileri (su ile seyreltilmiş örnekler) 0.45 µ genişliği olan membran filtreden süzölmüştür. Membran Filtre, M-Endo Agar içeren petri plağına yerleştirilerek ve 37°C 24 saat inkübe edilmiştir. Şüpheli olan koloniler, Mac conkey veya BGGB (Brilliant Green Bile Buyyon) kullanılarak doğrulamaya alınarak test edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için, inkübasyon sonucu total koliform kolonileri sayılarak membran filtre üzerinde bulunan koliform ve koliform olmayan koloniler değerlendirmeye alınmıştır.

E. coli'lerin İzolasyonu ve Konjugasyon Deneyi

Çalışmada, 9 istasyondan alınan numuneler içerisindeki koliform tayini yapıldıktan sonra, konjugasyon deneyinde *E. coli*'de R plazmidlerine bağlı direnç aktarımı gösterileceği için koliform bakterilerden olan *Shigella*, *Proteus* ve *Salmonella* cinsleri arasından sadece *E. coli* izole edilmiştir. EMB (Eosine Methylene Blue) besiyerinde üreyen laktöz (+) kolonilerin tanınması için TSİ (Three Sugar Iron Agar) besiyerine ekim yapılarak İMVİC testleri için (İndol-Metil Red-Voges Proskauer-Citrate) lac (+) olan koloniler, sete alınıp klasik yöntemlerle *E. coli*'ler tanımlanmıştır.

Dirençliliği incelenecek olan bakteri suşları, 1 ml buyyon içeren tüplere ekilerek 37°C'de 6 saat enkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültürlerin 1/100'lük dilüsyonlarından steril olan eküviyon ucu ile sterilite kontrolü yapılmış ve etüvde kapakları aralık ve ters tutularak kurutulmuş Oxoid'in D.S.T. Agar besiyerinin yüzeyine homojen dağılım

yapacak şekilde ekim yapılmıştır. Fakat ekim yapmadan önce her bir tüpteki süspansiyonun bulanıklığı Mac Farland bulanıklık derecesine göre 0.5'e ayarlanmıştır. Eğer, bakteri süspansiyonunun bulanıklığı Mac Farland 0.5'ten daha fazla ise, bakteri süspansiyonuna steril serum fizyolojik eklenerek bulanıklık ayarı yapılır. Eğer, bakteri süspansiyonunun bulanıklık derecesi Mac Farland 0.5'ten daha az ise, bir süre daha etüvde bırakılarak aynı bulanıklık derecesine gelmesi sağlanır. Bu işlemin uygulanmasındaki amaç, her antibiyotik duyarlılık testinde besiyerine aynı miktarda bakteri ekimi yapılarak standardizasyonu sağlamaktır. Patojen bakterinin buyyonda Mac Farland 0.5 bulanıklığındaki süspansiyonu yapıldıktan sonra antibiyogram yapılacak besiyeri alınarak ekim yüzeyi kuruduktan sonra diskler steriliteye dikkat edilerek besiyerinin yüzeyine tam temas edecek şekilde yerleştirilip alevden geçirilmiş pensle hafifçe bastırılmıştır. Petri kutuları laboratuvar ısısında yaklaşık 30 dak. bekletilerek, antibiyotiklerin yayılımı sağlandı. 37°C'de bir gece enkübe edildikten sonra üremenin engellendiği alanların çapları ölçüldü ve mm olarak kaydedildi. Değerler, *Tablo 2*'deki verilerle karşılaştırılarak dirençli, intermedier ve duyarlı şekilde değerlendirilmiştir. Verici *E. coli*, alıcı *E. coli* (*E. coli* K12 Lac (-) NaI) suşlar ayrı ayrı buyyona öze ile ekilerek bir gece 37°C'lik etüvde enkübe edilmiştir. Seçici besiyeri olarak Mac Conkey besiyeri hazırlandı. Bu besiyerine Nalidixic acid ve uygun yoğunlukta ayrı ayrı antibiyotikler (SAM, C, CN...), eritilmiş olan besiyerinin yüzeyine 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra ilave edilerek, plaklara dökülüp dondurulmuştur. Alıcı *E. coli* ve çoklu direnç gösteren bakterilerin sıvı kültürlerinden, ayrı ayrı antibiyotikleri içeren bütün Mac Conkey plaklarına kontrol ekimi yapılmıştır. Plaklar dörde bölünerek kullanılmıştır. Çoklu direnç gösteren bakterilerle, alıcı bakteri bu besiyerlerinin hiçbirinde üremedi. Eğer üreme olursa suşlarda veya hazırlanan besiyerinde bir bozukluk var demektir. İçinde 5 cc buyyon bulunan tüplere, alıcı olarak kullanılan *E. coli* K12'nin bir gecelik sıvı kültüründen 0.5 cc, verici *E. coli* suşunun bir gecelik sıvı kültüründen de 0.1 cc ekildi. Hafifçe çalkalanarak 37°C'lik etüve kondu. Bu karışım bir gece enkübe edilmiştir (Direnç Transfer Dönemi). Ertesi sabah, bir öze kullanılarak ayrı ayrı antibiyotikler ve Nalidixic acid içeren Mac Conkey plaklarına ekim yapıldı (Bir gün önce plaklar etüvde kurutuldu). Bu ekim yapılan plaklar 37°C'lik etüvde bir gece bekletilmiştir. Ekilmiş olan plaklar ikinci gün etüvden çıkarıldı, lac (-) olan yani laktozu fermente etmeyen ve renksiz görünen şeffaf kolonilerin üremesi *E. coli* K12'ye direncin aktarıldığını göstermiştir. Çünkü lac (+) durumdaki verici *E. coli* suşunun direnç gösterdiği antibiyotiklere karşı, alıcı *E. coli* suşu da aynı direnci göstermektedir. Her plakta oluşan laktoz negatif kolonilerden (tek koloni almamaya dikkat edilerek) ayrı ayrı antibiyotik içeren Mac Conkey plaklarına, her plaka tek koloni düşecek şekilde ekimi yapılmıştır (Bu plaklarda Nalidixic acid bulunmamaktadır). Bu pasajın amacı, direnç özelliği aktarılmış olan alıcı *E. coli* K12'leri saflaştırmaktır. Bu plakta üreyen tek koloniden buyyona ekim yapılarak, bir gece 37°C'de etüvde enkübe edilmiştir. Buy-

yonda üreyen suş, eküviyonla D.S.T. agarına homojen şekilde yayıldı. İlk antibiyotik direnç testinde kullanılan diskler sıraya dizildi, ikinci gün inkübasyon alanları ölçülerek mm olarak kaydedilmiştir. Deneye alınmış olan alıcı suşun birden fazla sayıda antibiyotiğe dirençli duruma gelmiş olması, verici suşun direnç özelliğinin bulaşıcı tipte (R plazmidlerine bağlı) olduğunu gösterir. Alıcı suşlar, direnç özelliğinin tümünü aynen almamış olabilir veya hiç aktarım olmayabilir. Ancak olguların çoğunda, çoklu direnç durumunun gözlemlendiği görülmüştür. R faktörünün bünyesinde taşınan direnç genleri sayesinde kullandığımız antibiyotiklere karşı dirençli hale gelen *E.coli* K12 NaI' lac (-) suşundaki dirençlilik, *E. coli* K12 Ch', lac (+) suşuna da aynı yöntemle aktarılmıştır. Sadece Na' olan ve diğer antibiyotiklere karşı direnç göstermeyen alıcı suşun, deneye alınmasıyla birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli duruma gelmesi, verici suşun direnç özelliğinin bulaşıcı tipte (R plazmidlerine bağlı) olduğunu gösterir. Alıcı suşlar direnç özelliğinin tümünü aynen almamış olabilir veya hiç aktarım olmayabilir. Ancak deneyimizde diğer antibiyotiklere karşı hassas olan alıcı *E.coli* K12 suşu, numunelerden izole ettiğimiz verici *E. coli* suşundaki antibiyotik direnç özelliklerini kısmen almıştır. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerle ayrı ayrı hazırlanmış olan Mac Conkey agarlara, "R plazmid" aktarımı yapılmış *E. coli* K12 suşları ayrı ayrı ekilip Disk Difüzyon Metodu ile antibiyogramları yapılarak kolonilerin saf olup olmadığı ve antibiyotik direnç özelliklerinin ne düzeyde aktarıldıkları kontrol edilmiştir^{10,11}. Ayrıca, yapılan çalışmalarda milimetre olarak alınan zon ölçümleri *Tablo 2*'deki sınırlar çerçevesinde incelenerek "dirençli, duyarlı ve orta dirençli" olarak değerlendirme yapılmıştır. Burada dirençlilik durumu; O mikroorganizmanın sözkonusu antibiyotiğin sağaltımında kullanılan dozlarla elde edilen kan ve doku konsantrasyonlarına karşı dirençli olduğu anlamını taşımaktadır. Duyarlılık durumu; mikroorganizmanın aynı konsantrasyonlara karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Orta duyarlılık ise; kullanılan antibiyotiğin daha yüksek dozlarda verilmesi halinde sonuç alınabileceğini belirtmiştir.

BULGULAR

İzmit Körfezindeki, 9 istasyondan alınan 23 denizsuyu örneğinden izole edilen ve körfezde kirliliğe neden olan, yani "indikatör tür" olarak tayin edilen koliformlardan biyokimyasal olarak *E. coli* tanımı kesinleşen 8 *E. coli* suşu kullanılmıştır. Örneklerden, MF yöntemiyle yapılan çalışma sonuçları (Fekal koliform ve Total koliform) durumu *Tablo 1*'de sunulmuştur. Buna göre kullanılan 8 *E. coli* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm suşların antibiyotik direnç testleri yapıldı. Bu testte 10 antibiyotik kullanıldı. *E. coli* suşlarının en çok *Sulbactam/Ampicillin*, *Tetracyclin*, *Trimethoprim + Sulphamethoxazole* ve *Chloramphenicol'e* dirençlilik oranları %50'nin üzerinde bulunmuştur.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bauer ve arkadaşlarının disk difüzyon metoduna göre,

incelenen 8 *E. coli* suşunun antibiyotiklere duyarlılıkları **Tablo 3, 4** ve **5**'te sunulmuştur.

Table 3. Antibiotic results of 8 *E. coli* strains used in the study

Tablo 3. Çalışmada kullanılan 8 *E. coli* suşunun antibiyogram sonuçları

Suş No	(NA)	(T)	(SAM)	(P)	(CN)	(AK)	(C)	(CEP)	(K)	(SXT)
1	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
2	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R
5	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R
6	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R
9	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S
15	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S
22	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R
23	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S

S: Duyarlı, R: Dirençli

Table 4. Antibiotic results of *E. coli* K12 strains

Tablo 4. *E. coli* K12'nin antibiyogramı

Bakteri Suşu	(NA)	(T)	(SAM)	(P)	(CN)	(AK)	(C)	(CEP)	(K)	(SXT)
Saf <i>E. coli</i> K12	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R plazmidini alan <i>E. coli</i> K12	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S

Table 5. R factor transmission results with donor and recipient strains object to conjugations

Tablo 5. Konjugasyona tabii tutulmuş verici ve alıcı suşlar ile yapılan R faktörü aktarım sonuçları

Kullanılan Antibiyotikler	Suş Sayısı		% Oran	
	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Nalidixic Acid (NA)	8	0	100	0
Tetracylin (T)	4	4	50	50
Sulbactam/ Ampicillin (SAM)	3	5	37.5	62.5
Penicillin (P)	5	3	62.5	37.5
Gentamicin (CN)	4	4	50	50
Amikacin (AK)	7	1	87.5	12.5
Chloramphenicol (C)	5	3	62.5	37.5
Cefoperozone (CEP)	6	2	75	25
Kanamycine (K)	5	3	62.5	37.5
Trimethoprim + Sulphamethoxazole (SXT)	3	5	37.5	62.5

Bulaşıcı Tipte Plazmid (R Faktör) Aranması

Testlerde sadece *Nalidixic aside* duyarlı, diğerlerine dirençli olan *E. coli* suşları kullanıldığından körfezden izole edilen 8 *E. coli* suşundan tümünün duyarlı olduğu antibiyotik, *Nalidixic acid*'dir. Bunu sırasıyla *Amikacin*, *Cefoperazone*, *Chloramphenicol*, *Tetracyline*, *Ampicillin* gibi

antibiyotikler izlemektedir. 8 *E. coli* suşunda bulaşıcı tipte R plazmidini arandı. Konjugasyon denemeleri sonucunda 6 suş 2 veya daha fazla antibiyotiğe dirençli bulundu. Çünkü 6 suşun bulaşıcı tipte R plazmid bulunduğuna tesbit edildi. Direnç aktarım deneyleri sonucunda 2 suş 6 antibiyotiğe dirençli, 2 suş 5 antibiyotiğe dirençli, 1 suş 4 antibiyotiğe dirençli, 1 suşa ise 3 antibiyotiğe karşı dirençlilik aktarımı tesbit edilebilmiştir. Konjugasyon testlerinde, R plazmid aktarımı gerçekleşen 6 *E. coli* suşunun tekrar yapılan antibiyogram testleri sonucunda konjugasyon testleri sırasında belirlenen antibiyotik dirençlilikleri ile benzerlik gösterdiği tesbit edilmiştir (**Tablo 6, 7**).

Table 6. Antibigrams results of *E. coli* strains R plasmid transmission

Tablo 6. R Plazmid aktaran *E. coli* suşlarının antibiyogram sonuçları

Antibiyotik Sayısı	Suş Numaraları
2	1
4	2, 23
5	5
4	9, 15
3	22
6	6

Table 7. R factor transmission results with donor and recipient strains object to conjugations

Tablo 7. Konjugasyona tabii tutulmuş verici ve alıcı suşlar ile yapılan R faktörü aktarım sonuçları

Suş No	Verici Suşların Direnç Şeması	Suş No	Alıcı Suşların Direnç Şeması
2	SAM, P, C, SXT	K12 (2)	SAM, C, SXT
5	P, T, CN, C, SXT	K12 (5)	T, CN, C, SXT
6	SAM, P, CN, CEP, K, SXT	K12 (6)	CN, CEP, SXT
9	SAM, P, AK, C	K12 (9)	AK, C
15	T, CN, CEP, K	K12 (15)	T, CN, CEP
23	T, SAM, CN, K	K12 (23)	T, CN

TARTIŞMA ve SONUÇ

Membran Filtrasyon Yöntemi ile Total Koliform Tayin metodunun bir avantajı, *Clostridium perfringens* gibi anaerobik bakteri kolonilerinin yalancı pozitif okunmasına izin vermesidir. Koliform grubu olmayan bakterilerin çoğu bu metod da kullanılan besiyerlerinde üremezler. Üreyen koliform grubundaki bakteriler de, spesifik testlerle ayırtdirilirler. Bu test ile, fekal orjinli *E. coli* TipI ve non-fekal orjinli TipII ile TipVI tayin edilmektedir. Bulaşıcı tipte antibiyotik direncin süratle yayılması, günümüzde hekimleri en çok düşündürülen sorunlardan biri haline gelmiştir. Bu konuda dünyanın çeşitli ülkelerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Çeşitli antibiyotiklerin koruyucu ve tedavi edici amaçlar için uzun süreli kullanılmasının, bu antibiyotiklere dirençli bir popülasyonun oluşmasına neden olduğu ve dirençli bakterilerin insan sağlığını tehdit ettiği çeşitli

araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Yurdumuzda bu konuda çalışmalar yapılmış ve enterik bakteriler arasında R plazmidlerine bağlı direnç özelliği oranının yüksek olduğu belirtilmektedir. Aynı şekilde, 1963-1978 yılları arasında bu oran *E. coli*'lerde %28'den %83.9'a, *Shigella*'larda %52'den %80'e, *Salmonella*'larda %8'den %69'a yükseldiği de bildirilmektedir¹²⁻¹⁴. Farklı araştırmacılar tarafından elde edilen bulgular ile, koliformlarda %67 oranında R plazmidi varlığı saptanmıştır¹⁵. *E. coli*'lerin yüksek sıklıkta R faktörü içerdikleri ve diğer Gr (-) bakterilere bulaştırma şanslarının yüksek olduğu da bildirilmektedir¹⁶. Dirençli *E. coli* (donör) ve *E. coli* K12 (recipient) karışımları Mac Conkey + Nalidixic Acid + antibiyotik plaklarına inoküle edildiğinde, bazı plaklarda laktoz (-) koloniler görüldü. Bu plaklara verici ve alıcı bakteriler ayrı ayrı ekildiğinde ise üreme olma veya alıcı ve vericinin ayrı ayrı yapılan antibiyogramın da her ikisinin de herbir antibiyotik için duyarlılık ve direnç gösterme hassasiyeti farklılık gösterdi veya üreme olmadı. Bu gözlem, üreyen kolonilerin dirençli hale gelmiş *E. coli* K12'den oluştuğunu fikrini vermektedir. Bu kolonilerin *E. coli* K12'ye ait oldukları, NA içermeyen diğer antibiyotiklerin bulunduğu Mac Conkey plaklarına ekilerek kesinleştirilmiştir. Eğer bu koloniler donör'den antibiyotik direnç faktörü almamış olsalardı, antibiyotikli plaklarda üremeleri mümkün olmazdı (*E. coli* K12 NA'e dirençli ve kullanılan bazı antibiyotiklere duyarlı) (Tablo 4).

Üreme sadece bir plakta olsaydı bunun mutasyon sonucu olabileceği düşünülebilirdi. Araştırmada birden fazla plakta üreme olduğu görülmektedir ki, bu durumun çok ender bir olay olan mutasyon sonucu olması mümkün olamazdı. Antibiyotiklere dirençli hale gelen *E. coli* K12 suşu daha önceden kullanılan antibiyotik disklerle kontrol edilmiştir (Tablo 5, 6, 7 ve 8). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar bulaşıcı olan dirençliliğin hızla artmakta olduğunu göstermektedir^{17,18}.

Table 8. Antibigrams results of *E. coli* strains R plasmid transmission

Table 8. R Plazmid aktaran *E. coli* suşlarının antibiyogram sonuçları

Suş No	NA	T	SAM	P	CN	AK	C	CEP	K	SXT
2	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R
5	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R
6	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R
9	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S
15	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S
23	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S

Çevreden izole edilen K12 R⁺ laboratuvar donörleriyle çevreden izole edilen transfer R⁻ plazmidler arasında korelasyon saptanmıştır. R⁺xK12 F⁻ lac (-) olarak 16 suştan elde edilen transkonjugatlarda K12 F⁻ lac (+) suşlara dönüşmüşlerdir.

Sudaki bulgulara göre; barsak hastalıklarına sebep

olan *Shigella*, *Salmonella* ve Enteropatojenik *E. coli* bakterilerinin R plazmidini içerdikleri Amerika'da kanıtlanmıştır^{19,20}. Sudan izole edilen bu bakteri türlerinde de R plazmidine rastlanmıştır. Pis sulardaki enterik bakterilerde bulunan R plazmidleri transfer özelliğine sahiptir. Bu sonuçlar, ilaca direnç gösteren *E. coli* suşlarının çevrede "mikrobiyal indikatör" olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Böylece çevresel kirlilik tayin edilecektir. Enterik bakteriler arasında R faktörlerinin bulunuş zaman zaman ve yer yer değişiklik göstermektedir. *In vitro* bulgular yanında *in vivo* deneylerle de ince barsaklarda yaşayan bakteriler arasında çoklu dirençliliğin aktarıldığı yolunda yayınlarda vardır^{21,22}. Enterik bakterilerin hasta barsaklarındaki normal flora bakterilerden birçok antibiyotiğe birden direnç özelliğini kolayca alabilmesinin ve bu tip direnci kolayca bulaştırabilecek olan bakterilerin tedavide yaratabilecekleri problemlerin önemi açıkça görülmektedir. Bu tip direncin yurdumuz için de ciddi bir problem teşkil ettiği de bir gerçektir. Bunun için antibiyotik direnç testlerinin yapılması ve standardizasyonu, klinik laboratuvar işbirliğinin sağlanması, gelişmiş antibiyotik kullanımının önlenmesiyle R faktörlerinin tedavi edici hekimlikte yarattığı güçlükler azaltılabilir ve her yeni antibiyotiğin daha uzun süre etkinliği sağlanabilir. Bizim incelediğimiz sınırlı sayıda suş ile saptadığımız bulgulara dayanarak, yurdumuzdaki *E. coli* suşlarında R faktörlerinin bulunuş oranları hakkında kesin bir yargıya varılamaz ise de, bulgularımız bu tip direncin yaygınlığını bildiren çalışmalarla uyumluluk göstermektedir^{23,24}. Daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan *E. coli* kökenlerinin genellikle hastane ortamından ve hastalıklı materyallerden izole edilmiş olmasına karşın, bizim çalışmamızın ilginçliği çalıştığımız *E. coli* kökenlerinin (donörlerin) deniz suyundan izole edilmesinden kaynaklanmaktadır²⁵⁻²⁸. Toksik metaller ile çevre kirliliği birçok aktivite sonucu artmaktadır. Tarım ve endüstri gibi faaliyetlerde çevreye ağır metallerin deşarjı ekosistem ve insan sağlığındaki kirliliğin etkileri günümüzde kaygı verici olarak çoğalmaktadır. En güzel örneği oluşturan Türkiye'de en yoğun ithalat ve ihracat noktası olan İzmit Körfezi son yıllarda çevresindeki belde ve arazilerden sızan atık sular, gemilerin oluşturduğu atıklara ve iskeleden yapılan yüklemelerden dökülen maden atıkları, civardaki üretim çiftliklerinde kullanılan yapay yemlerdeki kimyasal maddeler yüzünden kirlenme ile karşı karşıyadır. Kirlenme, her ne kadar tehlikeli boyutlara ulaşmıyorsa da acil önlemler alınmazsa körfez tüm özelliğini ve güzelliğini yitirecektir. Körfezdeki kirlenmenin varlığı artan yosunlanmadan ve deniz analarının çoğalmasından da anlaşılmaktadır. İzmit Körfezi, özellikle araştırmada belirlenen istasyonlardan alınan numuneler incelendiğinde, bölge çevresinde giderek yoğunlaşan yerleşim alanlarının çevreye bıraktığı evsel atıkların neden olduğu ciddi bir kirlenme sorunu bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, deniz kullanım suları için belirlenmiş standartlarda indikatör mikroorganizmaların yoğunluklarını ve direnç gelişim faktörlerini de göstermektedir. Körfez gibi hali hazırda zaman zaman yüzme alanı olarak kul-

lanılan bu bölgedeki indikatör mikroorganizma yoğunluğu ve yüzücüler için potansiyel sağlık riskleri arasındaki mümkün olan ilişkileri değerlendirmek ve su çevresinde fekal kirliliğin indikatörü olarak belirlenen *E. coli*'nin karakteristik özelliklerini tanımlamaktır. Çalışmayla ilgili olarak karşılaştırma yapacağımız kirlilik ve kirlilik etkeni olan mikroorganizma/toksik metal vb. tanımlayıcı farklı çalışmalar bulunmaktadır, fakat İzmit Körfezi gibi deniz suyunun kullanıcı sayılarının fazla olduğu istasyonlardan elde edilen suşların antibiyotiklere karşı çoklu direnç göstermesi ve antibiyotik direnç oluşumu ile suşlardaki plazmit içeriği arasındaki doğrudan ilişkinin varlığıyla ilgili çok sayıda araştırmaya rastlanmamıştır^{29,30}.

Bu çalışmada, antibiyotik ve metal dirençliliği fenomenlerinin birbirleriyle ilişkisine değinilmemiştir. Ancak çevreyi kirleten metal kontaminantların, dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğu ileri sürülmekte olup, İzmit Körfezinde de deniz ve çevre kirlenmesinde ağır metal atıkları başrolü oynamaktadır^{31,32}. Son yıllarda ağır metallerin çevrede (deniz, göl, nehir vb.) doğal ve yapay yollarla yapılan atık suların arındırılması işlemleri sırasında, bakteriler tarafından biyolojik transformasyona uğratarak, toksik metal bileşiklerine dönüştürüldükleri de açıklanmıştır³². Burada mevcut paradoksların incelenmeye muhtaç olduğu ve daha ileri çalışmaları gerektirdiği görülmekte olup açıklanmaya muhtaç birçok sorun bulunduğu da aşikardır. Çalışmanın ilk aşamasındaki bulgular, İzmit Körfezi'ndeki kirlenmenin ve kirlilik indikatörü olan koliform varlığının önemli boyutlarda olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmayı İzmit Körfezindeki deniz canlılarında ağır metallerin R plazmidleriyle ilişkisi ve antibiyotiklerde dirençlilik ilişkisinin incelenmesiyle sürdürerek daha ileri çalışmalarla geliştirmek düşünülmektedir. Bu çalışmada edinilen ikinci bulgularımıza göre'de su kaynaklı *E. coli* suşlarının en az 2 antibiyotiğe birden çoklu direnç taşıdıkları ve bu dirençliliklerini R plazmidleri ile aktarabilme yeteneğinde oldukları isbat edilmiştir. Ayrıca, koliform bakterilerde çoklu dirençliliği sağlayan R plazmidlerinin varlığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmanın, İzmit Körfezi'ndeki *E. coli* suşlarının direnç modelinin tanıtılmasında da etkili olduğu düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada yardımlarından dolayı Prof. Dr. Abdülkadir AKÇİN'e, Dr. K. Naci KIRCA'ya, Konya Halk Sağlığı Laboratuvarı elemanlarına ve kütüphane imkanlarından yararlandığım TÜBİTAK MAM'a, ayrıca araştırmayı maddi açıdan destekleyen G.Y.T.E. Araştırma Fonu kurumuna da teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. **Ochiai K, Yamanaka T, Kimura K, Sawada O:** Studies on inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains. *Nihon Jji Shimpo*, 1861, 34-46, 1959.

2. **Tschape H, Tietze E, Prager R, Heier H:** Occurrence in water and waste water of *E. coli* and coliform bacteria carrying R-plasmids. Part 3: Plasmids encoding gentamicin, trimethoprim or streptomycin resistance. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 14, 167-174, 1986.

3. **Akman M:** Antibiyotiklere dirençli enterik bakteri suşlarının artışı ve R plazmidleri. *Mikrobiyol Bül*, 13, 313-320, 1983.

4. **Toze S:** PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Res*, 33 (17): 3545-3556, 1999.

5. **Anderson JD:** The effect of R factor carriage on the survival of *E. coli* in the human intestine. *J. Med Microbiol*, 7, 85-90, 1973.

6. **Peterson BC, Hashimoto H, Rownd HR:** Cointegrate Formation Between Homologous Plasmids in *E. coli* Laboratory of molecular Biology and Department of Biochemistry. University of Wisconsin, Madison Wisconsin, 53706, 1982.

7. **Keskin M:** Sağlık Açısından Denizsuları Mikrobiyolojisine Yaklaşımlar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 14, 69-76, 1990.

8. **İzgür M:** Sağlıklı hayvanlarda izole edilen *E. coli* suşlarının çeşitli özellikleri üzerinde incelemeler. *Doktora Tezi*. Ankara Üniv Vet Fak. 1981.

9. **Sabry SA, Ghozlan HA, Abou-Zeid DM:** Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J App Microbiol*, 82, 245-252, 1997.

10. **Bitton G:** Wastewater Microbiology. pp. 478, Wiley-Liss, Newyork, 1994.

11. **Akman M, Baykal M:** Türkiye'de izole edilmiş olan *Shigella* suşlarında bulaşıcı tipte antibiyotik varlığı (R faktörü). *Mikrobiyol Bül*, 6, 22, 1972.

12. **Bausser AW, Kirby WMM, Sheris JC and Truck M:** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol*, 45 (4): 493-496, 1966.

13. **Gillies RR, Doods TC:** Bacteriology Illustrated. Livingstone Ltd., London, 1963.

14. **Sedlock DM, Deibel RH:** Detection of *Salmonella* exlerotoxin using rabbit ilcal loops. *Can J Microbiology* 24, 268-273, 1978.

15. **Mirhosseini SZ, Seidavi A, Chamani M, Sadeghi AA Pourseify R, Shivazad M:** Detection of *Salmonella* spp. in gastrointestinal tract of broiler chickens by polymerase chain reaction. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (6): 965-970, 2009.

16. **Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A:** Extended broad-spectrum beta- lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*, 10, 867-878, 1998.

17. **Urbarlı A, Arı A, Erdenizmenli M, Fidan N, Özgenç O:** İdrar örneklerinden soyutlanan gram-olumsuz bakteriler ve antibiyotik direnç oranları. *İnfekt Derg* 15, 249-253, 2001.

18. **Linton AH, Thimoney JF, Hinton M:** The ecology of chloramphenicol-resistance in *Salmonella typhimurium* and in *Escherichia coli* in calves with endemic salmonella infection. *J Appl Bact*, 50, 115-129, 1981.

19. **Saya DJ, Ogunseitan O, Sayler GS, Miller RV:** Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: Effect of plasmid donor concentration and natural microbial community on transduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl EnvirMicrob*, 53, 987-995, 1987.

20. **Edwards PR, Ewing WH:** Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publish. Company, Minncapolis, Minesota, USA, 1972.

21. **USEPA:** "Quality Criteria for Water" (Red Book). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1976.

22. **Kocazeybek B:** Antimicrobial resistance surveillance of Gram-negative bacteria isolated from intensive care units of four different hospitals in Turkey: Evaluation of the prevalence extended-spectrum and beta-lactamases using different e-test strips and direct induction methods. *Chemother*, 47, 408, 2001.

23. **Kinjo T:** Drug resistance and R plasmids in *Escherichia coli* isolated from feces of various animals and man in Kcinova. *Jap J Zootch Sci*, 50, 542-548, 1979.

24. **Küçükateş E, Kocazeybek B:** İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü

Yoğun Bakım Ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyal Cem Derg*, 31, 19-22, 2001.

25. Walter MV, Vennes JW: Occurrence of multiple-antibiotic-resistant enteric bacteria in domestic sewage and oxidation lagoons. *App Envir Microbiol*, 50, 930-933, 1985.

26. Wiggins BA, Andrews RW, Conway RA, Corr CL, Dobratz EJ, Dougherty DP, Eppard JR, Knupp SR, Limjoco MC, Mettenburg JM, Rinehardt JM, Sonsino J, Torrijos RL, Zimmerman ME: Use of antibiotic resistance analysis to identify nonpoint sources of fecal pollution. *Appl Envir Microbiol*, 65, 3483-3486, 1999.

27. March PA, Grimes DJ: R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *App Envir Microbiol*, 1395-1403, 1982.

28. Mates A, Schaffer M: Quantitative determination of *Escherichia coli*

from coliforms and faecal coliforms in sea water. *Microbios*, 71, 27-32, 1992.

29. Lima e Silva, AA de, Hofer E: *Escherichia coli* isolated from salt-water fish: Resistance to drugs and colicinogeny. *Biomed Lett*, 51, 175-181, 1995.

30. Whitman RL, Gochee AV, Dustman WA, Kneddy KJ: Use of coliform bacteria in assessing human sewage contamination. *Natural J*, 15, 227-233, 1995.

31. Silver S, Misra TK: Plasmid-determined heavy metal resistances. *Ann Rev Microb*, 42, 717-743, 1988.

32. Alexander R: Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff-funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen. *Die Dissertation*, München Technische Universität, 2002.