

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BOĞAÇAY'IN (ANTALYA) DENİZE DÖKÜLDÜĞÜ ALANDAKİ ÇOKLU
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ BAKTERİLERİN YAZ VE KIŞ MEVSİMLERİNDE
KARAKTERİZASYONU**

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BOĞAÇAY'IN (ANTALYA) DENİZE DÖKÜLDÜĞÜ ALANDAKİ ÇOKLU
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ BAKTERİLERİN YAZ VE KIŞ MEVSİMLERİNDE
KARAKTERİZASYONU**

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOĞAÇAY'IN (ANTALYA) DENİZE DÖKÜLDÜĞÜ ALANDAKİ ÇOKLU
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ BAKTERİLERİN YAZ VE KIŞ MEVSİMLERİNDE
KARAKTERİZASYONU**

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2019-5094 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ARALIK 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOĞAÇAY’IN (ANTALYA) DENİZE DÖKÜLDÜĞÜ ALANDAKİ ÇOKLU
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ BAKTERİLERİN YAZ VE KIŞ MEVSİMLERİNDE
KARAKTERİZASYONU**

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 21/12/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK (Danışman)

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ

ÖZET

BOĞAÇAY'IN (ANTALYA) DENİZE DÖKÜLDÜĞÜ ALANDAKİ ÇOKLU ANTİBİYOTİK DİRENÇLİ BAKTERİLERİN YAZ VE KIŞ MEVSİMLERİNDE KARAKTERİZASYONU

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Aralık 2020; 67 sayfa

Son yıllarda mikroorganizmalarda görülen antibiyotik direncindeki ivmeli artış insan ve hayvan sağlığını ciddi olarak tehdit etmektedir. Özellikle antropolojik aktivitelerde sıklıkla kullanılan yer üstü su kaynaklarındaki antibiyotik kontaminasyonu, bu kaynaklarda bulunan mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin çevresel kaynağı olarak belirtilmektedir. Ziraî aktivitelerde ve insanlarda olduğu kadar hayvanlarda da tedavi amaçlı olarak antibiyotiklerin yanlış ve çokça kullanımı, yüzey ve yer altı sularının antibiyotiklerle düzenli olarak kirlenmesine neden olmaktadır. Her ne kadar günümüzde klinikte antibiyotik direnci küresel bir sorun olarak ele alınarak çeşitli çözümler önerilse de çevrede bulunan antibiyotiğin bu dirence etkisi göz ardı edilmektedir. Dolayısıyla, insanların kullanımı açısından önem teşkil eden yer üstü sularının bu tür aktivitelerden etkilenme seviyesinin incelenmesi, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Antalya ili için, Konyaaltı bölgesinin en büyük su kaynağı Boğaçay'dır. Boğaçay, Antalya Ovası'ndan başlar, Turgut ve Cumalı Dereleri, Karaman Çayı, Doyran Suyu ve Çakırlar Deresi gibi birçok farklı su kaynağını bünyesinde toplayarak Akdeniz'e dökülür. Özellikle denize döküldüğü bölgede yüzme ve balık tutma gibi aktivitelerin sıklıkla gerçekleştiği Boğaçay sadece bu özelliğinden dolayı değil, aynı zamanda konumu, içme ve kullanma sularının ihtiyacının karşılanmasında ve tarım arazilerinin sulanmasında kullanılması açısından Antalya ili için büyük önem taşır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında mikrobiyal profili çıkarılmamış, Boğaçay'ın denize döküldüğü noktadan (36°51'12.7"K 30°37'39.3"D) alınan su örneklerinde kültüre edilebilen bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi; çoklu antibiyotik direnci olan bakterilerin seçilerek moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır. Mevsimsel farklılıkların direnç üzerine etkisinin olup olmadığının anlaşılması amacıyla Şubat (2020) ve Ağustos (2020) aylarında örnekleme yapılmıştır. Bu çalışmada, Boğaçay'ın denize döküldüğü noktadan alınan örneklerden izole edilen bakterilerin, klinikte en sık kullanılan 5 antibiyotiğe (ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, kanamisin ve imipenem) karşı gösterdikleri dirençler disk difüzyon metodu ile incelenmiş, çoklu direnç gösterenler seçilerek genomik DNA izolasyonu ve 16S ribozomal RNA gen bölgesi (rDNA) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve sekanslama gibi moleküler tanılama yöntemleri ile tanımlanmıştır. Yapılan profillemeye çalışmaları, örnek alınan bölgede mevsimsel olarak mikrobiyal kompozisyonun ve direnç profilinin

değiştiğini göstermektedir. Çoklu antibiyotik direnci gösteren kış mevsimi izolatları *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* ve *Lecleria* türlerine aittir. Çoklu antibiyotik direnci gösteren yaz mevsimi izolatları ise *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Curvibacter* türlerine aittir. Her ne kadar mevsimsel olarak mikrobiyal kompozisyon genel olarak değişse de her iki mevsimde de tanılanan *Acinetobacter*, *Klebsiella* ve *Pseudomonas* gibi bazı ortak türler mevcuttur. Bu çalışma Antalya’da gerçekleştirilen Boğaçay merkezli ilk çoklu antibiyotik direnci profillemesi çalışması olması açısından önem teşkil etmektedir. Ayrıca bu çalışma ile Boğaçay’ın denize döküldüğü noktada çoklu antibiyotik dirençli bakteriler tanımlanmış, yayılımları hakkında bilgi edinilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Antibiyotik direnci, Boğaçay, Mevsimsel karakterizasyon, Moleküler tanımlama

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA FROM DISEMBOGUE AREA OF BOĞAÇAY (ANTALYA) DURING SUMMER AND WINTER SEASONS

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

December 2020; 67 pages

Nowadays, pollution of water resources due to human activities is a serious problem on a global scale. In addition to this, human and animal health is seriously threatened by the accelerated increase in antibiotic resistance observed in microorganisms in recent years. Antibiotic contamination in surface water resources, which are frequently used in anthropological activities, causes the development of antibiotic resistance in microorganisms found in these sources. Extravagant and misused of antibiotics during agricultural activities and treatment in animals as well as humans results in regular contamination of surface and ground water with antibiotics. Although antibiotic resistance is discussed as a global problem which is tried to be solved by various solutions in the clinic, antibiotics are ignored as environmental pollutants. Therefore, it is important to investigate exposure level of surface waters, which are important for human use, from such activities and to determine antibiotic resistance profiles.

Boğaçay is the biggest water source of Konyaaltı region for Antalya province. Boğaçay starts from the Antalya Plain, and pours into the Mediterranean Sea by gathering many different water sources such as Turgut and Cumalı Brook, Karaman Stream, Doyran Water and Çakırlar Brook. Especially the disembogues area of Boğaçay, where activities such as swimming and fishing are frequent, has a great importance for Antalya not only because of this feature, but also because of its location, fulfilling the need of potable and tap water and utilization during irrigation of agricultural lands. For this reason, in this thesis, it is aimed to determinate antibiotic resistance profiles of bacteria that can be cultured in water samples taken in February and August in order to take into account the changes between winter and summer seasons at the point where Boğaçay disembogues into Mediterranean Sea (36 ° 51'12.7 "N 30 ° 37'39.3" E) where microbial profile has not been determined before and identify multiple antibiotic resistant bacteria via molecular methods. At the same time, in this study, resistance profile of the bacteria isolated from the samples taken from the point where Boğaçay disembogues into Mediterranean sea, against the 5 most commonly used antibiotics (ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, kanamycin and imipenem) was evaluated by disk diffusion method, and selected multiple resistant samples were identified by molecular identification methods such as genomic DNA isolation and 16S ribosomal RNA gene region (rDNA) amplification by polymerase chain reaction (PCR) and

sequencing. Conducted microbial profiling studies show that the microbial composition and resistance profile change seasonally in the sampled region. Winter isolates with multiple antibiotic resistance belong to the species *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Lecleria*. Summer isolates with multiple antibiotic resistance belong to *Chryseobacterium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Curvibacter* species. Although the microbial composition generally changes seasonally, there are some common species such as *Acinetobacter*, *Klebsiella* and *Pseudomonas* that are diagnosed in both seasons. This study is important in terms of being the first multi-antibiotic resistance profiling study conducted in Antalya, based in Boğaçay. In addition, with this study, information was obtained about the resistance and spread of bacteria in an aquatic system that is intertwined with human habitat, and an important study was carried out on public health by identifying clinically important bacteria. Moreover, results obtained from the study were shared with the authorities and awareness was raised about public health and environmental regulations.

KEYWORDS: Antibiotic resistance, Boğaçay, Molecular identification, Seasonal characterization,

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Assoc. Prof. Dr. Aysun ÖZÇELİK

Asst. Prof. Dr. Tuğba ÖZAKTAŞ

ÖNSÖZ

Su tüm canlı organizmalar için elzem olan en önemli bileşendir. Canlılar su ihtiyaçları için buzullar, okyanuslar, nehirler, göller, yeraltı suları, kaplıca ve maden suları, denizler ve yağışlar gibi su kaynaklarını kullanırlar. Özellikle insan aktiviteleri nedeniyle, su kaynaklarının kirlenmesi günümüzde küresel ölçekte ciddi bir problem teşkil etmektedir. Bu nedenle de su kaynaklarının korunması için mikrobiyal profillemeye çok önemlidir. Antalya'nın iki önemli akarsuyundan biri ve Konyaaltı kentsel alanının en büyük su kaynağı olan, denize direkt bağlantısı ve aynı zamanda konut alanları ile çevrilmiş olması nedeniyle insan aktivitelerinin içinde yer alan, yer üstü suları için iyi bir örnek teşkil eden Boğaçay'dan izole edilen bakterilerden antibiyotik direncine sahip olanların tanımlanması ve klinikle alakalı olanların tespit edilmesi bilimsel açıdan olduğu kadar halk sağlığı açısından da önemlidir. Bu tez çalışmasının, benim açımdan en özgün değeri Antalya'nın Konyaaltı Bölgesi için oldukça büyük öneme sahip Boğaçay'da daha önce tekli ya da çoklu antibiyotik direnci olan mikroorganizmalar tanımlanmadığından, bölgenin mikrobiyal yapısının anlaşılması için gerçekleştirilen ilk çalışma olmuş olmasıdır. Ayrıca, antibiyotik direncine sahip mikroorganizmaların mevsimlere göre değişiklik gösterip göstermediğinin belirlenmesi, antibiyotik direncine bağlı olarak gelişebilecek ağır metal gibi diğer direnç sistemlerinin tanımlanmasında aydınlatıcı bir rol üstlenecektir. Dünyadaki kullanılabilir kalitedeki tatlı su kaynaklarının azaldığı bir çağda, sonunda denizle kavuşan böylesi bir yeryüzü suyunun korunması hem ülkemiz açısından hem de evrensel açıdan oldukça önemlidir.

Bu önemli konudaki boşluğu dolduran bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda hayata geçirilmiştir. Çalışmalarımı yaparken sadece bu çalışma için değil, bugün şevkle bilim insanı olma yolunda yürümemi sağladığı, iyi bir bilim insanı olmak için olması gerekenleri sabırla öğrettiği, hayatla alakalı verdiği tüm tavsiyeleri, danışman kelimesini hayatın tüm alanına yayabildiği, kendimi hep güvende ve huzurlu hissettiğim bir çalışma ortamı sağladığı ve bana yaşattığı sayamayacağım kadar çok güzellikler için her konuda bana destek olan sevgili danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK'e (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü), çalışmalar boyunca deneylerde desteklerini esirgemeyen, beraber çok yorulduğumuz Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı yüksek lisans öğrencileri Berfin EROĞLU ve Eda DELİK'e, bu çalışmanın bana dostluklarını kazandırdığı, Ayşegül CENGİZ, Beyzanur BALKİS, Zeliha YÜCEL, İlay USMAN, M.Cihan AYDEMİR, Zehra KURU ve Çağdaş KIZIL'a teşekkür ederim. Ayrıca FYL-2019-5094 nolu projemizi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Konuşmaların anlamsız kaldığı, bakışmalarımızla anlaşabilmeyi başardığımız ve daha nice güzellikler paylaştığım Serap ÖZKAYA'ya, zorlu zamanlarda beni durmaksızın dinleyen İkra Gizem YILDIZ'a, bu süreçte varlığıyla bana nefes aldırان Zeynep Seda SOYLU'ya ve beni bu süreçte motive eden Esen Başak KANGAL'a ve gerek tez süresince gerekse hayatta takıldığım tüm taşları nasıl kaldıracağımı sabırla göstermekten vazgeçmeyen Deniz BORATAŞ'a özellikle teşekkür ederim. İzmir'le alakalı tüm sorularımı bıkmadan yanıtlayan, İzmir'e alışmam için desteklerini esirgemeyen Özge SARAÇOĞLU'na ve Şükrü UYSAL'a çok teşekkür ederim. Bana İzmir'le alakalı kattığı tüm güzellikler için de Erhan EREN'e çok teşekkür ederim.

Sadece bu tez sürecinde değil, bana gerek laboratuarda gerekse hayata dair birçok şey öğreten, çalışma disiplinini ve işimi sevmemi sağlayan başta Çiğdem YILMAZ ÇOLAK ve Esra YÜCA olmak üzere bugüne kadar kendimi geliştirmemde katkıları olan tüm hocalarıma çok teşekkür ederim. Tezim konusunda desteklerini esirgemeyen, değerli zamanlarını ayırıp bu çalışmanın daha iyi olması için emek veren, zor zamanlarımda desteklerini hiç esirgemeyen, yorumları ve soruları ile bana yol gösteren tez jürimde beni yalnız bırakmayan saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ'a (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü) pes edip bırakmamamız için bizi teşvik edip bu tezin ortaya çıkmasında verdiği emekler için teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tezimin son döneminde verdikleri destekler için Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ferah SAYIM'a, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a ve Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Bölüm Başkan Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Barış UZİLDAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

En özel teşekkürlerimi ise, hayatım boyunca attığım her adımda arkamda duran, bugün geldiğim noktayı borçlu olduğum, bu tez çalışması boyunca hayatın birçok farklı zorluğunu birbirimize kenetlenerek atlattığımız biricik çekirdek aileme; canım annem Esin YİRMİBEŞOĞLU ve biricik babam Huzur Sait YİRMİBEŞOĞLU'na iletmek istiyorum. İyi ki varsınız. Bu tez çalışmamı size, kaybettiğimiz sevdiklerimize ve beraber kazandığımız tüm güzelliklere ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Antibiyotikler ve çalışma mekanizmaları.....	3
2.2. Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları.....	4
2.3. Küresel ve ulusal ölçekte antibiyotik direncine karşı alınan önlemler.....	5
2.4. Çevresel kirleticiler olarak antibiyotikler.....	7
2.5. Boğaçay özelinde antibiyotik direnci ve çalışmanın amacı	9
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Su Örneklerinin Toplanması	11
3.2. Bakterilerin İzolasyonu	12
3.3. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu	12
3.4. 16S Ribozomal RNA Gen Bölgelerinin (rDNA) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması	12
3.5. 16S rDNA PZR Ürünlerinin Elektrophorezi ve Sekans Analizleri	14
3.6. Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi	14
3.7. İstatistiksel Analizler.....	15
4. BULGULAR.....	16
4.1. Kış Mevsimi için Mikrobiyal Profilleme Çalışmaları.....	16
4.1.1. Kış mevsimi için bakteri izolatlarının eldesi	16
4.1.2. Kış mevsimi bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri.....	16
4.1.3. Kış mevsimi için seçilen izolatlardan PZR ve agaroz jel elektrophorezi.....	18
4.1.4. Kış mevsiminde seçilen izolatlardan yapılan sekans analizi	19
4.1.5. Kış mevsimi bakteri izolatlarının çoklu antibiyotik direnci	20
4.1.6. Kış mevsiminde çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların <i>E. coli</i> 'ye göre duyarlılık testlerinin istatistiksel analizleri	20
4.2. Yaz Mevsimi için Mikrobiyal Profilleme Çalışmaları.....	22

4.2.1. Yaz mevsimi için bakteri izolatlarının eldesi	22
4.2.2. Yaz mevsimi bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri.....	22
4.2.3. Yaz mevsimi için seçilen izolatlardan PZR ve agaroz jel elektroforezi....	24
4.2.4. Yaz mevsiminde seçilen izolatlardan yapılan sekans analizi	24
4.2.5. Yaz mevsimi bakteri izolatlarının çoklu antibiyotik direnci	25
4.2.6. Yaz mevsiminde çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların <i>E. coli</i> 'ye göre duyarlılık testlerinin istatistiksel analizleri	26
4.3. Mevsimsel Karşılaştırmalar.....	28
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇLAR	35
7. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Boğçay’ın (Antalya) denize döküldüğü alandaki çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin yaz ve kış mevsimlerinde karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/12/2020

Side Selin Su YİRMİBEŞOĞLU

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µg/ml	: Bir ml solüsyonda µg cinsinden bulunan madde miktarı
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
M	: Molar
.	: Ondalık ayracı (nokta)
°C	: Santigrad derece
±	: Standart sapma
%	: Yüzde

Kısaltmalar

16S rDNA	: 16S ribozomal RNA sekansını kodlayan DNA sekansı
<i>A. baumannii</i>	: <i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. junii</i>	: <i>Acinetobacter junii</i>
<i>A. venetianus</i>	: <i>Acinetobacter venetianus</i>
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Amp	: Ampisilin
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BLAST	: Basit Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
<i>C. gracilis</i>	: <i>Curvibacter gracilis</i>

<i>C. taeanense</i>	: <i>Chryseobacterium taeanense</i>
CDC	: Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrolü ve Önlenmesi Merkezi (Center for Disease Control and Prevention)
CDDEP	: Hastalık Dinamikleri, Ekonomisi ve Politikaları Merkezi (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy)
COVID-19	: Yeni Tip Koronavirüs
ÇAD	: Çoklu Antibiyotik Direnci
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotittrifosfat
DSÖ (WHO)	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
<i>E. cloacae</i>	: <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Eschericia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	: <i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. ludwigii</i>	: <i>Enterobacter ludwigii</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EMB	: Eosin Metilen Mavisi
EtBr	: Etidyum bromür
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
İmp	: İmipenem
<i>K. aerogenes</i>	: <i>Klebsiella aerogenes</i>
<i>K. pneunoniae</i>	: <i>Klebsiella pneunoniae</i>
Kan	: Kanamisin
Kb	: Kilobaz
Klm	: Kloramfenikol

<i>L. adecarboxylata</i>	: <i>Leclercia adecarboxylata</i>
MDR	: Çoklu ilaç direnci gösteren mikroorganizmalar, Superbug
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
MRSA	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	: Nutrient Agar
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
<i>P. aureginosa</i>	: <i>Pseudomonas aureginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	: <i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. lactis</i>	: <i>Pseudomonas lactis</i>
<i>P. putida</i>	: <i>Pseudomonas putida</i>
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. fonticola</i>	: <i>Serratia fonticola</i>
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>
TAE tamponu	: Trizma, EDTA, asetik asitten oluşan agaroz jel yürütme tamponu
Tet	: Tetrasiklin
UAMDS	: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans
UDSA	: Uluslararası Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağları
UNGA	: Birleşmiş Milletler Genel Kurulu (United Nations General Assembly)
VISA	: Vankomisin-azalmış duyarlılık gösteren <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	: Vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Y. frederiksenii</i>	: <i>Yersinia frederiksenii</i>

Y. intermedia : *Yersinia intermedia*

Y. kristensenii : *Yersinia kristensenii*



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ABD’de satılan tıbbi açıdan önemli antibiyotikler.....	6
Şekil 2.2. Genel hatlarıyla antibiyotik direnci döngüsü.....	9
Şekil 3.1. Kış ve yaz mevsimlerinde su örneklerinin toplandığı noktanın (a) uydu; (b) harita görüntüsü.....	11
Şekil 3.2. Tanılama için kullanılan universal primerler ve tanılamada kullanılan değişim bölgeleri.....	13
Şekil 4.1. Kış mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen (a) Genomik DNA örneklerine (b) PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	18
Şekil 4.2. Kış mevsiminde moleküler tanılaması yapılan izolatların soy ağacı.....	19
Şekil 4.3. Kış örneklerinin (a)ampisilin, (b)kanamisin, (c)imipenem, (d)kloramfenikol ve (e)tetrasiklin duyarlılık testi sonuçlarının istatistiksel analizi ..	21
Şekil 4.4. Yaz mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen (a) Genomik DNA örneklerine (b) PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	24
Şekil 4.5. Yaz mevsiminde moleküler tanılaması yapılan izolatların soy ağacı.....	25
Şekil 4.6. Yaz örneklerinin (a)ampisilin, (b)kanamisin, (c)imipenem, (d)kloramfenikol ve (e)tetrasiklin duyarlılık testi sonuçlarının istatistiksel analizi ..	27
Şekil 4.7. Kış ve yaz mevsimi izolatlarından seçilen örneklerin ÇAD indeksi değeri	28
Şekil 4.8. (a)Kış ve (b) Yaz mevsimi izolatlarının ait olduğu türleri gösteren grafik	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. PZR Reaksiyonu karışımı	13
Çizelge 3.2. Genlerin çoğaltılabilmesi için gerekli olan PZR koşulları	14
Çizelge 4.1. Kış mevsimi izolatlarından seçilen örneklerin inhibisyon zon çapları (mm).....	17
Çizelge 4.2. Kış mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen sekans sonuçlarına göre yapılan kimlik tanımlaması	19
Çizelge 4.3. Yaz mevsimi izolatlarından seçilen örneklerin inhibisyon zon çapları (mm).....	23
Çizelge 4.4. Yaz mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen sekans sonuçlarına göre yapılan kimlik tanımlaması	25



1. GİRİŞ

Kelime anlamı olarak canlılığa karşı anlamına gelen antibiyotik, bir mikroorganizmanın ürettiği, diğer mikroorganizmaların yaşamasını ya da büyümesini engelleyen her türlü madde olarak tanımlanmaktadır (Russell 2004). Fakat gelişen sentez teknolojileri ile bu tanım da değişmiştir. Günümüzde, bir mikroorganizmanın ürettiği ya da bu maddeye tamamen veya kısmen benzer, kimyasal sentez ile üretilen, düşük konsantrasyonlarda dahi diğer mikroorganizmaların yaşamasını ya da büyümesini engelleyen her türlü madde antibiyotik olarak tanımlanmaktadır (Russell 2004). Bir mikroorganizmanın antibiyotik üretmesinin en temel nedeni diğer organizmalara karşı seçici avantaj sağlamaktır. Bu tür antibiyotikler doğal antibiyotik olarak sınıflandırılmaktadır (Dewick ve Rohr 1998). Kimyasal yöntemler ile modifiye edilmiş doğal antibiyotikler yarı sentetik olarak sınıflandırılırken, tamamen kimyasal yöntemlerle oluşturulmuş antibiyotikler ise sentetik antibiyotik olarak sınıflandırılmaktadır (Raynor 1997; Fair ve Tor 2014). Mikroorganizmalar tarafından üretilen 60.000-80.000 doğal metabolit mevcuttur ve bunların %47'si biyoaktivite göstermektedir (Bérdy 2012). Klinikle ilişkilendirildiğinde, insanların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık 200-220 tanesi doğal, 250 tanesi yarı sentetik ve kalan kısmının sentetik antibiyotik olduğu görülmektedir. Her ne kadar sentetik ya da yarı sentetik antibiyotiklerin üretimi için kimyasal yöntemler kullanılsa da bu antibiyotikler genelde doğal antibiyotiklerle kimyasal olarak ilişkilidir ve onlarla benzer görevleri yerine getirebilmeleri için özel olarak üretilmiştir. Bahsi geçen benzer görevler antibiyotiklerin çalışma mekanizmaları olarak da tanımlanmaktadır. Tüm bu özellikler birlikte değerlendirildiğinde, klinikte kullanmak için ideal bir antibiyotik mikroorganizmalara karşı seçici toksisite göstermeli, antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmamalı, kolay çözünebilmeli, enfeksiyon bölgesine kolay ulaştırılabilmesi ve uygun fiyata üretilmelidir.

Antibiyotik direnci ise bakterilerin antibiyotiklerin etkilerine uyum sağlama ve direnç gösterme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Acar ve Rostel 2001). Bu tanımlar aynı zamanda antibiyotik direnç mekanizmalarını da özetlemektedir. Bu mekanizmalar temel olarak intrinsik ve kazanılan direnç olarak sınıflandırılmaktadır. Buna ek olarak, antibiyotik direnci mikroorganizmanın çeşitli fiziksel ve biyokimyasal yollar geliştirebilmesi sonucu da oluşabilir. Bahsi geçen mekanizmalar antibiyotik direncinin popülasyonda gelişmesine neden olmaktadır. Bu durum da enfeksiyon hastalıklarının tedavi edilmesini zorlaştırmakta, uzun süren hastalığa ve hatta ölüme sebep olmakta, organ nakli, kanser kemoterapisi, diyabet tedavisi ve ameliyat gibi medikal uygulamaların olduğundan daha tehlikeli hale gelmesine sebep olmaktadır. Ayrıca antibiyotik direncinin, kişinin hastanede geçireceği süreyi uzatarak masrafları arttırması, daha geniş spektrumlu, daha toksik olma gibi özelliklere sahip dolayısıyla da daha pahalı yeni antibiyotiklerin üretimine ihtiyaç duyulması gibi ekonomik boyutları da vardır.

Dünya genelinde antibiyotik direnci oluşumunun döngüsünün temelinde gerek klinikte gerekse veterinerlikte antibiyotiklerin yanlış kullanımı yatmaktadır. Özellikle klinikte viral hastalıklarda, uygun olmayan dozlarda ve sürede, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, hastanın reçete edilen antibiyotiği önerilen şekilde kullanmaması, hastanelerde yetersiz enfeksiyon kontrolü, yetersiz hijyen ve sağlık önlemleri ve hızlı laboratuvar testi eksikliği antibiyotik direncinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Diğer önemli bir neden ise hayvancılıkta antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımıdır. Antibiyotiklerin veterinerlik alanlarında çalışanlar tarafından yanlış ve yaygın

kullanılması ve çiftlik hayvanlarının büyümesini arttırmak için antibiyotiklerin gıda katkısı olarak kullanılması gibi uygulamalar antibiyotik direncinin artmasına sebep olmaktadır. Ekonomik ve biyoteknolojik açıdan bakıldığında, doğal antibiyotiklerin çoğunun bulunmuş olması, farmasötikal şirketlerin antibiyotik geliştirmek için yeni ve daha ucuz stratejiler geliştirmesi ve bürokratik düzenleyici bariyerlerin sıklığı antibiyotik direnci gelişmesine katkı sağlamaktadır.

Klinik anlamda antibiyotik direnci küresel olarak önemsenen ve önüne geçilmek için çabalanan bir konu iken, çevresel bir kirletici olarak antibiyotikler gereken önemi görememektedir. Bunun temel nedeni, antibiyotiklerin doğada düşük konsantrasyonlarda bulunması olarak düşünülmektedir (Kim ve Aga 2007). Bu nedenle özellikle sulama ve içme suyu olarak kullanılan sularda antibiyotik kalıntılarının takip edilmesi önem arz etmektedir. Denize döküldüğü bölgede yüzme ve balık tutma gibi aktivitelerin de gerçekleştiği Boğaçay, konumu, içme ve kullanma sularının ihtiyacının karşılanmasında, tarım arazilerinin sulanmasında kullanılması açısından Antalya ili için büyük önem taşır.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında, Antalya'nın iki önemli akarsuyundan biri ve Konyaaltı kentsel alanının en büyük su kaynağı olan, denize direkt bağlantısı olan, konut alanları ile çevrilmiş olması nedeniyle insan aktivitelerinin içinde yer alan yer üstü suları için iyi bir örnek teşkil eden Boğaçay'dan izole edilen bakterilerden çoklu antibiyotik direncine sahip olanlar mevsimsel bazda tanımlanmış ve klinikle alakalı olanlar tespit edilmiştir. Bu nedenle kış ve yaz mevsimleri arasındaki değişimleri de göz önünde bulundurmak amacıyla şubat (2020) ve ağustos (2020) aylarında Boğaçay'ın denize döküldüğü noktadan (36°51'12.7"N 30°37'39.3"E) alınan su örneklerinde kültüre edilebilen bakterilerin klinikte en çok kullanılan beş antibiyotige (ampisilin, kanamisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve imipenem) karşı olan direnç profilleri belirlenmiş; çoklu antibiyotik direnci olan bakteriler seçilerek moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır. Bu tez çalışması, bu kapsamda Boğaçay merkezli Antalya'da gerçekleştirilen ilk çalışma olmuştur. Böylelikle, hem insansal yaşam alanıyla iç içe olan bir sucul sistemdeki bakterilerin dirençleri ve yayılmaları hakkında bilgi sahibi olunmuş, hem de klinik açıdan önemli olan bakteriler tespit edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Antibiyotikler ve çalışma mekanizmaları

Antibiyotikler mikroorganizmaların bulundukları ortamdaki diğer mikroorganizmalarla rekabet şansını ve dolayısıyla yaşama şansını arttırmak amacıyla ürettikleri doğal maddelerdir. Doğal ekosistemlerde düşük konsantrasyonlarda üretilen antibiyotikler üreten canlı için yararlı iken, bilimsel verilerin ışığında gelişen teknikler yardımıyla yüksek konsantrasyonlarda üretilen ve kullanılan antibiyotiklerin (enfeksiyon hastalıkları tedavisinde olduğu gibi) zararlı etkiler de gösterebilmesinden dolayı, antibiyotiklerin iki yönlü etki gösterdiği söylenebilir (Calabrese 2004; Davies 2006; Martinez 2009).

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre; hücre duvarı inhibitörleri, DNA giraz inhibitörleri, RNA uzaması inhibitörleri, DNA güdümlü RNA polimeraz inhibitörleri, protein sentezi 30S alt birim inhibitörleri, protein sentezi 50S alt birim inhibitörleri, protein sentezi tRNA inhibitörleri, nükleik asit sentezi inhibitörleri, sitoplazmik zar yapısı inhibitörleri, folik asit metabolizması inhibitörleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Madigan vd. 2017). Her antibiyotığın belirli bir çalışma mekanizması olduğundan, antibiyotiklerin hücre içine alımları ve hücre içindeki aktivitelerinin iyi anlaşılması, yeni gelişen direnç mekanizmalarının daha hızlı tanımlanması ve dolayısıyla antibiyotik direncinin önüne geçilmesi ile doğrudan ilişkilidir. Örneğin penisilin grubuna ait β -laktam antibiyotiklerinden olan ampisilin, gram negatif ve bazı gram pozitif bakterilere etki eder. Penisilinden farklı olarak içerdiği amino grubu antibiyotığın *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* gibi gram negatif bakterilerin dış membran zarı üzerindeki porlardan içeri girmesine yardımcı olur. Hücre duvarı yapımında peptid çapraz bağlarının yapılmasından sorumlu olan transpeptidaz enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek hücre duvar oluşumunu engeller (Chudobova vd. 2014). Diğer bir β -laktam antibiyotığı olan ve karbapenem grubuna ait olan imipenem 1970 yılında Merck bilim insanları tarafından geliştirilmiş bir antibiyotiktir (Clissold vd. 1987). İmipenem bakterilerin hücre duvarı oluşumunu engeller (Kesado vd. 1980; Vardakas vd. 2012) ve β -laktam antibiyotiklerin en geniş spektrumlusudur; aerobik ve anaerobik gram negatif ve gram pozitif birçok bakteriyi de içine alan geniş bir etki spektrumu vardır. Antibiyotik direnci olan gram negatif bakterilerin en çok kullandıkları mekanizma olan β -laktamaz enzimine karşı dirençli oldukları için diğer antibiyotiklerin tedavi edemediği enfeksiyon hastalıkların tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir antibiyotiktir. Geniş spektrumlu diğer bir antibiyotik grubu olan tetrasiklinler ise bakteri ribozomlarının 30S alt ünitesine bağlanıp amino açillenmiş t-RNA'nın ribozomun A bölgesine bağlanmasını bloke eder ve böylece yeni amino asitlerin büyüyen peptid zincirine eklenmesini engeller. Tetrasiklinlerin bakteriyostatik etkileri vardır ve ilacın geri çekilmesiyle protein sentezi devam eder. Oldukça az selektif ve en geniş spektrumlu antibiyotiklerdendir (Mehta 2011). Protein sentezi inhibitörleri olarak çalışan bir diğer antibiyotik ise kloramfenikoldür. Kloramfenikol ribozomun 50S alt ünitesindeki 23S rRNA üzerindeki A2451 ve A2452 rezidülerine bağlanıp peptidiltransferaz aktivitesini inhibe ederek peptid zincirinin uzamasını engeller. Geniş spektrumludur ve bakteriyostatik özellik gösterir. Gram negatif bakterilerin çoğuna ve gram pozitif koklara etki eder. Bir diğer antibiyotik grubu ise bakteri hücre membranını aktif transportla geçip, hızlı bakterisid etki gösteren aminoglikozidlerdir. Bir aminoglikozid olan kanamisin diğer aminoglikozidler gibi prokaryotik ribozomların 30S alt birimleri ile etkileşerek sentezlenen peptide yanlış

aminoasit eklenmesine neden olur (Werth 2020). Gram negatif spektrumları nedeniyle *Enterobacter* ve birçok *Pseudomonas* enfeksiyonu tedavisinde klinikte sıklıkla kullanılırlar.

Her antibiyotiğin belirli bir çalışma mekanizması olduğundan, hücre içine alımları ve hücre içindeki aktiviteleri de bu mekanizmalarla doğrudan ilişkilidir. Ayrıca hedef mikroorganizmanın özellikleri de bu noktada önemlidir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yapısal olarak farklılıkları bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilerde kalın bir peptidoglikan tabakası bulunmaktayken, gram negatif bakterilerde bu peptidoglikan tabakası daha ince ve dış membranla sitoplazmik membran periplazmik boşluk ile ayrılmaktadır. Bu yapısal farklılıklar antibiyotiklerin hücre içine alınma mekanizmalarında değişiklik olmasına sebep olmakta ve antibiyotiklerin etkilerini belirlemektedir. Fakat hücre içine alınan antibiyotiklerin kullandığı yollar gram pozitif ve gram negatif bakteriler için aynıdır.

2.2. Antibiyotik direnci ve direnç mekanizmaları

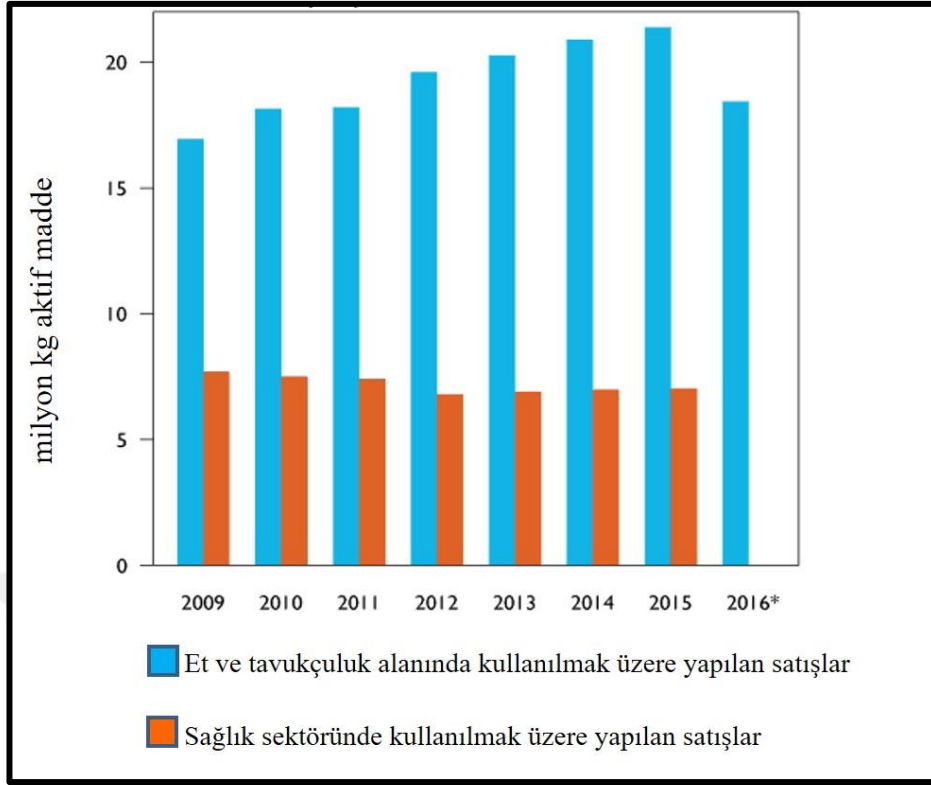
Antibiyotik direnci genel olarak bakterilerin antibiyotiklerin etkilerine uyum sağlama ve direnç gösterme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Acar ve Rostel 2001). Fakat bu tanım bilim dallarına göre derinleştirilebilir. Örneğin antibiyotik direnci, klinikte antibiyotikle tedavi sonrası bakterinin hayatta kalması; farmakolojide bakterilerin önerilen dozda uygulanan antibiyotiğin vücudun farklı bölümlerinde kalan çeşitli miktarlarında hayatta kalması; epidemiyolojide bir antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyonu için normal dağılımından ayırt edilebilen herhangi bir bakteri suşu grubu olması; mikrobiyoloji ve moleküler biyolojide bakterilerin orijinal veya doğal tip bakterilerden daha yüksek bir minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) yöneten bir mekanizmaya sahip olması olarak tanımlanmaktadır (Acar ve Rostel 2001). Bahsi geçen tanımlar aynı zamanda antibiyotik direnç mekanizmalarını da özetlemektedir. Bu mekanizmalar temel olarak intrinsik ve kazanılan direnç olarak sınıflandırılmaktadır. İntrinsik direnç, mikroorganizmanın antibiyotik direnci antibiyotiğin inhibe ettiği yapıya sahip olmama ya da antibiyotiğe karşı geçirgen olmama gibi hücresel özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Kazanılan dirençte ise antibiyotik direnç genlerinin yatay gen transferi gibi olaylarla organizmanın genetik havuza eklenmesi söz konusudur. Bir organizmadan başka bir organizmaya gen aktarımı anlamına gelen yatay gen transferi, bakterilerin direnç kazanmalarını sağlayan temel mekanizmadır (Koonin vd. 2001). Yatay gen transferi transdüksiyon, transformasyon ya da konjugasyonla gerçekleşir. Konjugasyon doğada uzak akraba mikroorganizmalar arasında bile en çok görülen gen transferi yöntemlerinden biridir ve gerçekleşebilmesi için konjugatif plazmide ihtiyaç vardır (Tazzyman ve Bonhoeffer 2014). Bilindiği gibi, konjugatif plazmidler ve transpozonlar sadece yapısal genleri değil, çeşitli ekolojik baskılar altında da hayatta kalmalarını sağlayabilecek genleri de taşırlar (Hong vd. 2014; Turner vd. 2002).

Mikroorganizmaların antibiyotik direnç mekanizmaları bazıları hücreye giren antibiyotiği dışarı geri pompalayabilme yeteneğine sahip olması, antibiyotiği inaktif forma dönüştürebilmesi, antibiyotiğin hedefini modifiye edebilmesi ya da dirençli biyokimyasal yol geliştirebilmesidir. Söz konusu mekanizmalar antibiyotik direncinin popülasyonda gelişmesine neden olmaktadır. Bu durum da enfeksiyon hastalıklarının

tedavi edilmesini zorlaştırmakta, uzun süren hastalığa ve hatta ölüme sebep olmakta (Huemer vd. 2020), organ nakli, kanser kemoterapisi (Subramaniam ve Girish 2020), diyabet tedavisi (Sowndary ve Kavitha 2020) ve ameliyat gibi medikal uygulamaların olduğundan daha tehlikeli hale gelmesine sebep olmaktadır (Friedman vd. 2016). Ayrıca antibiyotik direncinin, kişinin hastanede geçireceği süreyi uzatarak masrafları arttırması, daha geniş spektrumlu, daha toksik olma gibi özelliklere sahip dolayısıyla daha pahalı yeni antibiyotiklerin üretimine ihtiyaç duyması gibi ekonomik boyutları da vardır (Ardal vd. 2020).

2.3. Küresel ve ulusal ölçekte antibiyotik direncine karşı alınan önlemler

Küresel ölçekte, mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin artması gerek insan sağlığı gerekse sosyoekonomik açıdan olumsuz etkiler nedeniyle giderek önem kazanan bir konudur. Bu durum Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından da yakından incelenen bir konudur. DSÖ'ye göre yeni gelişen direnç mekanizmalarının artan bir ivme ile ortaya çıkması ve yayılması enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede ciddi sorunlara yol açmaktadır (World Health Organization-WHO 2020). Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrolü ve Önlenmesi Merkezi'nden (CDC) yapılan açıklamaya göre yaklaşık olarak her yıl 2 milyon kişi çoklu antibiyotik dirençli bakterilerle enfekte olmakta ve bunlardan en az 23.000'i hayatını kaybetmektedir (Center for Disease Control and Prevention-CDC 2020). Klinikte kullanılan antibiyotiklerin tedavi edici etkilerindeki hızlı düşüş, yeni antibiyotiklerin keşfedilmesindeki ve üretimindeki zorluklar, antibiyotik direncinin önüne geçmek için yapılan çalışmaların yetersizliği gibi nedenlerden dolayı antibiyotik direnci konusunda yeni yaklaşımlara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (WHO 2014; Di Cesare vd. 2016). Patojenik mikroorganizmaların direnç geliştirmesi ve bu patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar nedeniyle özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ölüm oranlarının arttığı ve dünyada bu nedenle yılda yaklaşık 214.000 yeni doğan ölümünün gerçekleştiği bilinmektedir (Levy ve Marshall 2004; Palmer ve Kishony 2013). DSÖ'nün güncel olarak dikkat çektiği bu konu, tüm dünyada yankı uyandırmış ve son olarak Birleşmiş Milletler Genel Kurulu (UNGA) tarafından 2016 yılında artan antibiyotik direnci ve bunun etkileri konulu bir toplantı düzenlenmiştir (Laxminarayan vd. 2016). Günden güne ortaya çıkan yeni direnç mekanizmaları, bilinen enfeksiyon hastalıkları ile mücadeleyi zorlaştırırken, bazı durumlarda ölüme bile neden olmaktadır. Tedavi süresi uzayan hastalıklar ve bu hastalıklarla yapılan mücadele aynı zamanda devletler için büyük bir ekonomik yükü de beraberinde getirmektedir (WHO 2020). Ekonomik ve klinik açıdan bakıldığında antibiyotik direncinin etkilediği bir diğer alan ise tarım ve hayvancılıktır. Hastalık Dinamikleri, Ekonomisi ve Politikaları Merkezi'nin (Center for Disease Dynamics, Economics & Policy-CDDEP 2017) verilerine göre 2009 ve 2015 yıllarında hayvancılıkta kullanılması amacıyla satılan antimikrobiyal madde oranı, insan sağlığında kullanılanlardan oldukça fazladır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. ABD’de satılan tıbbi açıdan önemli antibiyotikler (CDDEP, 2017)

Tüm bu nedenler birlikte değerlendirildiğinde, antibiyotik direnci küresel ölçekte önlenmeye çalışılan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle birden fazla antibiyotiğe geliştirilen dirençler olarak tanımlanan çoklu antibiyotik direnci günümüzde antibiyotik direnci konusunda çözüme kavuşturulmaya çalışılan en önemli konudur. Birden fazla antibiyotik direncine sahip mikroorganizmalar çoklu ilaç direnci gösteren (MDR ya da superbug) mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Bu organizmalara örnek olarak β -laktam türü antibiyotiklere dirençli “metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)”, vankomisin bakteristatik etkili olduğu “vankomisine-azalmış duyarlılık gösteren *Staphylococcus aureus* (VISA)”, vankomisin dirençli “vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA)” gösterilebilir. DSÖ de antibiyotik dirençli bakterileri ciddi bir tehdit olarak görmekte ve çoklu direnç gösteren bakterileri virülans ve direnç mekanizmalarına göre acil, ciddi ve endişe verici tehditler olarak sınıflandırmaktadır (WHO 2014; WHO 2017; CDC 2020).

Ülkemizde de global ölçekteki bu sorun göz ardı edilmemiştir. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı bünyesinde Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) ağı ile veriler toplanarak uluslararası Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağları (UDSA) ile karşılaştırılmaktadır. UAMDS verilerine göre 2011 yılında 7493 izolat analize alınırken bu sayı 2017’de 18722’ye çıkmıştır (UAMDSS 2017; UAMDSS 2018). Analiz edilen izolatların içerdiği mikroorganizmalara bakıldığında %25-32 oranında

Eschericia coli, %15-18 oranında *Klebsiella pneunoniae*, %14-15 oranında *Acinetobacter baumannii*, %8-18 oranında *Pseudomonas aureginosa*, %10-22 oranında *Staphylococcus aureus*, %8-11 oranında *Enterococcus faecalis*, %8-12 oranında *Enterococcus faecium* ve %1-2 oranında *Streptococcus pneumoniae* bulunmuştur. Bu bakterilerin en önemli özellikleri çoklu antibiyotik direnci göstermeleridir. Örneğin; 2015 yılında invaziv *Acinetobacter* spp. izolatlarında karbapenem, aminoglikozit ve florokinolon kombinasyonuna direnç oranı Türkiye’de %77’dir. 2012 yılında invaziv *S. aureus* izolatlarında MRSA yüzdesi Türkiye’de %25 iken AB ortalaması % 17.8’dir. Bu oranlar 2015 yılında Türkiye için sabit kalırken AB ortalaması %16.8’e düşmüştür. 2012 yılında invaziv *E. faecium* izolatlarında vankomisin direnci Türkiye’de %17 iken Avrupa Birliği (AB) ortalaması % 8.1’dir. Bu oranlar 2015 yılında Türkiye için %16’ya gerilerken AB ortalaması %8.3’e yükselmiştir. Bu yüksek antibiyotik direncinin önüne geçmek için gereksiz ilaç kullanımından kaçınmak, doğru dozda ve sürede antibiyotik kullanmak, antibiyotik dirençli mikroorganizmaların hızlı tespiti için testler oluşturmak, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için çalışmalar yapmak, direnç kazanılmış antibiyotiklerin kullanımının azaltılması gibi önlemler alınmaktadır. Ülkemizde hastane ve eczanelere uygulanan yaptırımlar ile reçetelerde antibiyotik kısıtlamaları, hastaları kamu spotları ile bilinçlendirme ve antibiyotikleri reçetesiz alamama gibi önlemler alınmıştır. Sadece klinikte değil, ziraat, tarım, hayvancılık gibi alanlarda da antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. İnsan ve hayvan tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerin ziraatte bilinçsizce kullanımı özellikle yüzey ve yer altı suları için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.

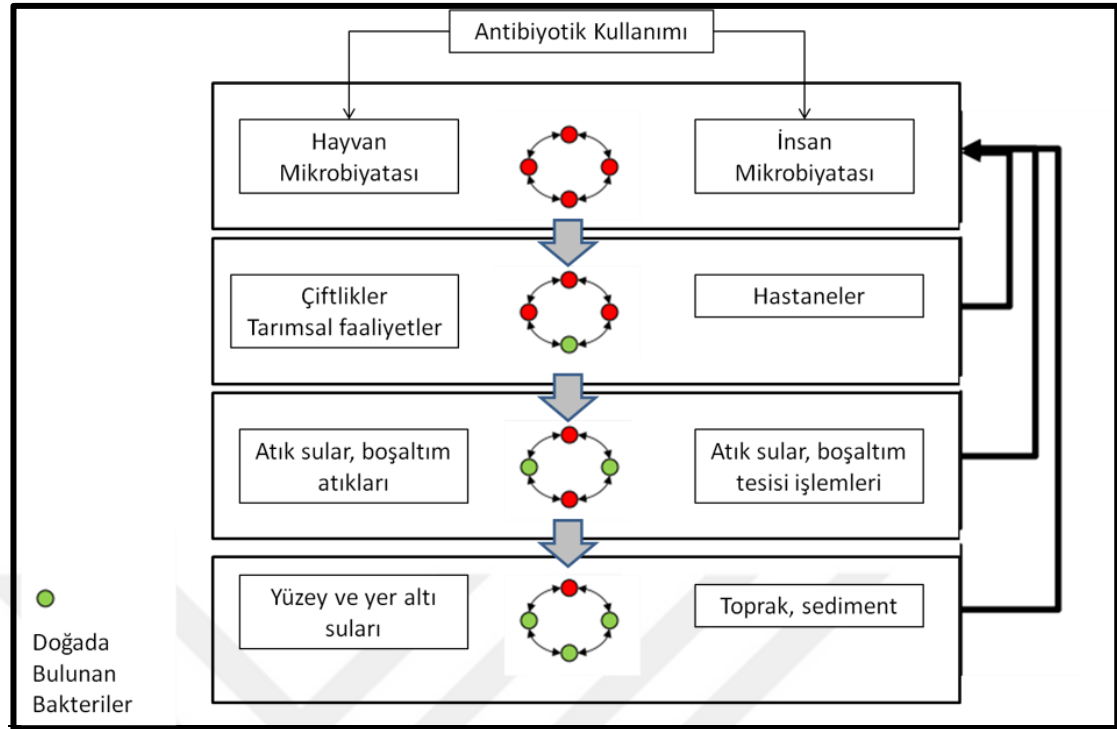
2.4. Çevresel kirleticiler olarak antibiyotikler

Son yıllarda özellikle klinikte antibiyotik direnci önem kazanan bir konu iken bu konunun çevresel etkileri göz ardı edilmektedir. Bunun temel nedenlerinden biri klinikte yüksek dozda kullanılan antibiyotiklerin, doğada kliniğe oranla düşük konsantrasyonlarda bulunmasıdır (Kim ve Aga 2007). Hızla artan endüstriyel aktiviteler, klinik çalışmalar gibi insan aktiviteleri çevresel kirlenmenin temelini oluşturmaktadır (Ravikumar vd. 2017). Çeşitli etkiler sonucu ekolojik alanlarda beklenmedik şekilde hızlı bir artış gösteren ağır metal ve antibiyotik birikimi, doğal floranın da değişmesi sonucunu doğurmaktadır. Bu değişim bazı türlerin tamamen ortadan kalkması ile sonuçlanırken, varlığını devam ettirebilen türleri de gen seviyesinde yeni bir düzenlemeye zorlamaktadır. Antibiyotikler dışında endüstriyel aktiviteler sonucunda oluşan atıkların ortadan kaldırılamaması ve hayvancılıkta kimyasalların bilinçsiz kullanımı gibi nedenlerle ağır metal, inorganik ya da organik atık materyaller gibi toksik maddelerin de çevre kirliliğine neden olduğu bilinmektedir (Mehta vd. 2016). Yer üstü sularının antibiyotikler ve ağır metallerle kirlenmesi sonucunda klinik olmayan ortamlarda da dirençli bakteriler seçilime uğramaktadırlar (Spongberg ve Witter 2008).

Antibiyotiklerin hayvanların tedavisinde ve ziraatte yanlış ve çokça kullanımı, çevreye özellikle de yüzey ve yer altı sularına düzenli olarak antibiyotik bırakılmasına neden olmuştur. Kontamine olmuş bu alanlarda bulunan göllerde, akarsularda ve kıyı şeritlerinde (Gothwal ve Shashidar 2015), son zamanlarda İspanya’da (Valcarcel vd. 2011) ve Çin’de (Huang vd. 2015) musluk sularında bile göz ardı edilemeyecek kadar yüksek miktarda antibiyotik tespit edilmiştir. İnsansal aktiviteler sonucunda doğaya –

özellikle sulara- devamlı olarak bırakılan antibiyotik ve antibiyotik dirençli mikroorganizmalar, direncin uzun süreli kaynaklarından biri olarak gösterilmektedir (Di Cesare vd. 2016). Özellikle antibiyotiklerin insanların tedavisindeki yanlış kullanımlarından elde edilen bilgiler ile hayvanların tedavisinde antibiyotikler daha bilinçli kullanılmaya başlanmış, çiftlik hayvanlarının büyümesini arttırmak için antibiyotiklerin gıda katkısı olarak kullanılmasının önüne geçilmek adına belirli çalışmalar yapılmıştır. Antibiyotiklerin çevresel kirleticiler olarak değerlendirilmesi, antibiyotik direncinin önlenmesi konusunda yeni bir yaklaşımın gelişmesine olanak sağlamıştır. Kısmi olarak işlem görmüş ya da hiç işlem görmemiş lağım sularının doğaya bırakılması, gübreleme gibi tarım ve hayvancılıkla yakından ilişkili insan aktiviteleri doğanın insan ve hayvan kaynaklı dirençli bakterilerin ve direnç genlerinin toplandığı bir hazne olmasına sebep olmaktadır (Akbulut vd. 2014).

Genel hatlarıyla antibiyotik direnci döngüsü hayvan ve insan tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin bu organizmalar içinde tam olarak parçalanamayıp yaklaşık %30 ila %90 oranında dışkılama yolu ile atılması ile başlar (Gao vd 2012). Aynı zamanda dışkılama süresince insan ve hayvan mikrobiyotasında direnç geliştiren mikroorganizmalar hayvancılık ya da antropolojik aktivitelerle atık sular, boşaltım atıkları ve boşaltım arıtma tesisi işlemleri gibi yollarla toprak, sediment, yüzey ve yer altı sularına karışmaktadır. Bu da yatay gen transferi ile doğada hali hazırda bulunan mikroorganizmaların direnç geliştirmesine sebep olmaktadır (Baquero vd 2008) (Şekil 2.2). İnsanlar yüzey sularındaki ve topraklardaki bakterilere, bu alanlarda gerçekleştirdikleri boş zaman aktiviteleri sırasında, iyi arıtılmamış ve temizlenmemiş kontamine suları içme suyu olarak kullandıklarında, kontamine suyla sulanmış ya da kontamine toprakta yetişen sebzeleri tükettiklerinde direkt olarak maruz kalmaktadırlar (Noble vd. 2003; Akbulut vd. 2014). Bu nedenle, mikrobiyal direncin nasıl geliştiğini anlamak için sadece klinik ortamlar değil aynı zamanda doğal yani klinik olmayan ortamlar da incelenmelidir (Martinez 2008; Martinez 2009). Ayrıca mikroorganizmalar ve mikrobiyal ürünlerin, özellikle seyreltik çözeltilerde bulunan çözünmüş metaller için oldukça verimli biyoakümülatörler olduğu bilinmektedir. Endüstride ve evlerde kullanılan kimyasal ve biyolojik ajanlar, ağır metaller, dezenfektanlar ve steril edici maddeler, doğada kolay parçalanmadıklarından ve uzun süre kalabildiklerinden, dirençli mikroorganizmaların seçilimi için devamlı bir baskı oluşturmaktadırlar (Baker-Austin vd. 2006; Stepanauskas vd. 2006; Resende vd. 2012). Bu maddeler, mikroorganizmaların bu tür ortamlarda hayatta kalabilmelerini ve çoğalmalarını sağlayan mutasyonlara neden olmakta, sonuç olarak da dirençli mikroorganizmaların seçilimine yol açmaktadırlar (Baquero vd. 2008). Doğada yüksek oranlarda bozunmadan uzun süre kalabilen bu kirleticiler her ne kadar düşük konsantrasyonlarda bulunsalar da bu kirleticiler için biyoakümülatör konumunda olan mikroorganizmalarda var olan dirençlerin korunması, yatay gen transferi gibi mekanizmalarla çoğalması ya da yeni direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olabilmektedir (Martinez 2009).



Şekil 2.2. Genel hatlarıyla antibiyotik direnci döngüsü (Baquero vd. (2008)'den uyarlanmıştır.)

2.5. Boğaçay özelinde antibiyotik direnci ve çalışmanın amacı

Yer altı ve yer üstü sularının antibiyotikler ve ağır metallerle kirlenmesi sonucunda klinik olmayan ortamlarda da dirençli bakteriler seçilime uğramaktadırlar (Spongberg ve Witter 2008). Bu bağlamda, bakterilerin antimikrobiyal ilaçlara ve toksik metallerle karşı duyarlılıklarının tanımlanması, klinik ve doğadaki bakterilerin birbirleriyle olan ilişkilerini ve özellikle suda yaşayan dirençli bakterilerin yayılma mekanizmalarının anlaşılması açısından önem teşkil etmektedir (Resende vd. 2012). Kuyular vasıtasıyla yeraltı sularından alınarak, arıtılmadan sadece klorlanarak içme suyu şebekesine verilen Antalya kent merkezindeki içme suyunun sağlanmasında Boğaçay önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle Boğaçay'daki antibiyotik kontaminasyonun antibiyotik dirençli bakteriler üzerinden tanımlanması halk sağlığı açısından önem teşkil etmektedir. Antalya içme suyunun alındığı kuyular Duraliler I ve II, Boğaçay, Altınova, Habibler, Otogar Kuyuları, Çakırlar kaynağı ve Gürkavak kaynağı adıyla anılmaktadır (Yıldırım ve Topkaya 2005). Antalya kenti için bu kaynaklar ve civarındaki barajlar dışında başka içme suyu kaynağı bulunmamaktadır. Boğaçay, Antalya Ovası'ndan başlar, Turgut ve Cumalı Dereleri'ni, Karaman Çayı'nı, Doyran Suyu'nu ve Çakırlar Deresi'ni de kendisine katarak Akdeniz'e dökülür. Boğaçay, Antalya'nın Konyaaltı Bölgesi için en önemli su kaynağıdır ve insan aktivitesi ile doğrudan etkileşim halinde olması kentin en büyük su kaynaklarından birinin kirlenme tehdidi ile karşı karşıya olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Boğaçay havzasında yaşanan hızlı kentleşme sürecinde doğal alanlar, kıyılar, açık ve yeşil alanlar, korunacak değerler, su kaynakları fazlasıyla baskı

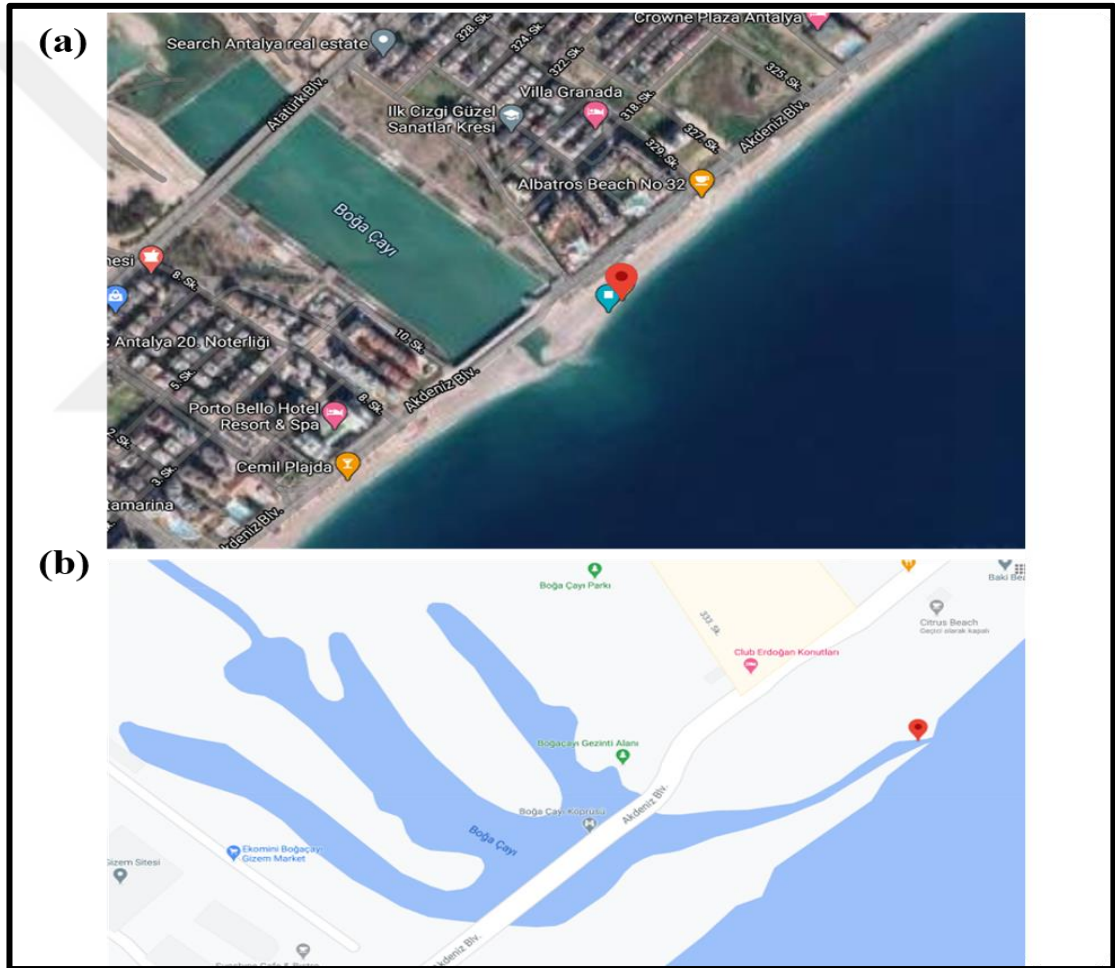
altında kalmıştır (Manavoğlu 2007; Manavoğlu 2009; Yazıcı ve Karagül 2014). Yıldırım ve Topkaya (2005) Boğaçay'ı da içine alan bir arazide yaptıkları çalışmalarında, içme sularının kirlenme potansiyelinin uzaktan algılama ve coğrafi bilgi sistemleri kullanarak incelemişler ve Antalya ilinin içme suyu kaynaklarının ve denizin kirlenme tehdidi altında olduğunu vurgulamışlardır. Yapılan literatür taramasında Antalya'nın iki önemli akarsuyundan biri ve Konyaaltı kentsel alanının en büyük su kaynağı olan, denize direkt bağlantısı ve aynı zamanda konut alanları ile çevrilmiş olması nedeniyle insan aktivitelerinin içinde yer alan yer üstü suları için iyi bir örnek teşkil eden Boğaçay'daki antibiyotik dirençli bakterilerin tanımlanmasının yapıldığı, klinikle ilişkili olanların altının çizildiği ve akarsudaki antibiyotik konsantrasyonunun bakterilerdeki antibiyotik direnci ile direkt ilişkisinin tespit edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle insanların etkileşimde bulunduğu alanlarda dirençli bakterilerin tanımlanması önemlidir. Antalya için büyük öneme sahip Boğaçay'da yapılan bu çalışma insan sağlığı için olduğu kadar, doğal denge için doğru ve efektif çalışmaların yapılması için büyük önem taşımaktadır.

Son yıllarda mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin artması ve bu artışın insan ve hayvan sağlığındaki etkileri konusu oldukça önem kazanmıştır. Özellikle insanlar tarafından yoğun kullanılan yer üstü sularının ağır metal veya antibiyotiklerle kontaminasyonu, zamanla bunlara karşı direnç mekanizmaları geliştiren mikroorganizmaların doğal seçilimine neden olmaktadır. Bu durum da klinikte dirençli olarak bulunan mikroorganizmaların çevresel mikroorganizmalardan köken alması nedeniyle halk sağlığını direkt olarak etkilemektedir. Klinikte antibiyotik kullanımının artması sonucu antibiyotik direncinin yaygınlaşması, doğuracağı sonuçlardan dolayı önem kazanmaktayken; çevre problemleri ve kirlilik nedeniyle oluşan direnç genelde göz ardı edilmiştir. Ancak çok düşük miktarlardaki antibiyotik ve ağır metalin bile mikrobiyal topluluklarda direnç gelişmesi ve yaygınlaşması için yeterli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu tez çalışması antibiyotik direnci konusunda Antalya bölgesi için bilimsel verilerin halkın kullanımına sunulması açısından yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Su Örneklerinin Toplanması

Boğaçay'ın denize döküldüğü noktadan ($36^{\circ}51'12.7''K$ $30^{\circ}37'39.3''D$) şubat (2020) ve ağustos (2020) aylarında örnek alınmıştır (Şekil 3.1). Örnek alınırken bahsedilen noktada, öncelikle 50 ml'lik steril santrifüj tüpler (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) suya daldırıp çıkarılarak 2 kere çalkalanmış, daha sonra tüpler doldurulmuştur. Her mevsim için 4'er tüp örnek alınmıştır. Alınan örnekler buzda ve ışık almayan köpük kapların içinde muhafaza edilerek laboratuvara götürülmüştür. Örnekler laboratuvara getirildiğinde, 4 tüpteki örnekler aynı steril erlene konularak karıştırılmış, su analizi ve mikrobiyal profillemeye için ekimler yapılmıştır.



Şekil 3.1. Kış ve yaz mevsimlerinde su örneklerinin toplandığı noktanın (a) uydu; (b) harita görüntüsü (Google Haritalardan elde edilmiştir. Erişim: 13.07.2019)

3.2. Bakterilerin İzolasyonu

Alınan su örneklerinden bakteri izolasyonu yapmak için su örneklerinden distile su ile 1:1 ve 1:10 dilüsyonlar hazırlanmış, bunlardan 200 µl alınarak katı Eozin Metilen Mavi (EMB) (Merck Millipore, Almanya) ve Nutrient Agar (NA) (Sigma Aldrich, ABD) besi yerlerine yayma plak yöntemi ile ekilmiştir. Ekilen petriler 4 gün boyunca 30°C sıcaklıkta büyümeye bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda büyüyen kolonilerden morfolojik olarak birbirinden farklı olan koloniler seçilerek tek tek NA besiyerinde büyütülmüş ve bakteri örneklerinin gliserollü stokları yapılmıştır (Akbulut vd. 2014).

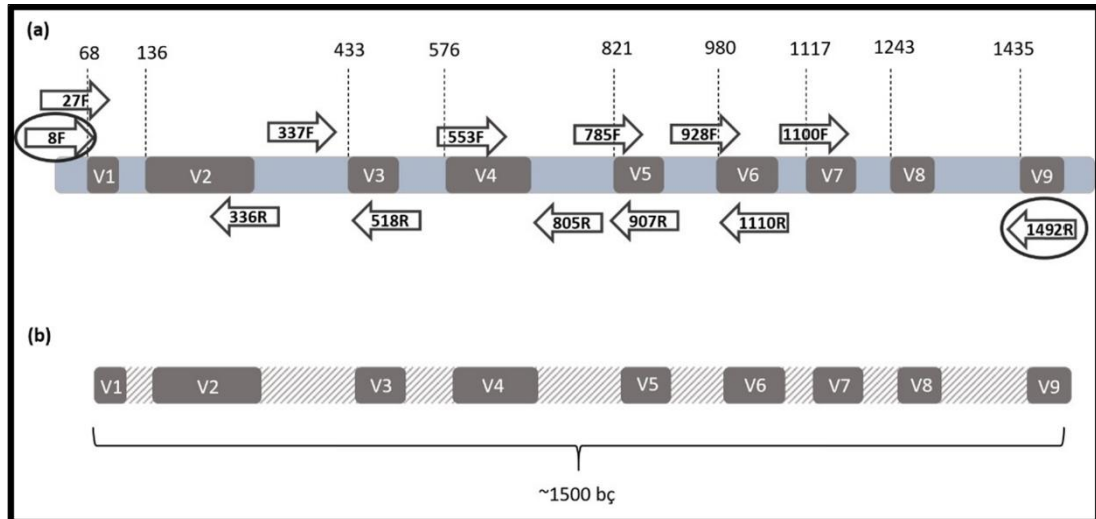
3.3. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu

Deneyssel olarak önemli görülen (birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gösteren) izolatların tanımlanmaları moleküler teknikler kullanılarak yapılmıştır. Seçilen izolatlardan genomik DNA eldesi için standardizasyon sağlaması açısından DNA izolasyon kiti (Zymo Research, ABD) üreticinin talimatları takip edilerek kullanılmıştır.

Elde edilen genomik DNA örneklerinin elektroforezi Trizma Base (Sigma Aldrich, ABD), Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma Aldrich, ABD), ve glasiyel asetik asit (Merck Millipore, Almanya) ile hazırlanan TAE tamponu ile %1'lik agaroz (Sigma Aldrich, ABD) jel kullanılarak yapılmıştır. Jel elektroforez bitiminde jel etidyum bromür (EtBr) (Sigma Aldrich, ABD) ile boyanmış ve DPR Minibis Pro Bio Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, İsrail) ile görüntülenmiştir.

3.4. 16S Ribozomal RNA Gen Bölgelerinin (rDNA) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

Şubat (2020) ve ağustos (2020) aylarına ait su örneklerinden elde edilen çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların tanımlanması için hedef bölge olarak bakteri sistematığı açısından önemli olan 16S ribozomal RNA gen bölgesi (rDNA) seçilmiştir. Bu bölgenin PZR ile çoğaltılması için evrensel primerler (ileri primer olarak 8F, geri primer olarak 1492R) kullanılmıştır (Eden vd. 1991; Içgen ve Yılmaz 2014). Bu iki primerin seçilmesindeki temel amaç, bu primerlerle yapılan çoğaltma işlemi sonrası elde edilen 16S ribozomal RNA gen bölgelerinin (rDNA) tüm değişken bölgeleri içermesidir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tanılama için kullanılan evrensel primerler ve tanılamada kullanılan değişim bölgeleri **(a)** Tanılama için kullanılan evrensel primerler ve bu çalışmada kullanılan primerleri gösteren diyagram **(b)** Bu çalışmada kullanılan primerler ile elde edilen PZR ürünlerinin içerdiği değişken bölgeleri gösteren diyagram

Bu evrensel ileri (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve geri (5'-GGTGTGTTGATTGTTACGACTT-3') primerler (Sentebiolab, Türkiye) kullanılarak PZR reaksiyonu karışımı Çizelge 3.1'e göre hazırlanmış, Çizelge 3.2'deki koşullarla Biorad T100 Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazında PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Raja vd. 2009; Aktan vd. 2013).

Çizelge 3.1. PZR Reaksiyonu karışımı

Karışım reaktifi	Miktar
Taq Tampon Solüsyonu (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
İleri Primer (10 µM)	0,5 µl
Geri Primer (10 µM)	0,5 µl
dNTP karışımı (10 mM)	0,5 µl
Genomik DNA	0.5 µl
Taq polimeraz enzimi	0,5 µl
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	17,5 µl
Toplam	25 µl

Çizelge 3.2. Genlerin çoğaltılabilmesi için gerekli olan PZR koşulları

	<i>Sıcaklık</i>	<i>Süre</i>	
<i>İlk denaturasyon</i>	95 °C	10 dak	
<i>Denaturasyon</i>	95 °C	1 dak	} 30 döngü
<i>Primer yapışması</i>	47 °C	1 dak	
<i>Uzama</i>	72 °C	1 dak	
<i>Son Uzama</i>	72 °C	10 dak	

3.5. 16S rDNA PZR Ürünlerinin Elektroforezi ve Sekans Analizleri

Yükleme boyası (Bioline, ABD) ile karıştırılan PZR ürünleri karıştırılarak, TAE tamponu ile hazırlanan %1.5'luk agaroz jelde, elektroforez sistemi 90 volta ayarlanarak 75 dak yürütülmüştür. DNA merdiveni olarak Hyperladder 1 Kb (Bioline, ABD) kullanılmıştır. Yürütme işleminden sonra jel, EtBr (Sigma Aldrich, ABD) ile boyanmış ve DPR Minibis Pro Bio Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, İsrail) ile görüntülenerek, bilgisayar ortamında analiz edilmiştir.

Hedef bantlar jel ekstraksiyon kiti (Zymo Research, ABD) kullanılarak üreticinin yönergelerine göre saflaştırılmıştır. Saflaştırılan PZR ürünleri hizmet alımı ile çift yönlü DNA sekans analizleri yapılmak üzere (BM Labosis, Türkiye) gönderilmiştir. Elde edilen DNA sekansı sonuçları Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information-NCBI) bilgi bankası Basit Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool-BLAST) programı kullanılarak analiz edilmiş ve izolatların tanımlamaları yapılmıştır. 16S rDNA sekansları tahsis edilen NCBI numaralarıyla BankIt aracılığıyla GenBank veribankasına (Benson ve Karsch-Mizrachi 2000) girilmiştir.

3.6. Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

Şubat (2020) ve ağustos (2020) aylarında alınan su örneklerinden elde edilen izolatların antibiyotik toleransının belirlenmesi için, disk difüzyon metodu kullanılmıştır (Bauer ve Kirby 1966). Her mevsim için elde edilen izolatların gliserollü stoklarından NA besiyerine ekim yapılmış ve 30°C sıcaklıkta büyütülmüştür. Bu yeni büyütülen hücrelerden 0.05 M NaCl (Sigma Aldrich, ABD) solüsyonu içerisinde 0.5 McFarland yoğunluğunda dilüsyon yapılmış, hücreler petri kaplarına yayma yöntemiyle ekilmiş ve üzerlerine çeşitli konsantrasyonlardaki antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri (Bioanalyse, Türkiye) ise ampisilin (10 µg/ml), tetrasiklin (30 µg/ml), kloramfenikol (30 µg/ml), kanamisin (30 µg/ml) ve imipenem (30 µg/ml)'dir. Bu disklerin içerdiği antibiyotik konsantrasyonları klinikte en çok kullanılan

konsantrasyonlar olacak şekilde ve uluslararası standartlarda kullanılan referans konsantrasyonlar göz önünde bulundurularak seçilmiştir (EUCAST 2020a; EUCAST 2020b, Saba vd. 2011).

Bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi için örnekler 4 gün boyunca 30 °C’de büyütülmüş ve katı besiyeri üzerinde oluşan inhibisyon zonu milimetrik olarak ölçülüp kaydedilmiştir. Her bir deney 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada β -laktamaz aktivitesi bulunan *Escherichia coli* (ATCC 35218) suşu referans suş olarak kullanılmıştır. Örneklerin çoklu antibiyotik direnci (ÇAD) indeksi değerleri 3.1’e göre hesaplanmıştır (Kayış Büyükkaya vd. 2016):

$$\text{ÇAD} = \frac{\text{Test organizmalarının dirençli olduğu antibiyotik sayısı}}{\text{Toplam denenen antibiyotik sayısı}} \quad (3.1)$$

3.7. İstatistiksel Analizler

Duyarlılık test sonucunda elde edilen verilerin istatistiki analizi Graphpad Prism versiyon 6.04 for Windows (GraphPad Software, ABD) ile yapılmış ve karşılaştırmada Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Bu analize göre $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Soy ağacı analizleri Clustal Omega (Madiera vd. 2019) kullanılarak oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Kış Mevsimi için Mikrobiyal Profilleme Çalışmaları

4.1.1. Kış mevsimi için bakteri izolatlarının eldesi

Kış mevsiminde alınan su örneklerinden (Şubat-2020) yapılan ekimlerde inkübasyon süresi sonunda büyüyen kolonilerden morfolojik olarak birbirinden farklı olan 30'u seçilerek tek tek NA besiyerinde büyütülmüştür. Büyütülen bakterilerin -80 °C'de saklanmak üzere gliserollü stokları yapılmıştır. EMB katı besi yerinden seçilen koloniler şubat ayında alınan örnekleri temsil etmesi bakımından EMB Ş, NA katı besi yerinden seçilen koloniler de NA Ş olarak kısaltılmış ve koloni numarası eklenerek kodlanmıştır. Kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25218 kullanılmıştır.

4.1.2. Kış mevsimi bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri

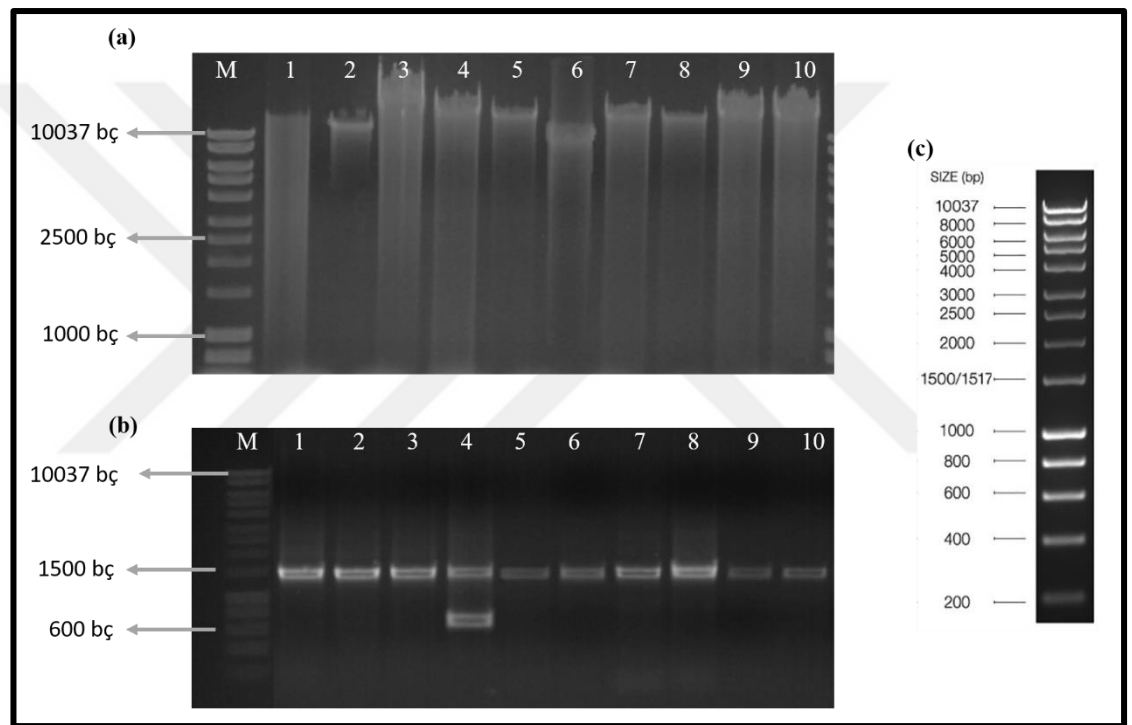
Kış mevsiminde izole edilerek morfolojik olarak birbirinden farklı olduğu için seçilen 30 bakteri izolatının 3 tekrarlı olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda elde edilen ortalama zon çapları ve standart sapma değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Testte kullanılan diskin çapı 6 mm olduğundan zon oluşturmayan örnekler için inhibisyon zonu 6 mm olarak verilmiştir. Yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda antibiyotik direnci gösterdiği tespit edilen örneklerin (EMB Ş2, EMB Ş8, EMB Ş10, NA Ş3, NA Ş7, NA Ş8, NA Ş13, NA Ş15, NA Ş21, NA Ş24) moleküler tanılamaları yapılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kış mevsimi izolatlarından seçilen örneklerin inhibisyon zon çapları (mm) (Amp: Ampisilin, Kan: Kanamisin, İmp: İmipenem, Klm: Kloramfenikol, Tet: Tetrasiklin, Testte kullanılan diskin çapı 6 mm olduğundan zon oluşturmayan örnekler için inhibisyon zonu 6 mm olarak ve çoklu antibiyotik direnci gösteren örneklerin sonuçları koyu yazılarak verilmiştir)

	Amp	Kan	İmp	Klm	Tet
EMB Ş1	17 ± 0	20.5 ± 0.71	47 ± 1.41	38.5 ± 0.71	33.5 ± 0.71
EMB Ş2	6 ± 0	17.5 ± 0.71	26.5 ± 0.71	6 ± 0	24.5 ± 0.71
EMB Ş5	11.5 ± 0.71	20.5 ± 0.71	45 ± 1.41	22.5 ± 0.71	30.5 ± 0.71
EMB Ş8	6 ± 0	6 ± 0	36.5 ± 0.71	33.5 ± 0.71	28.5 ± 0.71
EMB Ş10	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	32 ± 0.71	27.5 ± 0.71
NA Ş1	26.5 ± 0.71	22.5 ± 0.71	52.5 ± 2.12	40.5 ± 0.71	40.5 ± 0.71
NA Ş2	27.5 ± 0.71	21.5 ± 0.71	55 ± 1.41	41.5 ± 0.71	37.5 ± 0.71
NA Ş3	6 ± 0	6 ± 0	35 ± 0	29.5 ± 0.71	30 ± 0
NA Ş4	21 ± 0	21.5 ± 0.71	44.5 ± 0.71	36.5 ± 0.71	30 ± 0
NA Ş5	10 ± 0	16 ± 0	47 ± 1.41	29.5 ± 0.71	24.5 ± 0.71
NA Ş6	11 ± 0.71	17 ± 0.71	45.5 ± 1.41	28 ± 0.71	24 ± 0.71
NA Ş7	6 ± 0	24.5 ± 0.71	35 ± 2.12	20.5 ± 0.71	6 ± 0
NA Ş8	6 ± 0	6 ± 0	39.5 ± 0.71	33.5 ± 0.71	29.5 ± 0.71
NA Ş9	12.5 ± 2.12	17.5 ± 0.71	47 ± 1.41	33 ± 1.41	27 ± 0
NA Ş10	18.5 ± 0.71	19 ± 1.41	48 ± 1.41	36.5 ± 0.71	30.5 ± 0.71
NA Ş11	41.5 ± 0.71	30.5 ± 0.71	60.5 ± 0.71	38.5 ± 0.71	44.5 ± 0.71
NA Ş12	43 ± 0.71	32 ± 0.71	61 ± 0.71	37.5 ± 0.71	43.5 ± 0.71
NA Ş13	6 ± 0	6 ± 0	30 ± 0	21.5 ± 0.71	21.5 ± 0.71
NA Ş14	20 ± 0.71	23 ± 0.71	43 ± 0.71	38 ± 0.71	31.5 ± 0.71
NA Ş15	6 ± 0	6 ± 0	38.5 ± 0.71	25.5 ± 0.71	22.5 ± 0.71
NA Ş16	51 ± 1.41	30.5 ± 0.71	59 ± 1.41	34.5 ± 0.71	42.5 ± 0.71
NA Ş17	21 ± 0	22.5 ± 0.71	45.5 ± 0.71	37.5 ± 0.71	33.5 ± 0.71
NA Ş18	31 ± 1.41	23.5 ± 0.71	50 ± 0	57 ± 1.41	46 ± 0
NA Ş19	21.5 ± 0.71	6 ± 0	36.5 ± 0.71	40.5 ± 0.71	37.5 ± 0.71
NA Ş20	20 ± 0.71	12.5 ± 0.71	36 ± 0.71	32 ± 0.71	30 ± 0.71
NA Ş21	6 ± 0	26.5 ± 0.71	36 ± 1.41	6 ± 0	26.5 ± 0.71
NA Ş22	17 ± 0.71	18 ± 0.71	24.5 ± 0.71	21 ± 0.71	22 ± 0.71
NA Ş23	17.5 ± 0.71	21.5 ± 0.71	48 ± 1.41	37.5 ± 0.71	32.5 ± 0.71
NA Ş24	6 ± 0	6 ± 0	29.5 ± 0.71	20.5 ± 0.71	20 ± 0
NA Ş25	31.5 ± 0.71	13.5 ± 0.71	39 ± 1.41	23 ± 1.41	29.5 ± 0.71
E. coli	9.5 ± 0.71	20 ± 0	43.5 ± 0.71	13 ± 0	31.5 ± 0.71

4.1.3. Kış mevsimi için seçilen izolatlardan PZR ve agaroz jel elektroforezi

Kış mevsimi için seçilen izolatlardan genomik DNA izolasyonu yapılmış ve bu elde edilen genomik DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.1a). Daha sonra elde edilen genomik DNA örneklerinden 16S ribozomal RNA gen bölgelerinin (rDNA) çoğaltılması için PZR reaksiyonu kurulmuş, reaksiyon sonucunda elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.1b). PZR ürünlerinin yürütüldüğü jelden 16S ribozomal RNA gen bölgelerinin (rDNA) için çoğaltılan hedef bölgeler kesilerek saflaştırılmış ve sekans analizi için hazırlanmıştır.



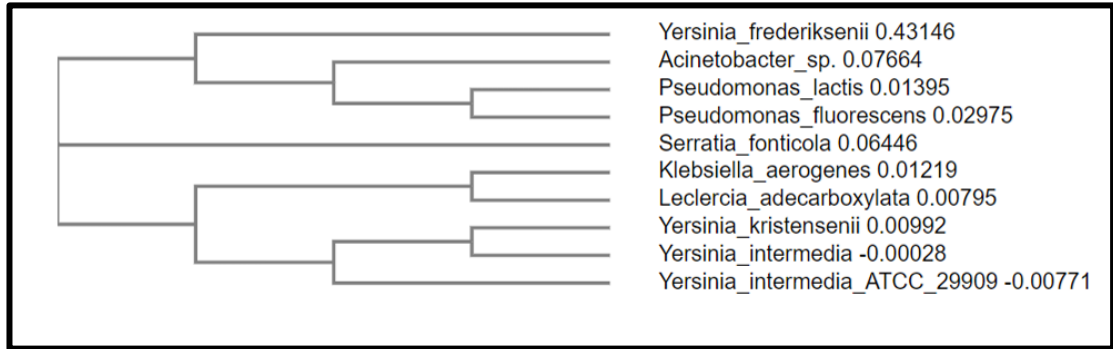
Şekil 4.1. Kış mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen (a) Genomik DNA örneklerine (b) PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (c) Hyperladder DNA merdiveni [M: DNA Merdiveni, 1: EMB Ş2, 2: EMB Ş8, 3: EMB Ş10, 4: NA Ş21, 5: NA Ş24, 6: NA Ş15, 7: NA Ş13, 8: NA Ş8, 9: NA Ş7, 10: NA Ş3]

4.1.4. Kış mevsiminde seçilen izolatlardan yapılan sekans analizi

Sekans analizi sonuçlarından elde edilen tanımlamalar Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kış mevsimi için incelenen çoklu antibiyotik direnci gösteren örneklerin soy ağacı Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Kış mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen sekans sonuçlarına göre yapılan kimlik tanımlaması

Örnek	Kimlik tanımlaması	GeneBank ID
EMB Ş2	<i>Acinetobacter venetianus</i>	MF462948.1
EMB Ş8	<i>Klebsiella aerogenes</i> strain cqsR2-1	MN826568.1
EMB Ş10	<i>Serratia fonticola</i> strain Biosolid 3	CP054160.1
NA Ş3	<i>Pseudomonas lactis</i> strain B35	MN629076.1
NA Ş7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MN256389.1
NA Ş8	<i>Yersinia frederiksenii</i>	CP023964.1
NA Ş13	<i>Yersinia intermedia</i>	CP046294.1
NA Ş15	<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909	KJ606908.1
NA Ş24	<i>Yersinia kristensenii</i> strain ATCC BAA-2637	CP032482.1
NA Ş21	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	MT133354.1



Şekil 4.2. Kış mevsiminde moleküler tanılaması yapılan izolatların soy ağacı

4.1.5. Kış mevsimi bakteri izolatlarının çoklu antibiyotik direnci

Antibiyotik direnci testleri sonucunda çoklu antibiyotik direnci gösteren bakteriler tanımlanmıştır: *Acinetobacter venetianus* (EMB §2), *Klebsiella aerogenes* strain cqsR2-1 (EMB §8), *Serratia fonticola* strain Biosolid 3 (EMB §10), *Pseudomonas lactis* strain B35 (NA §3), *Pseudomonas fluorescens* (NA §7), *Yersinia frederiksenii* (NA §8), *Yersinia intermedia* (NA §13), *Yersinia intermedia* ATCC 29909 (NA §15), *Leclercia adedecarboxylata* (NA §21) ve *Yersinia kristensenii* strain ATCC BAA-2637 (NA §24) (Çizelge 4.2).

Serratia fonticola strain Biosolid 3 örneği test edilen 5 antibiyotikten 3 tanesine (ampisilin, kanamisin ve imipenem) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır. *Klebsiella aerogenes* strain cqsR2-1, *Pseudomonas lactis* strain B35, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia intermedia* ATCC 29909 ve *Yersinia kristensenii* strain ATCC BAA-2637 örnekleri test edilen 5 antibiyotikten 2 tanesine (ampisilin ve kanamisin) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır. *Acinetobacter venetianus* ve *Leclercia adedecarboxylata* örnekleri test edilen 5 antibiyotikten 2 tanesine (ampisilin ve kloramfenikol) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır. *Pseudomonas fluorescens* 5 antibiyotikten 2 tanesine (ampisilin ve tetrasiklin) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

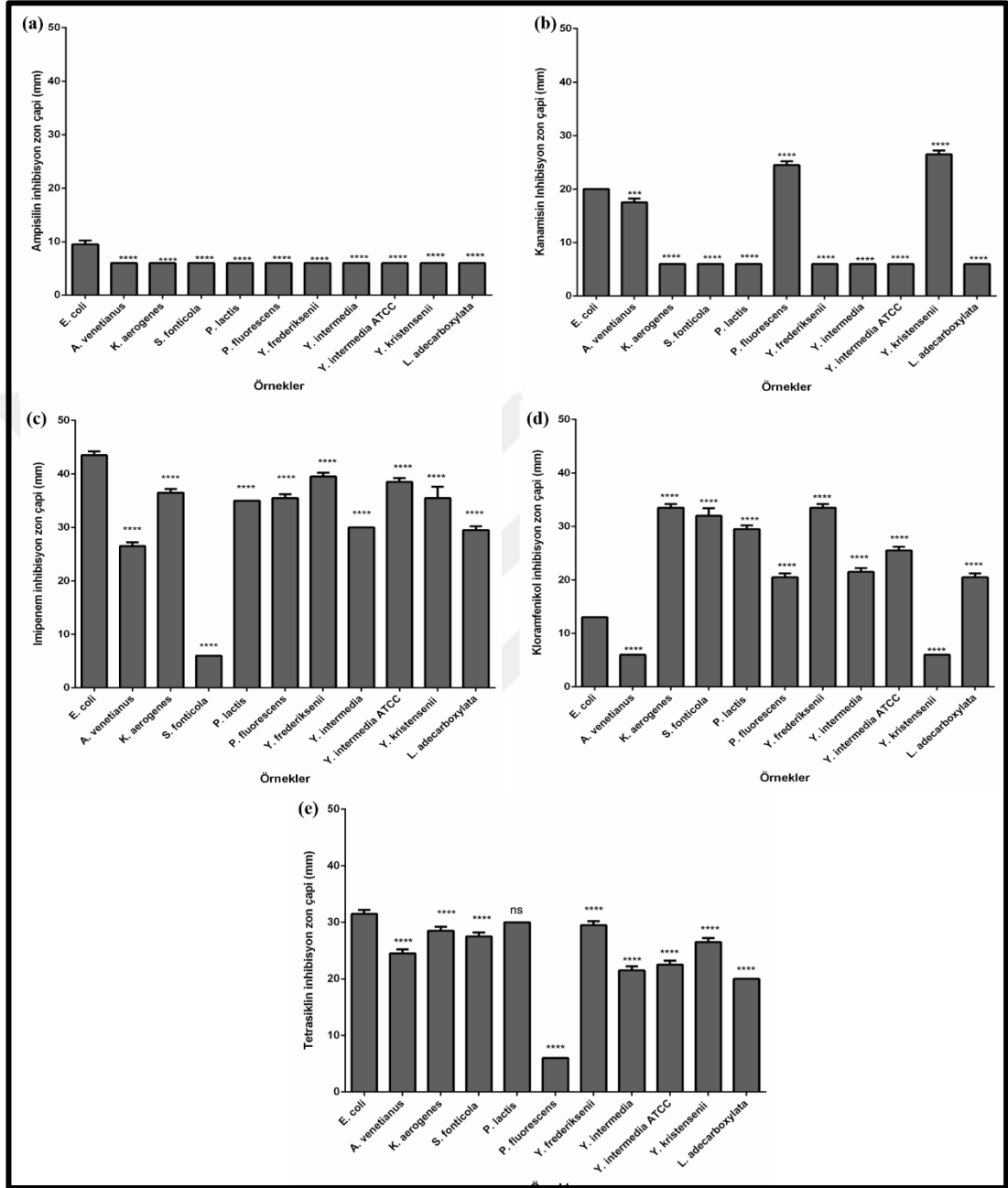
4.1.6. Kış mevsiminde çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların *E. coli*'ye göre duyarlılık testlerinin istatistiksel analizleri

Çizelge 4.1'de seçilen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları gösterilmiştir. Genel olarak seçilen bakteriler en büyük çapa sahip inhibisyon zonlarını imipenemde gösterdikleri için seçilen bakterilerin en duyarlı olduğu antibiyotik imipenemken, en küçük çapta inhibisyon zonlarını ampisilinde gösterdikleri için en dirençli oldukları antibiyotik ampisilindir. Bakterilerin kloramfenikol ve tetrasiklin ile kanamisin ve ampisilin duyarlılıkları benzerdir.

İzolatlardan çoklu antibiyotik direnci gösterdiği tespit edilen örneklerin antibiyotik duyarlılık testi sonuçları istatistiksel analizlerde kullanılmıştır. Bu analizlerde her bir antibiyotik özelinde seçilen hücreler referans suş olan *E. coli*'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiyse " * " ile, istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediyse " ns " ile işaretlenmiştir. " * " sayısının artması istatistiksel olarak anlamlı farkın büyüklüğünü göstermektedir (Şekil 4.3).

İstatistiksel analizlere göre bakteriyel örneklerin ampisilin ve imipeneme karşı oluşturdukları zon çapları *E. coli*'yle kıyaslandığında daha küçüktür ($p < 0.05$). *E. coli*'nin kloramfenikol direncinin *A. venetianus* ve *Y. kristensenii* bakterileri dışında diğer bakterilerden daha yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). *A. venetianus*'un kanamisinli besiyerinde oluşturduğu zon çapı *E. coli*'nin zon çapından daha küçük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır ($p > 0.05$). Yine kanamisine karşı *P. fluorescens* ve *Y. kristensenii* daha duyarlı olarak bulunsa da çalışmada kullanılan diğer bakterilen

kanamisine karşı daha dirençli olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Çalışmada tanımlanan bakterilerin *P. lactis* hariç ($p > 0.05$) istatistiksel olarak kanamisine *E. coli*'ye göre daha dirençli olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kış örneklerinin (a) ampicilin, (b) kanamisin, (c) imipenem, (d) kloramfenikol ve (e) tetrasiklin duyarlılık testi sonuçlarının istatistiksel analizi (*: istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ve “*” sayısı arttıkça fark büyümektedir; ns: istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur)

4.2. Yaz Mevsimi için Mikrobiyal Profillemeye Çalışmaları

4.2.1. Yaz mevsimi için bakteri izolatlarının eldesi

Yaz mevsiminde alınan su örneklerinden (Ağustos-2020) yapılan ekimlerde inkübasyon süresi sonunda büyüyen kolonilerden morfolojik olarak birbirinden farklı 30'u seçilerek tek tek NA besiyerinde büyütülmüştür. Büyütülen bakterilerin -80 °C'de saklanmak üzere gliserollü stokları yapılmıştır. EMB katı besi yerinden seçilen koloniler ağustos ayında alınan örnekleri temsil etmesi bakımından EMB A, NA katı besi yerinden seçilen koloniler de NA A ve koloni numarası olacak şekilde kodlanmıştır. Kontrol grubu olarak *E. coli* ATCC 25218 suşu kullanılmıştır.

4.2.2. Yaz mevsimi bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri

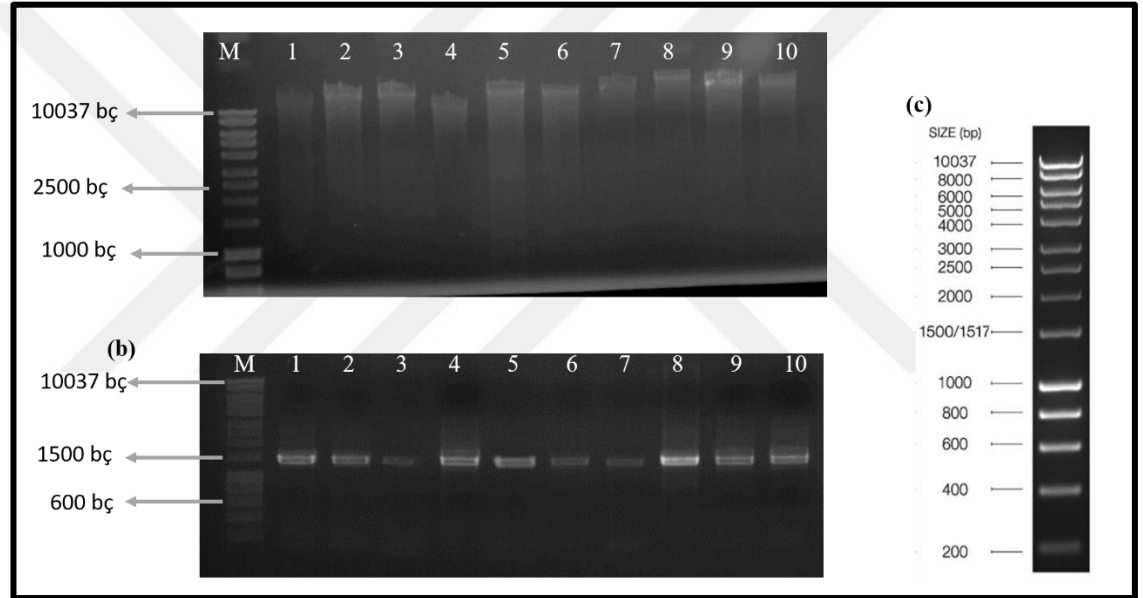
Yaz mevsiminde izole edilerek morfolojik olarak birbirinden farklı olduğu için seçilen 30 bakteri izolatının 3 tekrarlı olarak yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda elde edilen ortalama zon çapları ve standart sapma değerleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Testte kullanılan diskin çapı 6 mm olduğundan zon oluşturmayan örnekler için inhibisyon zonu 6 mm olarak verilmiştir. Yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda çoklu antibiyotik direnci gösterdiği tespit edilen örneklerin (EMB A3, EMB A5, NA A1, NA A9, NA A10, NA A14, NA A16, NA A21, NA A23 ve NA A43) moleküler tanılamaları yapılmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Yaz mevsimi izolatlarından seçilen örneklerin inhibisyon zon çapları (mm) (Amp: Ampisilin, Kan: Kanamisin, İmp: İmipenem, Klm: Kloramfenikol, Tet: Tetrasiklin, Testte kullanılan diskin çapı 6 mm olduğundan zon oluşturmeyen örnekler için inhibisyon zonu 6 mm olarak ve çoklu antibiyotik direnci gösteren örneklerin sonuçları koyu yazılarak verilmiştir)

	Amp	Kan	İmp	Klm	Tet
EMB A1	23.5 ± 1.41	18.5 ± 0.71	25.5 ± 0.71	28.5 ± 0.71	25 ± 0.71
EMB A2	12.5 ± 0.71	20.5 ± 0.71	45 ± 1.41	22.5 ± 0.71	30.5 ± 0.71
EMB A3	6 ± 0	14 ± 0	18.5 ± 0.71	21.5 ± 0.71	6 ± 0
EMB A4	72 ± 2.82	35 ± 1.41	61 ± 1.41	41 ± 1.41	37 ± 1.41
EMB A5	6 ± 0	6 ± 0	23.5 ± 0.71	19.5 ± 0.71	18.5 ± 0.71
NA A1	6 ± 0	6 ± 0	30 ± 1.41	20.5 ± 0.71	22.5 ± 0.71
NA A2	6 ± 0	15 ± 0	21 ± 1.41	20.5 ± 0.71	19.5 ± 0.71
NA A3	6 ± 0	15.5 ± 0.71	11 ± 0	30.5 ± 0.71	28.5 ± 0.71
NA A4	6 ± 0	15 ± 0	11.5 ± 0.71	32.5 ± 0.71	24.5 ± 0.71
NA A5	6 ± 0	15.5 ± 0.71	25.5 ± 0.71	23.5 ± 0.71	21 ± 0
NA A7	6 ± 0	14.5 ± 0.71	26.5 ± 0.71	24.5 ± 0.71	20.5 ± 0.71
NA A8	6 ± 0	18.5 ± 0.71	47 ± 1.41	36.5 ± 0.71	29.5 ± 0.71
NA A9	6 ± 0	18 ± 0	43 ± 1.41	6 ± 0	19.5 ± 0.71
NA A10	6 ± 0	15.5 ± 0.71	26.5 ± 0.71	23.5 ± 0.71	6 ± 0
NA A11	6 ± 0	14.5 ± 0.71	9.5 ± 0.71	30 ± 0	22.5 ± 0.71
NA A12	6 ± 0	13 ± 0	9.5 ± 0.71	29.5 ± 0.71	10 ± 0
NA A13	6 ± 0	13.5 ± 0.71	45 ± 1.41	23.5 ± 0.71	25.5 ± 0.71
NA A14	6 ± 0	17.5 ± 0.71	41.5 ± 0.71	6 ± 0	25.5 ± 0.71
NA A15	22.5 ± 0.71	16.5 ± 0.71	40.5 ± 0.71	27.5 ± 0.71	26.5 ± 0.71
NA A16	6 ± 0	6 ± 0	20.5 ± 0.71	6 ± 0	16.5 ± 0.71
NA A18	32 ± 2.82	25 ± 1.41	65 ± 1.41	47 ± 1.41	43 ± 1.41
NA A20	23.5 ± 0.71	6 ± 0	35.5 ± 0.71	25.5 ± 0.71	28.5 ± 0.71
NA A21	6 ± 0	6 ± 0	20.5 ± 0.71	6 ± 0	16.5 ± 0.71
NA A22	34.5 ± 0.71	15.5 ± 0.71	40.5 ± 0.71	22.5 ± 0.71	23.5 ± 0.71
NA A23	6 ± 0	16.5 ± 0.71	17.5 ± 0.71	19.5 ± 0.71	6 ± 0
NA A34	12.5 ± 0.71	6 ± 0	25 ± 1.41	33.5 ± 0.71	31.5 ± 0.71
NA A39	18.5 ± 0.71	19 ± 1.41	33.5 ± 0.71	23.5 ± 0.71	23.5 ± 0.71
NA A43	6 ± 0	13 ± 0	43.5 ± 0.71	39.5 ± 0.71	6 ± 0
NA A44	43.5 ± 0.71	18.5 ± 0.71	51 ± 1.41	42.5 ± 0.71	33.5 ± 0.71
NA A49	32.5 ± 0.71	23 ± 1.41	50.5 ± 0.71	45.5 ± 0.71	35.5 ± 0.71
<i>E. coli</i>	6 ± 0	17.5 ± 0.71	47.5 ± 0.71	16.5 ± 0.71	36.5 ± 0.71

4.2.3. Yaz mevsimi için seçilen izolatlardan PZR ve agaroz jel elektroforezi

Yaz mevsimi için seçilen izolatlardan genomik DNA izolasyonu yapılmış ve bu elde edilen genomik DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.4a). Daha sonra elde edilen genomik DNA örneklerinden 16S ribozomal RNA gen bölgelerinin (rDNA) çoğaltılması için PZR reaksiyonu kurulmuş, reaksiyon sonucunda elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile yürütüldükten sonra görüntülenmiştir (Şekil 4.4b). PZR ürünlerinin yürütüldüğü jelden 16S ribozomal RNA gen bölgelerinin (rDNA) için çoğaltılan hedef bölgeler kesilerek saflaştırılmış ve sekans analizi için hazırlanmıştır.



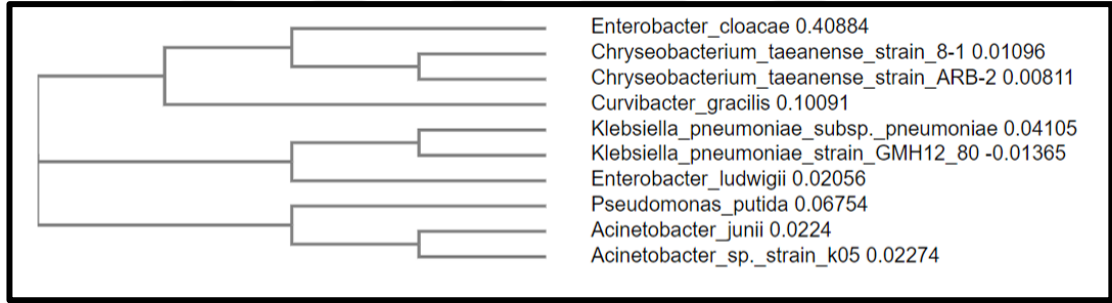
Şekil 4.4. Yaz mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen **(a)** Genomik DNA örneklerine **(b)** PZR ürünlerine ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü **(c)** Hyperladder DNA merdiveni (M: DNA Merdiveni, Genomik DNA örnekleri 1: NA A16, 2: NA A21, 3: NA A1, 4: NA A10, 5: NA A14, 6: NA A23, 7: NA A43, 8: NA A9, 9: EMB A3, 10: EMB A5)

4.2.4. Yaz mevsiminde seçilen izolatlardan yapılan sekans analizi

Sekans analizi sonuçlarından elde edilen tanımlamalar Çizelge 4.4'te özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yaz mevsimi için incelenen çoklu antibiyotik direnci gösteren örneklerin soy ağacı Şekil 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Yaz mevsiminde izole edilen bakterilerden elde edilen sekans sonuçlarına göre yapılan kimlik tanımlaması

Örnek	Kimlik tanımlaması	GeneBank ID
EMB A3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	CP003200.1
EMB A5	<i>Enterobacter cloacae</i> strain 3849	CP052870.1
NA A1	<i>Acinetobacter junii</i>	MF462967.1
NA A9	<i>Pseudomonas putida</i> strain E13	MK849864.1
NA A10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain GMH12 80	MN989349.1
NA A14	<i>Enterobacter ludwigii</i>	MT459448.1
NA A16	<i>Chryseobacterium taeanense</i> strain 8-1	JX867761.1
NA A21	<i>Chryseobacterium taeanense</i> strain ARB-2	KC572559.1
NA A23	<i>Acinetobacter sp. strain k05</i>	MT476969.1
NA A43	<i>Curvibacter gracilis</i>	MT254903.1



Şekil 4.5. Yaz mevsiminde moleküler tanılaması yapılan izolatların soy ağacı

4.2.5. Yaz mevsimi bakteri izolatlarının çoklu antibiyotik direnci

Antibiyotik direnci testleri sonucunda çoklu antibiyotik direnci gösteren bakteriler tanımlanmıştır: *Acinetobacter junii* (NA A1), *Pseudomonas putida* strain E13 (NA A9), *Klebsiella pneumoniae* strain GMH12 80 (NA A10), *Enterobacter ludwigii* (NA A14), *Chryseobacterium taeanense* strain 8-1 (NA A16), *Chryseobacterium taeanense* strain ARB-2 (NA A21), *Acinetobacter sp. strain k05* (NA A23), *Curvibacter gracilis* (NA A43), *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (EMB A3) ve *Enterobacter cloacae* strain 3849 (EMB A5) (Çizelge 4.4).

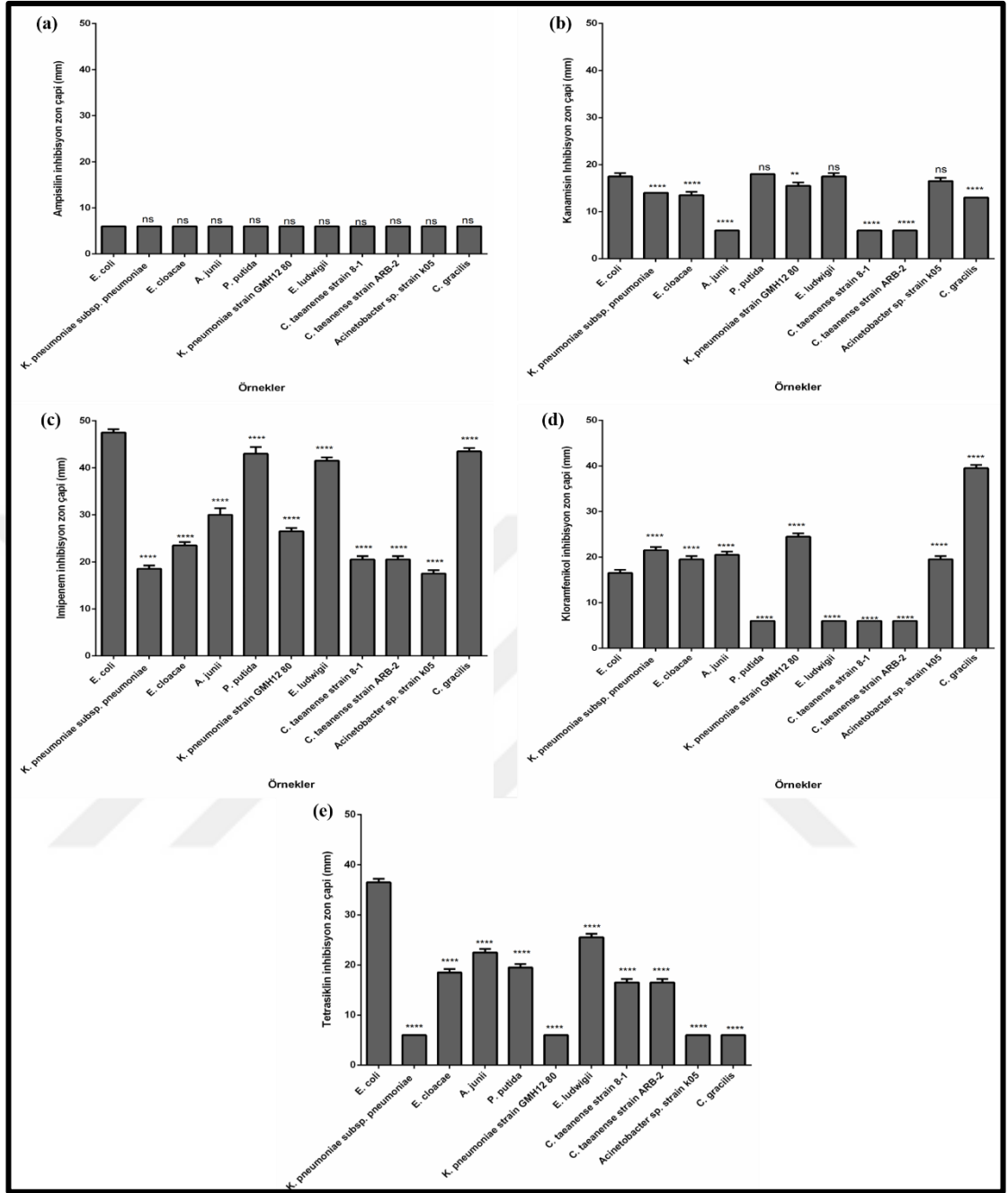
Chryseobacterium taeanense strain 8-1 ve *Chryseobacterium taeanense* strain ARB-2 örnekleri test edilen 5 antibiyotikten 3 tanesine (ampisilin, kanamisin ve kloramfenikol) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır. *Enterobacter cloacae* strain 3849 ve *Acinetobacter junii* örnekleri test edilen 5 antibiyotikten 2 tanesine (ampisilin ve kanamisin) karşı inhibisyon zonu oluşturmamıştır ve çoklu antibiyotik dirençli olarak tanımlanmıştır. *Pseudomonas putida* strain E13 ve *Enterobacter ludwigii* örnekleri test edilen 5 antibiyotikten 2 tanesine (ampisilin ve kloramfenikol) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır. *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* strain GMH12 80, *Acinetobacter sp. strain k05* ve *Curvibacter gracilis* örnekleri 5 antibiyotikten 2 tanesine (ampisilin ve tetrasiklin) karşı inhibisyon zonu oluşturmadığı için çoklu antibiyotik dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

4.2.6. Yaz mevsiminde çoklu antibiyotik direnci gösteren izolatların *E. coli*'ye göre duyarlılık testlerinin istatistiksel analizleri

Çizelge 4.4'te seçilen bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları gösterilmiştir. Genel olarak seçilen bakteriler en büyük çapa sahip inhibisyon zonlarını imipenemde gösterdikleri için seçilen bakterilerin en duyarlı olduğu antibiyotik imipenemken, en küçük çapta inhibisyon zonlarını kanamisinde gösterdikleri için en dirençli oldukları antibiyotik kanamisinidir. Bakterilerin kloramfenikol ve tetrasiklin ile kanamisin ve ampisilin duyarlılıkları benzerdir.

İzolatlardan çoklu antibiyotik direnci gösterdiği tespit edilen örneklerin antibiyotik duyarlılık testi sonuçları istatistiksel analizlerde kullanılmıştır. Bu analizlerde her bir antibiyotik özelinde seçilen hücreler referans suş olan *E. coli*'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterdiyse " * " ile, istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediyse " ns " ile işaretlenmiştir. " * " sayısının artması istatistiksel olarak anlamlı farkın büyüklüğünü göstermektedir (Şekil 4.6).

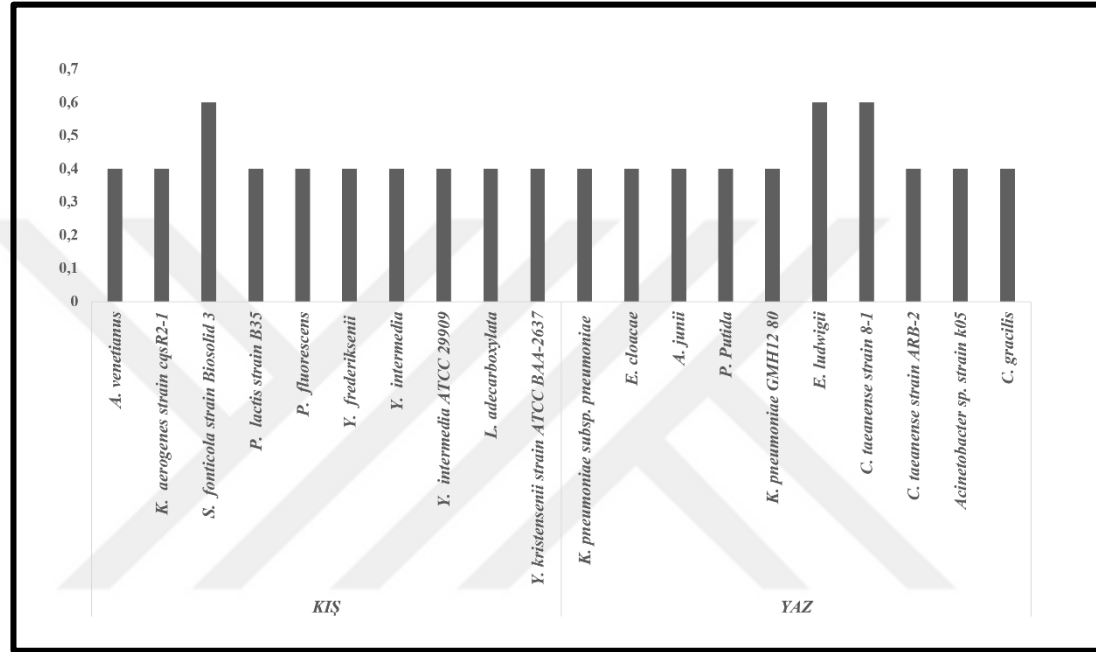
İstatistiksel analizlere göre bakteriyel örneklerin imipenem ve tetrasikiline karşı oluşturdukları zon çapları *E. coli*'yle kıyaslandığında daha küçüktür ($p < 0.05$). Bakteriyel örneklerin ampisiline karşı oluşturdukları zon çapları *E. coli*'yle kıyaslandığında birbirine eşittir ($p > 0.05$). *E. coli*'nin kanamisin direncinin *P. putida* strain E13, *E. ludwigii* ve *Acinetobacter sp. strain k05* bakterileri dışında diğer bakterilerden daha yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). *E. coli*'nin kloramfenikol direncinin *P. putida* strain E13, *E. ludwigii* *C. taeanense* strain 8-1 ve *C. taeanense* strain ARB-2 bakterileri dışında diğer bakterilerden daha yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Yaz örneklerinin (a) ampisilin, (b) kanamisin, (c) imipenem, (d) kloramfenikol ve (e) tetrasiklin duyarlılık testi sonuçlarının istatistiksel analizi (*: istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ve “*” sayısı arttıkça fark büyümektedir; ns: istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur)

4.3. Mevsimsel Karşılaştırmalar

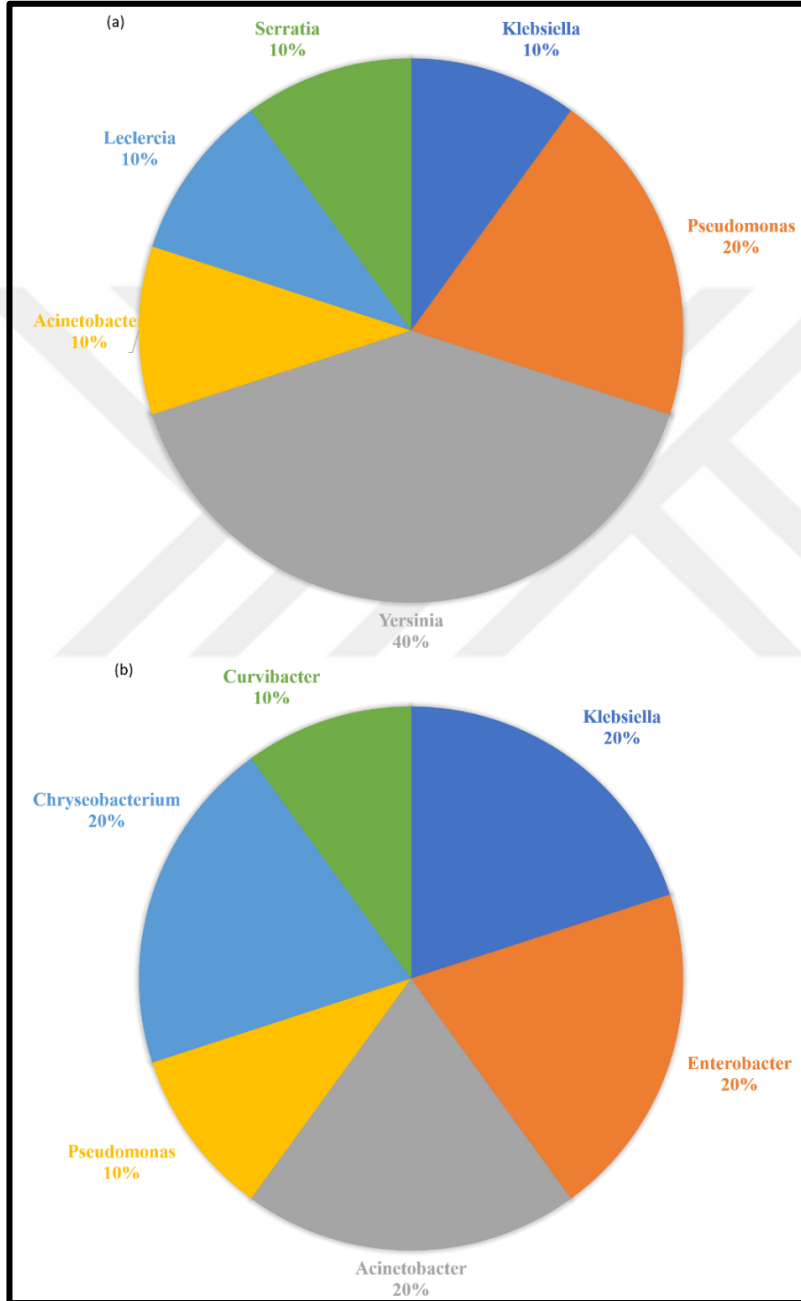
Kış ve yaz mevsimleri için alınan 30’ar örnekten sadece 10’ar örnekte çoklu antibiyotik direnci görülmüştür. Fakat sonuçlara göre tekli ve çoklu antibiyotik direncine sahip örneklerde mevsimsel olarak farklılıklar görülmektedir. Seçilen örneklerin çoklu antibiyotik direnci (ÇAD) değerleri Şekil 4.7’de verilmiştir. Buna göre seçilen örneklerin ÇAD indekslerinin 0.2’den yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Kış ve yaz mevsimi izolatlarından seçilen örneklerin ÇAD indeksi değeri

Çizelge 4.2, Çizelge 4.4, Şekil 4.2 ve Şekil 4.5 birlikte değerlendirildiğinde Boğaçay’ın denize döküldüğü noktada mikrobiyal kompozisyonun mevsimsel olarak değiştiği gözlenmektedir. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.4’e göre her iki mevsimde de incelenen 10 izolatın hepsi Gram negatiftir. Kış mevsimi izolatlarından seçilen 10 örneğin 4 tanesi *Yersinia* türüne, 2 tanesi *Pseudomonas* türüne aittir. Bunların dışında birer örnek *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* ve *Lecleria* türlerine aittir (Şekil 4.9a). Yaz mevsimi izolatlarından seçilen 10 örneğin 2 tanesi *Chryseobacterium* türüne, 2 tanesi *Acinetobacter* türüne, 2 tanesi *Enterobacter* türüne, 2 tanesi ise *Klebsiella* türüne aittir. Diğer örnekler ise *Pseudomonas* ve *Curvibacter* türüne aittir (Şekil 4.8b). Ayrıca Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.4’ten görülebileceği üzere, mevsimsel olarak mikrobiyal kompozisyon genel olarak değişse de her iki mevsimde de tanılanan *Acinetobacter*, *Klebsiella* ve *Pseudomonas* gibi bazı ortak cinsler mevcuttur. Ayrıca Şekil 4.2 ve Şekil 4.5’te gösterilen filogenik ağaçlar incelendiğinde, mevsimler bazında hem aynı türe ait farklı suşların hem de genetik olarak birbirinden ayrı suşların birlikte yaşadığı görülmektedir. Mevsimler birbirleri ile karşılaştırıldığında ise mikrobiyal kompozisyonun tür bazında da değiştiği

görülmektedir. Kış mevsiminde tanılanan izolatlar arasında insan patojeni olmayan örnekler bulunurken, yaz mevsiminde tanılanan izolatlar insan patojeni olarak tanımlanmaktadır. Kış mevsiminde tanılanan izolatlar arasında insan patojeni olmayan örnekler bulunurken, yaz mevsiminde tanılanan izolatlar insan patojeni olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 4.8. (a)Kış ve (b) Yaz mevsimi izolatlarının ait olduğu türleri gösteren grafik

5. TARTIŞMA

Antibiyotik direnci dünya genelinde ciddiyetle ele alınan bir problemdir. Özellikle suların çeşitli antropolojik aktiviteler ile kirletilmesi sularda bulunan mikrobiyal floranın var olan dirençlerini korumalarına, yeni direnç mekanizmaları geliştirmesine ve çoklu direnç sistemlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu tez çalışmasında Antalya ili için önemli bir su kaynağı olan Boğaçay'ın denize döküldüğü noktada mevsimsel farklılıkların gözlemlendiği öncül bir mikrobiyolojik profillem ve antibiyotik direnci araştırması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bu noktada dirençli bakterilerin bulunduğunu, çoklu direnç mekanizmalarının var olduğunu ortaya koymuştur. Antalya özelinde yapılan bu ilk çalışma aslında Türkiye ve dünya genelinde yapılan birçok çalışmadan sadece biridir. Akduman ve arkadaşlarının (2020) yaptığı çalışmaya göre 2015 ve 2019 yılları arasında bakteriyolojik su kalitesi konusunda Türkiye'de 213 adet çalışma yapılmıştır. Aynı zaman diliminde Türkiye'de sucul alanlarda yürütülen sadece 44 adet çalışma mevcuttur (Akduman vd. 2020). Cardak ve arkadaşlarının (2015) çalışmalarında Antalya Körfezi'nde 5 farklı istasyondan (Manavgat, Serik, Yat limanı, Antalya Limanı, Kemer ve Tekirova) izole ettikleri *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* ve *Acinetobacter* türleri bu tez çalışmasında tanımlanan bakterilerle paralellik göstermektedir. Özellikle Boğaçay'ın denize döküldüğü noktaya en yakın istasyon olan Antalya Limanı istasyonundan izole edilen *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* bakterileri her iki çalışmada da ortaktır. (Cardak vd. 2015).

Bu çalışmada yapılan antiyotik direnci testlerinde öncül değerlendirme olarak inhibisyon zonu oluşumu göz önünde bulundurulsa da izole edilen bakterilerin antimikrobiyal direnç durumlarını yorumlamak için kılavuzlar mevcuttur. Bu nedenle yapılan antibiyogramlar ve moleküler tanılama deneyleri birlikte Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi'nin "MİK'lerin ve zon çaplarının yorumlanması için kırılma noktası" (EUCAST 2020a) ve "Uzman kuralları ve içsel direnç tabloları" (EUCAST 2020b) çerçevesinde değerlendirilmelidir. Bu çerçeveden bakıldığında kış mevsiminde izole edilen *Acinetobacter venetianus*, yaz mevsiminde izole edilen *Acinetobacter junii* ve *Acinetobacter sp. strain k05* örnekleri *Acinetobacter* cinsine ait olarak tanımlanmıştır. EUCAST raporlarına göre *Acinetobacter* cinsi üyelerinde penisilin türevi antibiyotiklerde inhibisyon zonu bu türde bulunan doğal direnç nedeniyle görülmeyebilir. Fakat bu çalışmadaki sonuçlarda *Acinetobacter venetianus* ve *Acinetobacter junii*'de bir penisilin grubu antibiyotiği olan ampisilin için inhibisyon zonu gözlemlenmiştir. Yine aynı raporlara göre *Acinetobacter* cinsi bakterilerde imipenem için 24 mm'den büyük zon oluşturduğunda örnekler duyarlı olarak sınıflandırılmaktadır. Buna göre *Acinetobacter venetianus* ve *Acinetobacter junii* örnekleri duyarlı olarak sınıflandırılırken, *Acinetobacter sp. strain k05* örneği dirençli olarak sınıflandırılmaktadır. Bu raporlarda kanamisin, tetrasiklin ve kloramfenikol için önerilen bir zon çapı sınıflandırması bulunmadığı için bu antibiyotikler için EUCAST raporları referans olarak kullanılmamıştır. Moleküler tanılama sonrası *Yersinia* cinsine ait olarak tanımlanan *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia intermedia* ATCC 29909 ve *Yersinia kristensenii* strain ATCC BAA-2637 örneklerinin ve *Serratia* cinsine ait olarak tanımlanan kış örneklerinden *Serratia fonticola* strain Biosolid 3 örneğinin antibiyogramlarından elde edilen sonuçlar da bahsi geçen raporlarla uyumludur. *Pseudomonas lactis* strain B35, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas putida* strain

E13 örnekleri ise *Pseudomonas* cinsine ait bakteriler olarak tanımlanmıştır. EUCAST raporlarına göre *Pseudomonas* cinsi bakteriler için penisilin türevi antibiyotiklerde ortalama 18 mm'den küçük, karbapenem türevi antibiyotiklerde ortalama 20 mm'den küçük, aminoglikozid türevi antibiyotiklerde ortalama 15 mm'den küçük, tetrasiklin türevi antibiyotiklerde ortalama 18 mm'den küçük zon oluşturdıklarında dirençli olarak kabul edilmektedirler. Bu değerlere göre bu örnekler ampisilin dirençli olarak sınıflandırılmaktadır. Yapılan moleküler tanılama deneyleri sonrası *Enterobacteriaceae* familyasının *Klebsiella* cinsine ait olarak sınıflandırılan *Klebsiella aerogenes* strain cqsR2-1, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ve *Klebsiella pneumoniae* strain GMH12 80 örnekleri; *Enterobacteriaceae* familyasının *Enterobacter* cinsine ait olarak sınıflandırılan *Enterobacter cloacae* strain 3849 ve *Enterobacter ludwigii*; *Enterobacteriaceae* familyasının *Leclercia* cinsine ait olarak *Leclercia adecarboxylata*, örneklerinin antibiyogram sonuçları EUCAST verileri ile uyumludur. *Enterobacteriaceae* familyası için penisilin türevi antibiyotiklerde ortalama 14 mm'den küçük, karbapenem türevi antibiyotiklerde ortalama 17 mm'den küçük, aminoglikozid türevi antibiyotiklerde ortalama 18 mm'den küçük, tetrasiklin türevi antibiyotiklerde ortalama 17 mm'den küçük zon oluşturdıklarında dirençli olarak kabul edilmektedirler. Buna göre *Klebsiella pneumoniae* strain GMH12 80 örneği ampisilin ve kanamisin için dirençli olarak sınıflandırılmaktadır. *Flavobacteriales* familyasının *Chryseobacterium* cinsine ait olarak sınıflandırılan *Chryseobacterium taeanense* strain 8-1 ve *Chryseobacterium taeanense* strain ARB-2 örnekleri ve *Comamonadaceae* familyasının *Curvibacter* cinsine ait *Curvibacter gracilis* örneği için EUCAST raporlarında bir sonuç bulunamamıştır. Antibiyogram sonuçlarına göre sınıflandırıldığında ise her ikisi de ampisilin ve kanamisin açısından dirençli olarak sınıflandırılır ve çoklu direnç gösteren örneklerdendir.

Antibiyotik direnci testlerinin ardından bu çalışmanın odak noktası olan elde edilen izolatların çoklu antibiyotik direnci profilleri belirlenmiştir. Kış örneklerinde test edilen 5 antibiyotiğin hepsine dirençli olarak sınıflandırılan örnek yoktur. Kış örneklerinde test edilen örneklerden en fazla 3 antibiyotiğe karşı dirençli olarak sınıflandırılan 1 örnek; en fazla 2 antibiyotiğe karşı dirençli olarak sınıflandırılan 9 örnek bulunmaktadır. Yaz örneklerinde ise 2 örnek en fazla 3 antibiyotiğe karşı, 8 örnek en fazla 2 antibiyotiğe karşı dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Hem antibiyotik başına dirençli olarak tanımlanan izolat sayısı hem de dirençli olarak sınıflandırılan izolatların test edilen 5 antibiyotikten en fazla kaç tanesine dirençli olarak sınıflandırıldığı göz önüne alındığında, yaz örneklerinin kış örneklerinden daha yüksek sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu durum da mevsim değişimi ile antibiyotik direnci profilinin yükseldiği şeklinde yorumlanabilir. Sözü edilen mevsimsel mikrobiyal direnç yükselmesinin altında yatan sebepler irdelenirken değerlendirilecek ilk kriterlerden biri Çoklu Antibiyotik Direnci (ÇAD) indeksidir. ÇAD indeksi bir izolatın test edilen antibiyotikler içinde kaç antibiyotiğe dirençli olduğunu gösteren bir orandır (Krumperman 1983). ÇAD indeksinin eşik değeri 0.2'dir. Eğer bir izolatın ÇAD indeksi 0.2'ye eşit ve altında ise o noktada antibiyotik kullanımının az olduğunu, 0.2'den büyük ise örneklem noktasında antropolojik, tarımsal veya hayvancılık aktiviteleri gibi nedenlerle antibiyotik kirliliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Kayış Büyükkaya vd. 2016). Bu açıdan bakıldığında, örneklerin alındığı Boğaçay'ın denize döküldüğü (36°51'12.7"N 30°37'39.3"D) noktada mevsimden bağımsız bir şekilde ciddi antibiyotik kirlenmesi mevcuttur. Özellikle kış ve yaz mevsimleri karşılaştırıldığında, yaz mevsimindeki kirliliğin kışa oranla fazla olduğu

görülmektedir. Ayrıca içinde bulunduğumuz yılda her ne kadar COVID-19 pandemisi nedeniyle yaz aylarında insan aktiviteleri kısıtlanmış olsa da kış ve yaz mevsimleri arasındaki ÇAD indeksi artışı ciddi boyutlardadır. Bu noktada insan aktiviteleri dışındaki aktiviteler (tarım, hayvancılık ve klinik çalışmalar gibi) antibiyotik atıkları konusunda gözden geçirilmelidir.

Bu çalışmada örnek alınan nokta insanların balık tutma, denize girme gibi aktiviteleri sıklıkla yaptığı bir nokta olması nedeniyle halk sağlığı açısından da önemlidir. Bu çerçeveden bakıldığında bu bölgeden izole edilen çoklu dirence sahip bakterilerin patojen olmaları da durumun altını çizmektedir. Gamma Proteobacteria şubesinden *Pseudomonadales* takımının *Moraxellaceae* familyasına ait olan *Acinetobacter* cinsi, gram-negatif, oksidaz-negatif ve zorunlu aerobik bir bakteri türüdür (Mateo-Estrada 2019). Ek olarak, bu türler biyofilm oluşumu, quorum algılama, oksidatif stres ve antibiyotiklere direnç gibi önemli fizyolojik özelliklere sahiptir (Jung ve Park 2015). *Acinetobacter* cinsi bakterilerin patojen olan ve olmayan türleri mevcuttur (de Berardinis vd. 2009). *Acinetobacter* cinsi bakteriler özellikle antimikrobiyal ajanlara karşı hızla geliştirdikleri direnç mekanizmaları nedeniyle hastane salgınlarında yer alan önemli nozokomiyal patojenler olarak giderek daha fazla kabul görmektedir (Turton vd. 2010; Antunes vd. 2014).

Tanımlanan türler arasında Gamma Proteobacteria şubesinden *Pseudomonadales* takımının *Pseudomonadaceae* familyasına ait olan cins ise *Pseudomonas*'tır. Cinsin üyeleri, büyük bir metabolik çeşitlilik sergiler ve sonuç olarak çok çeşitli nişleri kolonileştirebilirler (Madigan vd. 2017). Uzun yıllardır çalışılan bir cins olması, *in vitro* kültür kolaylıkları ve artan sayıda *Pseudomonas* genom dizileri, bu cinsi bilimsel araştırma için mükemmel bir odak haline getirmiştir. Ayrıca bu cinste görülen metabolik ve fizyolojik açıdan yüksek çok yönlülük, karasal ve sucul habitatlar gibi farklı çevresel koşullara uyumdaki yüksek başarı, biyoteknolojik uygulamalara olanak sağlaması (Palleroni, 1992) ve sadece insan ya da hayvanla sınırlı kalmayan geniş konak kapasitesi ile gösterdiği patojenitesi gibi özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Silby vd. 2011).

Tanımlanan türler arasında Gamma Proteobacteria şubesinden *Enterobacteriales* takımının *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan türler bulunmuştur. Diğer proteobakteriler gibi *Enterobacteriaceae* familyası da gram negatif, fakültatif anaerobtur. Nitratı nitrite çevirebilen türler mevcuttur ve fermentatifler. Çoğu benzer bakterinin aksine *Enterobacteriaceae* familyası, istisnalar olmasına rağmen genellikle sitokrom c oksidazdan yoksundur. *Enterobacteriaceae* familyası, patojen olmayan türleri içerdiği gibi *Salmonella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Shigella* gibi patojenlerin çoğunu içerir (Edwards ve Ewing 1972). Bu çalışmada tanımlanan türler bazında bakıldığında *Enterobacteriaceae* familyasının *Serratia* cinsine ait *Serratia fonticola* içme suyu, toprak ve drenajlar gibi geniş bir çevrede yaşayabilen travma sonrası cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olan alışılmadık bir insan patojeni olarak tanımlanmaktadır (Aljorayid vd. 2016). Çoklu direnç gösteren bir tür olarak literatürde karşımıza çıkmaktadır (Stock vd. 2003).

Bu çalışmada tanımlanan *Enterobacteriaceae* familyasının *Klebsiella* cinsi ise gram negatif, polisakkarid temelli kapsüle sahip çubuk şeklinde bakterilerdir (Pottinger vd. 2004). *Klebsiella* cinsi bakteriler insan florasında burun, ağız ve gastrointestinal

sistemde bulunan fırsatçı patojenlerdir (Strettoti vd. 1984). *Klebsiella* cinsi bakteriler insan dışında birçok hayvan için de fırsatçı patojenler olarak tanımlanmaktadır (Bagley 1985). *Klebsiella* cinsi bakterilerde antibiyotik direnci önemli ve uzun yıllardır çalışılan bir konudur. Casewell ve Phillips (1981) 'in çalışmalarında gösterdiği üzere, *Klebsiella* cinsi içinde %80.8 oranında çoklu antibiyotik direnci mevcuttur. Bu çalışmada tanımlanan *Enterobacteriaceae* familyasının *Enterobacter* cinsine ait diğer türler *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter ludwigii*'dir. *Enterobacter* cinsi, gram negatif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen bakteri sınıfıdır (Adeolu vd. 2016). Bu sınıfa ait patojenik suşlar vardır ve özellikle bağışıklığı baskılanmış ve mekanik ventilasyonda olan hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olur (Tan vd. 2014; Cabral 2010). *Enterobacter cloacae*, son yıllarda bakteremi ve alt solunum yolu, idrar yolu ve karın içi enfeksiyonların yanı sıra endokardit, septik artrit, osteomyelit ve deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu önemli bir nozokomiyal patojen olarak sınıflandırılmaktadır (Sanders ve Sanders 1997; Lee vd. 2002). Ayrıca hem *Enterobacter cloacae*'nin hem de *Enterobacter ludwigii*'nin β -laktam, florokuinolon, aminoglikozid ve tigesiklin türevi antibiyotikler için kullandığı çeşitli direnç mekanizmaları tanımlanmıştır (Mezzatesta vd. 2012). Bu çalışmada tanımlanan türler bazında bakıldığında *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir diğer tür *Leclercia adedecarboxylata*'dır. *Leclercia adedecarboxylata* gram negatif, fakültatif anaerob bir basildir ve doğada geniş bir yaşama alanı vardır (Leclerc 1962). Bu bakteri özellikle bakteriyemi ve kateter enfeksiyonlarında gözlemlenmiştir (Anuradha 2014; Koneman vd.1997; Ölmez vd. 2018; Şafak vd. 2017). Bu çalışmada tanımlanan türler bazında bakıldığında *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir diğer cins *Yersinia*'dır. *Yersinia* cinsi bakteriler gram negatif, fakültatif anaerob kokobasillerdir (Pottinger vd. 2004). Bu cins içinde *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Yersinia enterocolitica* insan patojeni olarak sınıflandırılmaktadır (Butler 2012). Bu patojenler arasında *Y. pestis* veba hastalığına sebep olurken, *Y. pseudotuberculosis* genellikle gastroenterit ve mezenterik adenit vakalarında görülmektedir. *Y. enterocolitica* ise çoğunlukla gastrointestinal enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Baylan ve Abaslı 2005). Bu çalışmada tanımlanan *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* ve *Y. kristensenii* ise *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei* ve *Y. aldovae* ile birlikte non patojen *Yersinia* türleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Bockemühl ve Wong 2003).

Bu çalışmada elde edilen izolatlardan iki tanesi ise *Flavobacteriaceae* familyasına ait *Chryseobacterium* cinsidir. *Chryseobacterium* cinsi kemoorganotrofik, çubuk şeklinde gram negatif, flexirubin tipi pigment nedeniyle tipik sarı-turuncu renkli koloniler oluşturan bakterilerden oluşur (Matu vd. 2019). Bu cins, su kaynakları, toprak, deniz balıkları ve insan konakçılar dahil olmak üzere çeşitli habitatlardan izole edilerek moleküler yöntemler ile tanımlanmış 100'den fazla tür içermektedir (Matu vd. 2019). Genellikle çevresel bakteriler olarak tanımlanmakta olsalar da bitkiler, hayvanlar ve insanlar için patojenik türleri vardır. İnsanlar için olağandışı patojenler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Fakat, nadir durumlarda, özellikle bağışıklığı zayıflamış kişilerde bakteriyemi, peritonit, pnömoni, ampiyem, piyelonefrit, sistit, menenjit ve santral venöz kateter ile ilişkili enfeksiyonlar gibi ciddi durumlara neden olabildiği gösterilmiştir (Mukerji vd. 2016). Antibiyotik direnci açısından bakıldığında ise durum çok daha dikkat çekici olmaktadır. Bunun nedeni *Chryseobacterium* cinsinin tetrasiklinler, eritromisin, linezolid, polimiksinler, aminoglikozitler, kloramfenikol ve birçok beta-laktam dahil olmak üzere geniş bir antibiyotik yelpazesine doğal olarak

dirençli, vankomisine ve klindamisine orta derecede duyarlı olmasıdır (Loch ve Faisal 2015).

Bu çalışmada elde edilen izolatlardan bir tanesi ise *Betaproteobacteria* sınıfının *Burkholderiales* sınıfının *Comamonadaceae* familyasının *Curvibacter* cinsine ait *Curvibacter gracilis*'tir. *Curvibacter gracilis* Ding ve Yokota (2004) tarafından kuyu suyundan izole edilen gram negatif bir bakteridir. Patojenisitesi konusunda çok çalışma olmamakla birlikte Wolcott ve arkadaşları (2012) bazı aterosklerotik plak örneklerinde düşük oranlarda (% 5'in altında) *Curvibacter* cinsinin varlığını göstermişlerdir. Buna ek olarak, *Curvibacter* cinsi üyelerinin prevalansı, sağlıklı bireylere kıyasla kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda gözlenmiştir (Zakharkina vd. 2013).

Antalya ili için büyük önem taşıyan ve insan aktivitelerinin sıklıkla gözlemlendiği Boğaçay'ın denize döküldüğü noktada yapılan bu tez çalışmasından elde edilen bilgiler, yukarıdaki bilgiler ışığında büyük önem arz etmektedir. Her ne kadar içinde bulunduğumuz 2020 yılında yaşanan Korona virüs (COVID-19) pandemisi nedeniyle Boğaçayı etrafında tarımsal aktivitelerde, hayvancılıkta ve insansal aktivitelerde ciddi bir düşüş görölse de tanımlanan suşların antibiyotik direnci profilleri göz önüne alındığında, durum ciddiyetini korumaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma denize döküldüğü bölgede yüzme ve balık tutma gibi aktivitelerin de gerçekleştiği konumu, içme ve kullanma sularının ihtiyacının karşılanmasında ve tarım arazilerinin sulanmasında kullanılması açısından Antalya ili için büyük önem taşıyan Boğaçay'ın denize döküldüğü noktanın, ağustos (2020) ve şubat (2020) aylarında antibiyotik direnci profilinin ve antibiyotik direncinin incelenmesi açısından önemli bir çalışmadır. Belirlenen noktadan alınan örneklerden izole edilecek bakterilerden, klinikte en sık kullanılan 5 antibiyotiğe (ampisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, kanamisin ve imipenem) karşı çoklu direnç gösterenlerin seçilerek moleküler yöntemlerle tanımlanmasını içeren Boğaçay merkezli Antalya'da gerçekleştirilen ilk çalışma olması açısından ise bilimsel açıdan daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Bu çalışma ile hem insansal yaşam alanıyla iç içe olan bir sucul sistemdeki bakterilerin dirençleri ve yayılmaları hakkında bilgi sahibi olunmuş hem de klinik açıdan önemli olan bakteriler tespit edilerek halk sağlığı için önemli bir katkı sunulmuştur.

Yapılan antibiyogram testlerine göre, mikrobiyal kompozisyonda mevsimsel farklılıklar bulunmuştur. Her ne kadar çoklu antibiyotik direnci gösteren bakteri sayısı her iki mevsim için de beklenenden düşük çıksa da bunda içinde bulunduğumuz dönemde yaşadığımız COVID-19 pandemisi ile tarım, sanayi ve insansal aktivitelerindeki düşüşün etkili olduğu düşünülmektedir. Buna ek olarak, örneklem için seçilen noktanın denize yakınlığı nedeniyle sonraki çalışmalarda bu çalışmada hedeflenen mezofilik bakterilerin yanı sıra optimum koşulları mezofilik bakterilerden daha farklı olan (örneğin tuz toleransı yüksek olan halofilik bakteriler gibi) bakterilerin tanımlanması için kullanılabilecek bir noktadır. Bu çalışmanın hedefi klinikle ilişkili, çoklu antibiyotik direnci gösteren mezofilik bakterilerin tanımlanması olduğu için, örneklem noktasındaki tuzluluk oranı çoklu antibiyotik direnci gözlemlerini etkileyen başka bir unsur olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat bu durumun etkisinin daha detaylı yorumlanabilmesi için Boğaçay üzerinde farklı özelliklere sahip noktalardan örnekler alınarak çalışmaların sonuçları karşılaştırılmalıdır. Bu nedenle öncül bir çalışma olan bu tez çalışması gerek aynı bölgede yapılacak gerekse başka su örneklerinde yapılacak daha sonraki çalışmalarda rehber olarak kullanılabilecektir. Bu nedenle bilimsel açıdan önemli bir çalışmadır.

Çalışmada tanımlanan bakterilerin en büyük ortak noktası çoklu antibiyotik direnci göstermeleri ve insan patojeni olmalarıdır. Çalışmamızda tanımladığımız izolatların özelliklerine bakıldığında büyük çoğunluğu insan patojeni olarak sınıflandırılrsa da özellikle tanımlanan *Yersinia* cinsine ait türler insan patojeni olmayan izolatlar da bulunmuştur. Bunlara ek olarak, fırsatçı patojenlerde tanımlanmıştır. Bu özelliğe göre izolatlar mevsimsel olarak karşılaştırıldığında hem tür bazında hem de çoklu antibiyotik direnci anlamında, yaz mevsiminde bir artış görülmektedir. İnsan aktivitelerinin bu denli yoğun olduğu bu noktanın birden fazla ve antibiyotik direncine sahip mikroorganizmalara sahip olduğunu gösteren bu çalışma halk sağlığı açısından ayrı bir önem taşımaktadır. Her ne kadar COVID-19 pandemisi nedeniyle balık tutma, denize girme gibi insan aktivitelerinde düşüş olsa da Antalya'nın Konyaaltı Bölgesi için gerek içme suyu gerekse tarımsal anlamda su kaynağı olması açısından oldukça büyük öneme sahip Boğaçay'da görülen bu patojenik ve antibiyotik dirençli bakterilerin tanımlanması çok önemlidir. Antibiyotik direnci döngüsünün önemli bir parçası olan bu alanın güncel durumu hakkında bu öncül çalışmayı izleyen çalışmalar yapılmalıdır.

Su kaynakları, sadece insanlar için değil tüm canlılar için çok önemli bir bileşendir. Bu nedenle su kaynaklarının kontaminasyonu canlılar için ciddi bir sorun oluşturur. Bunun yanında, son yıllarda mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin artması ve bu artışın insan ve hayvan sağlığındaki etkileri konusu oldukça önem kazanmıştır. Özellikle insanlar tarafından yoğun kullanılan yer üstü sularının, insanların çeşitli aktiviteleri sonucu antibiyotiklerle kontaminasyonu, zamanla bunlara karşı direnç mekanizmaları geliştiren mikroorganizmaların doğal seçilimine neden olmaktadır. Bunun sonucunda ise bu mikroorganizmalardan köken alan ve klinikte dirençli olarak sınıflandırılan bu mikroorganizmaların halk sağlığını direkt olarak etkilediği bilinmektedir. Özellikle bilinçsiz antibiyotik kullanımıyla, antibiyotik direncinin yaygınlaşması, doğuracağı sonuçlar nedeniyle önem kazanmaktayken, hayvanlarda gereksiz antibiyotik kullanımı gibi insan aktiviteleriyle oluşan çevre problemleri ve kirlilik nedeniyle gelişen direnç genelde göz ardı edilmiştir. Ancak çok düşük miktarlardaki antibiyotiklerin bile mikrobiyal topluluklarda direnç gelişmesi ve yaygınlaşması için yeterli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle insanların kullanımı açısından önem teşkil eden yer üstü sularının bu tür aktivitelerden etkilenme seviyesinin incelenmesi, antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Acar, J. and Rostel, B. 2001. Antimicrobial resistance: An overview. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 20(3), 797-810.
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S. and Gupta, R.S. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12), 5575-5599.
- Akbulut, S., Yilmaz, F. and Içgen, B. 2014. Surface water isolates of hemolytic and non-hemolytic *Acinetobacter* with multiple drug and heavy metal resistance ability. *Journal of water and health*, 12(1), 1-12.
- Akduman, S., Demirbağ, M.A. ve Sivri, N.S. 2020. Türkiye’de Bakteriyolojik Su Kalitesi Konusunda Yapılan Bilimsel Araştırmaların Bibliyometrik Analizi (1999-2019). *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 5(3): 425-432.
- Aktan, Y., Tan, S. and Içgen, B. 2013. Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. *Environmental monitoring and assessment*, 185(6), 5285-5293.
- Aljorayid, A., Viau, R., Castellino, L. and Jump, R. L. 2016. *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature. *IDCases*, 5, 6-8.
- Antunes, L., Visca, P. and Towner, K. J. 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathogens and disease*, 71(3), 292-301.
- Anuradha, M. 2014. *Leclercia adecarboxylata* isolation: case reports and review. *Journal of clinical and diagnostic research*, 8(12), DD03.
- Ardal, C., Balasegaram, M., Laxminarayan, R., McAdams, D., Outtersson, K., Rex, J. H., Sumpradit, N. 2020. Antibiotic development—economic, regulatory and societal challenges. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 267-274.
- Bagley, S.T. 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 6(2), 52-58.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R. and McArthur, J.V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in microbiology*, 14(4), 176-182.
- Baquero, F., Martínez, J.L. and Cantón, R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, 19(3), 260-265.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4):493:496.
- Baylan, O. ve Abaslı, H.E. 2005 *Yersinia enterocolitica* infeksiyonları. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35: 232-247.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Rapp, B.A. and Wheeler, D.L. 2000. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 15-8.
- Bérdy, J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are

- heading. *The Journal of Antibiotics*, 65(8): 385.
- Bockemühl, J. and Wong, J.D. 2003. *Yersinia*. In: "Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, F.C. (Eds) Manual of Clinical Microbiology 8th edition, ASM Press, Washington D.C., p 672.
- Butler, T. 2012. Plague and other *Yersinia* infections. Springer Science & Business Media.
- Cabral, J.P. 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International journal of environmental research and public health*, 7(10), 3657-3703.
- Calabrese, E.J. 2004. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine: Re-framing the dose-response relationship. *EMBO reports*, 5(S1), S37-S40.
- Cardak, M., Özbek, E.Ö., ve Kebapçioğlu, T. 2015. Seasonal abundance and diversity of culturable heterotrophic bacteria in relation to environmental factors in the Gulf of Antalya, Eastern Mediterranean, Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(4):569-582.
- Casewell, M.W. and Phillips, I. 1981. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *The American Journal of Medicine*, 70(2):459-462.
- Center for Disease Control And Prevention (CDC). 2020. Antibiotic/Antimicrobial Resistance <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html> [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- Center for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP, 2017. Antibiotic/Antimicrobial <https://cddep.org/research-area/animal-use/> [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- Chudobova, D., Dostalova, S., Blazkova, I., Michalek, P., Ruttkay-Nedecky, B., Sklenar, M., Nejdi, L., Kudr, J., Gumulec, J., Tmejova, K., Konecna, M., Vaculovicova, M., Hynek, D., Masarik, M., Kynicky, J., Kizek, R. And Adam V. 2014. Effect of ampicillin, streptomycin, penicillin and tetracycline on metal resistant and non-resistant *Staphylococcus aureus*. *International journal of environmental research and public health*, 11(3), 3233-3255.
- Clissold, S.P., Todd, P.A. and Campoli-Richards, D.M. 1987. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 33(3):183-241.
- Davies, J. 2006. Are antibiotics naturally antibiotics?. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 496-499.
- de Berardinis, V., Durot, M., Weissenbach, J. and Salanoubat, M. 2009. *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology. *Current opinion in microbiology*, 12(5), 568-576.
- Dewick, P.M. and Rohr, J. 1998. Medical Natural Products. A Biosynthetic Approach. *Angewandte Chemie-International Edition*, 37(16): 2277-2277.
- Di Cesare, A., Eckert, E.M. and Corno, G. 2016. Co-selection of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Freshwater Bacteria. *Journal of Limnology*, 75(2): 59-66.
- Ding, L., and Yokota, A. 2004. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and

- Herbaspirillum putei sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [Pseudomonas] huttiensis,[Pseudomonas] lanceolata,[Aquaspirillum] delicatum and [Aquaspirillum] autotrophicum as Herbaspirillum huttiense comb. nov., Curvibacter lanceolatus comb. nov., Curvibacter delicatus comb. nov. and Herbaspirillum autotrophicum comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6): 2223-2230.
- Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P., and Pace, N.R. 1991. Phylogenetic analysis of Aquaspirillum magnetotacticum using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International journal of systematic and Evolutionary microbiology*, 41(2): 324-325.
- Edwards, P.R. and Ewing, W.H. 1972. Identification of enterobacteriaceae. Identification of Enterobacteriaceae., (Third edition). . Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn.
- Fair, R.J. and Tor, Y. 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal Chemistry*, 6, 25–64.
- Friedman, N. D., Temkin, E., Carmeli, Y. 2016. The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 416-422.
- Gao, P., Munir, M. and Xagorarakis, I. 2012. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 421, 173-183.
- Gothwal, R. and Shashidhar, T. 2015. Antibiotic pollution in the environment: a review. *Clean–Soil, Air, Water*, 43(4), 479-489.
- Hong, H., Jung, J. And Park, W. 2014. Plasmid-encoded tetracycline efflux pump protein alters bacterial stress responses and ecological fitness of Acinetobacter oleivorans. *PLoS One*, 9(9), e107716.
- Huang, R., Ding, P., Huang, D. and Yang, F. 2015. Antibiotic pollution threatens public health in China. *The Lancet*, 385(9970), 773-774.
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., Zinkernagel, A. S. 2020. Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*, 21(12), e51034.
- Icgen, B. and Yilmaz, F. 2014. Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kızılırmak river isolates. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(6): 735-743.
- Jung J. and Park W. 2015. Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2533-2548.
- Kayış Büyükkaya F., Dinçer S. Ve Maytar F. 2016. Gölbaşı gölünden (Adıyaman) izole edilen gram negatif bakterilerin çoklu antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 34(6): 62-69
- Karagül, S. Yerel halkın çevre sorunlarına yaklaşımları ve çözüm önerileri üzerine bir araştırma: Boğaçayı Havzası örneği. *Türkiye Ormancılık Dergisi*, 15(2), 108-113.

- Kesado, T., Hashizume, T. and Yoshinari A. 1980. Antibacterial activities of a new stabilized thienamycin, N-formimidoyl thienamycin, in comparison with other antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17 (6): 912–7.
- Kim, S. and Aga, D.S. 2007. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B Critical Reviews*, 10(8): 559-73.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.H., Shreckenberger, P.C. and Win, W.C. (1997). The Enterobacteriaceae. In color atlas and textbook diagnostic microbiology 5 th ed. Lippincott, Philadelphia. p 218-229
- Koonin, E.V., Makarova, K.S. and Aravind, L. 2001. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 709-742.
- Krumperman, P. H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 165-170.
- Laxminarayan, R., Sridhar, D., Blaser, M., Wang, M. and Woolhouse, M. 2016. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science*, 353(6302), 874-875.
- Leclerc, H. 1962. Biochemical Studies on Pigmented Enterobacteriaceae. *Annales de l'Institut Pasteur*, 102(6), 726-41.
- Lee, S.O., Kim, Y., Kim, B., Kim, M.N., Woo, J.H. and Ryu, J. 2002. Impact of previous use of antibiotics on development of resistance to extended-spectrum cephalosporins in patients with Enterobacter bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(8), 577-581.
- Levy, S.B. and Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(12), S122-S129.
- Loch, T.P. and Faisal, M. 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: a review. *Journal of advanced research*, 6(3), 283-300.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P. Tivey, R.N., Potter, S.C., Finn, R.D. and Lopez, R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47(W1), W636-W641.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. ve Stahl, D.A. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi 14. Baskı, Çeviri Editörü Çökmüş C. Palme Yayıncılık: Ankara, 2017, ss.168-170.
- Manavoğlu, E., 2007. Şehir Planlama ve Tasarımında Su Kaynaklarının Önemi Antalya – Konyaaltı Örneği. *Şehir Plancıları Odası Dergisi*, 41 (3–4):119–130.
- Manavoğlu, E., 2009. Antalya Kentinin Geçmişten Günümüze Mekansal Gelişimi ve Planlama Çalışmalarının Değerlendirilmesi. *Şehir Plancıları Odası Dergisi*, 46 (2): 19–30.
- Martínez, J.L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887), 365-367.

- Martinez, J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*, 157(11), 2893-2902.
- Mateo-Estrada, V., Graña-Miraglia, L., López-Leal, G., and Castillo-Ramírez, S. 2019. Phylogenomics reveals clear cases of misclassification and genus-wide phylogenetic markers for *Acinetobacter*. *Genome biology and evolution*, 11(9): 2531-2541.
- Matu, A., Nde, A.L., Oosthuizen, L., Hitzeroth, A., Badenhorst, M., Duba, L., Gidaga, M., Klinck, J., Kriek, I.M., Lekoma, P.J., Nel, L., Dos Ramos, S.M., Rossouw, J., Salomane, N., Segone, N., Serobe, S., Tiyani, T., Hugo, C.J. and Newman, J.D. 2019. Draft genome sequences of seven *Chryseobacterium* type strains. *Microbiology resource announcements*, 8(1).
- Mehta, A. 2011. "Mechanism of Action of Tetracyclines". <https://pharmaxchange.info/> Archived from the original on 2012-06-05. Retrieved 2020-08-17
- Mehta, J., Bhardwaj, S.K., Bhardwaj, N., Paul, A.K., Kumar, P., Kim, K.H. and Deep, A. 2016. Progress in the biosensing techniques for trace-level heavy metals. *Biotechnology advances*, 34(1), 47-60.
- Mezzatesta, M.L., Gona, F. and Stefani, S. 2012. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7): 887-902.
- Mukerji, R., Kakarala, R., Smith, S.J. and Kusz, H. G. 2016. *Chryseobacterium indologenes*: an emerging infection in the USA. *Case Reports*, 2016, bcr2016214486.
- Noble, R.T., Moore, D.F., Leecaster, M.K., McGee, C.D. and Weisberg, S.B. 2003. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water research*, 37(7), 1637-1643.
- Ölmez, M., Hatipoğlu, H., Uzun, C., Demiray, T., Köroğlu, M., ve Altındış, M. 2018. Akciğer kanserli hastada nadir bir bakteriyemi etken; *Leclercia adecarboxylata*. A rare bacteraemia agent in a lung cancer patient; *Leclercia adecarboxylata*. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 2(1): 46-49.
- Padda, K., Puri, A. and Chanway, C. 2018. Isolation and identification of endophytic diazotrophs from lodgepole pine trees growing at unreclaimed gravel mining pits in central interior British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 48 (12): 1601–1606.
- Padda, K., Puri, A. and Chanway, C. 2019. Endophytic nitrogen fixation – a possible hidden source of nitrogen for lodgepole pine trees growing at unreclaimed gravel mining sites. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(11).
- Palleroni, N.J. and Moore, E.R. 2004. Taxonomy of pseudomonads: experimental approaches. In *Pseudomonas I. Genomics, Life Style and Molecular Architecture* (Ramos JL, ed), pp. 3–44. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Palmer, A.C., Kishony, R. 2013. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nature Reviews Genetics*, 14 (4):243-248.
- Pottinger, P., Reller L.B., Ryan, K.J. and Weissman S. 2004. Pathogenic Bacteria In:

- Ryan K.J. and Ray C.G. (Eds) Sherris Medical Microbiology(4th ed.). McGraw Hill, New York. p. 370.
- Raja, C.E., Selvam, G.S. and Omine, K. 2009. Isolation, identification and characterization of heavy metal resistant bacteria from sewage. In International Joint Symposium on Geodisaster Prevention and Geoenvironment in Asia pp. 205-211, Fukuoka, Japan
- Ravikumar, S., Baylon, M.G., Park, S.J. and Choi, J.I. 2017. Engineered microbial biosensors based on bacterial two-component systems as synthetic biotechnology platforms in bioremediation and biorefinery. *Microbial cell factories*, 16(1), 62.
- Raynor, B.D. 1997. Penicillin and ampicillin. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 4(4), 147-152.
- Resende, J.A., Silva, V.L., Fontes, C.O., Souza-Filho, J.A., de Oliveira, T.L.R., Coelho, C.M., César, D. E & Diniz, C. G. (2012). Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. *Microbes and environments*, ME12049.
- Russell, A.D. 2004. Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. In: Denyer, S.P., Hodges, N.A. and German, S.P. (Eds.) Hugo and Russell's pharmaceutical microbiology. 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 152-186.
- Saba, R., Inan, D., Turhan, Ö., Yalcin, A. N., Günseren, F., Mamikoğlu, L. (2011). Surveillance of antimicrobial use in a Turkish university hospital. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 41(4), 701-710.
- Sanders, W.E. and Sanders, C.C. 1997. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical microbiology reviews*, 10(2), 220-241.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., and Jackson, R.W. 2011. Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4):652-680.
- Sowndary, R. S. N., Kavitha, E. 2020. Comparative bacteriological profile with antibiotic resistance pattern among diabetic and non-diabetic patients. *Indian Journal of Microbiology Research*, 7(2), 207-211.
- Sponberg, A.L. and Witter, J.D. 2008. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the total environment*, 397(1-3), 148-157.
- Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Jagoe, C.H., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H., King, C.J. and McArthur, J.V. 2006. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1510-1514.
- Stock, I., Burak, S., Sherwood, K.J., Gröger, T., and Wiedemann, B. 2003. Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' Serratia species: S. ficaria, S. fonticola, S. odorifera, S. plymuthica and S. rubidaea. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(4), 865-885.
- Strettot, C.W., Ristuccia, P.A. and Cunha, B.A. 1984. Topics in clinical microbiology Klebsiella. *Infection Control* 5(07):343-348

- Subramaniam, G., Girish, M. 2020. Antibiotic Resistance—A Cause for Reemergence of Infections. *The Indian Journal of Pediatrics*, 1-8.
- Sun, S.S. and McDonough, W.F. 1989. Chemical and isotopic systematics of oceanic basalts: implications for mantle composition and processes. In: Saunders, A.D. and Norry, M.J. (Eds.), *Magmatism in the Ocean Basins*. Geol. Soc. Spec. Publ. 42, pp. 313-345.
- Şafak, B., Sezer, B.E. ve Yenigün, E.Ç. 2017. Leclercia adecarboxylata'ya bağlı gelişen kateter kaynaklı bakteriyemi olgusu. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(2): 79-81.
- T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Birimi 2017. Antimikrobiyal Direnç Global Bakış ve Türkiye Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) Verileri: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/CAESAR_Annual_Report_2017.pdf [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Birimi 2018. Antimikrobiyal Direnç Global Bakış ve Türkiye Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) Verileri: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/52238_WHO_CAESAR_AR_2018_low_V7_web_2.pdf [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- Tan, W.S., Yunos, N.Y.M., Tan, P.W., Mohamad, N.I., Adrian, T.G.S., Yin, W.F. and Chan, K.G. 2014. Freshwater-borne bacteria isolated from a Malaysian rainforest waterfall exhibiting quorum sensing properties. *Sensors*, 14(6), 10527-10537.
- Tazzyman, S.J. and Bonhoeffer, S. 2014. Why there are no essential genes on plasmids. *Molecular biology and evolution*, 32(12), 3079-3088.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020a. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 10.0 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ [Son erişim tarihi: 12.11.2020].
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2020b. EUCAST advice on intrinsic resistance and exceptional phenotypes v 3.2 https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance/ [Son erişim tarihi: 12.11.2020].
- Turner, S.L., Bailey, M.J., Lilley, A.K. and Thomas, C.M. 2002. Ecological and molecular maintenance strategies of mobile genetic elements. *FEMS microbiology ecology*, 42(2), 177-185.
- Turton, J.F., Shah, J., Ozongwu, C. and Pike, R. 2010. Incidence of Acinetobacter species other than A. baumannii among clinical isolates of Acinetobacter: evidence for emerging species. *Journal of clinical microbiology*, 48(4), 1445-1449.
- Valcárcel, Y., Alonso, S.G., Rodríguez-Gil, J.L., Gil, A. and Catalá, M. 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid

- Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere*, 84(10), 1336-1348.
- Vardakas, K.Z., Tansarli, G.S., Rafailidis, P.I. and Falagas, M.E. 2012. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(12): 2793–803.
- Werth, B.J. 2020. Chloramphenicol *The Merck Manual* Merck. <https://www.merckmanuals.com/professional/infectious-diseases/bacteria-and-antibacterial-drugs/chloramphenicol> [Son erişim tarihi: 01.05.2020].
- Wolcott, R.D., Wolcott, J.J., Palacio, C. And Rodriguez, S. 2012. A possible role of bacterial biofilm in the pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of Bacteriology and Parasitology*, 3(127), 2.
- World Health Organization (WHO). 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- World Health Organization (WHO). 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf. [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- World Health Organization (WHO). 2020. Antibiotic resistance <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- Yazıcı, N., Karagül, S. 2014. Yerel Halkın Çevre Sorunlarına Yaklaşımları ve Çözüm Önerileri Üzerine Bir Araştırma: Boğaçayı Havzası Örneği. *SDÜ Orman Fakültesi Dergisi*, 15: 102-107.
- Yıldırım, M. ve Topkaya, B. 2005. Antalya Kentindeki İçme Suyu Kaynaklarının Kirlenme Potansiyelinin Uzaktan Algılama ve Coğrafi Bilgi Sistemleri Kullanılarak Belirlenmesi. Antalya İnşaat Mühendisliği Sorunları Kongresi, Kongre Sempozyum Bildiriler Kitabı, Antalya ([http://www.imo.org.tr/ekutuphane/index.php?yayinkod=587&belgeadi=Antalya%20Y%F6resinin%20%DDn%FEaat%20M%FChendisli%F0i%20Sorunlar%FD%20Kongresi](http://www.imo.org.tr/ekutuphane/index.php?yayinkod=587&belgeadi=Antalya%20Y%F6resinin%20%DDn%FEaat%20M%FChendisli%F0i%20Sorunlar%FD%20Kongresi;);) [Son erişim tarihi: 15.09.2020].
- Zakharkina, T., Heinzl, E., Koczulla, R., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J. 2013. Analysis of the airway microbiota of healthy individuals and patients with chronic obstructive pulmonary disease by T-RFLP and clone sequencing. *PLoS One*; 8(7), e68302.



ÖZGEÇMİŞ

SİDE SELİN SU YİRMİBEŞOĞLU



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2015-2017	İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara
Lisans 2008-2013	Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2020-Devam Ediyor	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir
--	--

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Yirmibeşoğlu S.S.S., Tefon Öztürk B.E (2020). Comparing microbiological profiles, bioactivities, and physicochemical and sensory properties of donkey milk kefir and cow milk kefir. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 44(4), 774-781., Doi: 10.3906/vet-2001-82

2- Yirmibeşoğlu S.S.S., Tefon Öztürk B.E (2020). Ticari ve Lokal Kefir Danelerinden Elde Edilen Kefirlerin Biyoaktivitelerinin Karşılaştırılması. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(2), 769-777., Doi: 10.21597/jist.615566

3- Saltepe B., Şahin Kehribar E., Yirmibeşoğlu S.S.S. Şeker U.O.Ş. (2017). Cellular Biosensors with Engineered Genetic Circuits. ACS Sensors, 3(1), 13-26., Doi: 10.1021

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Yirmibeşoğlu S.S.S., Ahan R.E, Şeker U.O.Ş. (2017). Developing multi input whole cell biosensors. 42nd FEBS Congress From Molecules to Cells and Back (Özet Bildiri/Poster)

2- Yirmibeşoğlu S.S.S., Şeker U.O.Ş. (2015). Synthetic Biology Enabled Whole Cell Biosensors. IV. International Congress of Molecular Biology Association of Turkey (Özet Bildiri/Poster)

Poster sunumları

1- Yirmibesoglu S. S. S & Seker, U. O. S (2016) Developing Multi Input Whole Cell Biosensors, Bilkent UNAM Nanoday Ankara, Turkey

2- Yirmibesoglu S. S. S & Seker, U. O. S (2015) Developing Multi Input Whole Cell Biosensors, Bilkent UNAM Nanoday Ankara, Turkey

3- Bee Subtilis: Save the Bees and Save the World(2013) iGEM Competition ,Lyon, France

4- http://2013.igem.org/files/poster/METU_Turkey.pdf

5- eCO Filter: GEM Competition (2012) iGEM Competition, Amsterdam, Netherlands
<http://2012.igem.org/files/poster/METU.pdf>

Proje Deneyimi

1- Boğaçayın Antalya denize döküldüğü alandaki çoklu antibiyotik dirençli bakterilerin yaz ve kış mevsimlerinde karakterizasyonu, FYL-2019-5094, Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Araştırmacı

2- Boğaçay'da (Antalya) Bulunan Ağır Metal Dirençli Bakteri Suşlarının Mevsimsel Karakterizasyonu, FBA-2020-5170, Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Araştırmacı

3- Biyomedikal Uygulamalar için Sentetik Biyoloji Yöntemleri ile Tüm Hücre Sensörlerinin Oluşturulması, 115Z217, TÜBİTAK 1001, Bursiyer

4- Biyomineralizasyon Sürecinde Kullanılacak Sıralı Enzimatik Tepkimler için Programlanabilir Sentetik Gen Devresi Tasarımı, 115M108, TÜBİTAK ARDEB, Bursiyer

5- *Bordetella pertussis*'e Ait Rekombinant Fimbrial Protein X (Fimx), Putatif Peptidil Prolil Sis-Trans İzomeraz (Pppiase) Glutamin Bağlayıcı Periplasmik Protein (Glnbp), Putatif Peptidoglikan Bağlayıcı Protein Ve Şaperonin 10 (Hsp 10) Proteinlerinin Immün Koruyucu Kapasitelerinin Değerlendirilmesi, 112T916, TÜBİTAK 1001, Bursiyer

6- BeeSubtilis:Arıların koruyucu kalkanı, 2140125, TÜBİTAK Girişimcilik Aşamalı Destek Programı, Proje Yürütücüsü

