

# İçme sularından izole edilen *Bacillus* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere direnç profilleri(\*)

## *Identification and antibiotic resistance profiles of Bacillus strains isolated from drinking water*

Elif Çelik Sevim, Şengül Alpay Karaoğlu, Ali Sevim, Osman Birol Özgümüş

Rize Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Rize.

---

İletişim / Correspondence: Şengül Alpay Karaoğlu Adres / Address: Rize Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 53100 Rize  
Tel: 0464 223 53 75 Fax: 0464 223 53 76 E-mail: sengulalpay@yahoo.com

---

### ÖZET

*Bacillus* cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunmakla birlikte *B. anthracis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* dışındaki türler insan ve hayvanlarda hastalık oluşturmazlar. Bu çalışmada 2001-2002 yılları arasında Rize ili ve ilçelerinden alınan 287 içme suyu örneğinden izole edilen, toplam 41 *Bacillus* cinsi suşun identifikasyonu ve antibiyotiklere duyarlılıklar araştırılmıştır. Suşların identifikasyonu geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerle yapılmıştır. Suşların %36.58'si *Bacillus cereus*, %29.26'sı *Bacillus circulans*, %14.63'ü *Bacillus mycoides*, %4.87'si *Bacillus sphaericus* olarak tiplendirilirken altı izolatan tür tanısı yapılamamıştır. Suşların penisilin, ampisilin, basitrasin, eritromisin, amikasin, kloramfenikol, tetrasiklin, novobiyosin ve vankomisine direnç profilleri agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. *Bacillus*'ların %100'ü basitrasine, %75'i ampisiline, %70.3'ü penisiline ve %31.7'si de novobiyosine dirençli tespit edilmiştir. Amikasin ve vankomisine karşı dirence rastlanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Bacillus*, içme suyu, antibiyotik direnci.

### SUMMARY

*Bacillus* genera are common in nature, and they do not cause disease on animals and humans except for some species such as *B. anthracis*, *B. subtilis* and *B. cereus*. In this study, a total of 41 *Bacillus* bacteria isolated from 287 drinking water samples obtained from Rize city and its counties during the years 2001 to 2002 were identified in species level and investigated their susceptibility to antibiotics. Identification of the strains was performed by traditional microbiological methods. The strains were identified as 36.58% of *Bacillus cereus*, 29.26% of *Bacillus circulans*, 14.63% of *Bacillus mycoides* and 4.87% of *Bacillus sphaericus*, but six isolates not identified. Resistance profiles of the strains to penicillin, ampicillin, bacitracin, erythromycin, amikacin, chloramphenicol, tetracycline, novobiocin and vancomycin were determined by agar disk diffusion method. While the strains were found to be resistant 100% to bacitracin, 75% to ampicillin, 70.3% to penicillin and 31.7% to novobiocin, no resistant strains were detected to amikacin and vancomycin.

**Key Words:** *Bacillus*, drinking water, antibiotic resistance.

---

(\*)Çalışma 18. Ulusal Biyoloji Kongresi (26-30 Haziran 2006, AYDIN)' n de sunulmuştur.

## GİRİŞ

Günümüzde antibiyotik direnci nehirler, dereler, yüzey suları ve sedimentler, göller, deniz suları ve içme suları gibi çeşitli sucul ortamlarda gözlemlenmektedir (1). Halk sağlığı için ana problem direnç genlerinin çevresel bakterilerden insan patojenlerine aktarılma tehlikesidir (2). Bakteriyel popülasyonlar arasında direnç genlerinin horizontal yayılabilme kabiliyetinden dolayı çevrede dirençli bakteri sayısındaki artış halk sağlığı için endişe vericidir. Bu sorun nedeniyle özellikle antibiyotik direnç genlerini kodlayan belirleyici genler ilgi toplamaktadır. Doğal çevrede bakteriler arasındaki gen transferi konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (3). Dirençli bakterilerin bu kabiliyeti ve direnç genlerinin bir ekosistemden diğerine taşınmaları rapor edilmiştir. Benzer şekilde, içme ve kullanma suyunun antibiyotik dirençli bakteri ile bulaşması bu direncin insana taşınımı için bir yol olabilmektedir (2). Doğadaki çoğul antibiyotik direncinin varlığı toprak ve onun birbirini temas ettiği su ve diğer habitatlarındaki bakteriler arasında direncin yayılımına sebep olur. Birçok çalışma göstermiştir ki toprakta ve yeraltı sularında birçok dirençli bakteri mevcuttur. Birçok çalışmada, bu çevresel bakterilerden flora bakterilerine gen transferinin oluşturacağı tehlikeler gösterilmektedir (3).

*Bacillus* cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunan, Gram pozitif, aero, endospor oluşturan ve katalaz olumlu mikroorganizmalardır. Tanımlanmış 51 türü bilinmesine rağmen taksonomik olarak yeri tam belirlenmemiş gruplar da halen mevcuttur. Patojen kabul edilen *B. anthracis*, fırsatçı patojen olabilen *B. subtilis* ve gıda zehirlenmelerine neden olan *B. cereus* dışındaki türler insan ve hayvanlarda hastalık oluşturmadığı bilinmekte olup diğer türlerin bazıları insanların doğal florasında yer alabilmektedir. Bu organizmalar genellikle kanlı agarda büyük, yayılabilen sınırları belirlenemeyen gri koloniler oluştururlar (4). Isıya, ışına, dezenfektan maddelere dirençli

sporların ameliyathane, cerrahi malzeme, kozmetik ürün ve yiyeceklere bulaşması sorunlara neden olmaktadır (5).

Bu çalışma Rize'de içme suları olarak kullanılan çeşitli kaynak ve klorlanmış şebeke sularından izole edilen *Bacillus* türlerinin ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Rize ili ve Çayeli, Pazar, Ardeşen, Fındıklı ilçelerinden 2001-2002 yılları arasında, şebeke ve kaynak suları olarak belirlenen istasyonlardan her ay düzenli olarak steril cam şişelere alınan su örneklerinin Rize üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji laboratuvarında incelenmesiyle yapılmıştır.

Gram pozitif sporlu bakterilerin izolasyonu için su örneklerinden 1mL'si alınıp 5 mL Tiyoglukolat sıvı besiyerine (Merck, Almanya) ehim yapılmış ve besiyeri 24 saat 35°C de inkübasyona bırakılmıştır. Üreme, tüplerde oluşan bulanıklılığın gözlenmesiyle belirlenmiştir ve bu tüplerden Nutrient agar (Merck, Almanya) besiyerine 0.1 mL tek koloni düşürme yöntemiyle pasaj yapılarak bir gece daha inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra üreyen koloniler incelenmiş ve *Bacillus* şüpheli kolonilerden Gram boyama yapılmıştır. Gram pozitif sporlu bakteri morfolojisinde olup katalaz üretimi olumlu bakterilerden saf kültürler alınmıştır. Saf kültürlerin spor morfoljileri, 15-45°C hareket özellikleri, lestitinaz üretimi, indol oluşumu, nitrat redüksiyonu, Voges-Proskauer testi, sitrat kullanım testi, jelatin hidrolizi, nişasta hidrolizi ve glukozdan gaz oluşturma özelliklerine bakılarak Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de (6) belirtilen sonuçlara göre değerlendirilerek *Bacillus* türlerinin identifikasyonları yapılmıştır.

*Bacillus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için dokuz farklı antibiyotik kullanılmıştır. Antimikrobiyal hassasiyet testleri *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) kriterlerine uygun olarak 0.5 McFar-

land bulanıklılıkta kültür ve Mueller-Hinton Agar (Merck, Germany) besiyeri kullanılarak standart disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (7). Antibiyotik olarak penisilin G (10µg), ampisilin (10µg), eritromisin (15µg), amikasin (30µg), kloramfenikol (30µg), tetrasiklin (30 µg), basitrasin (4µg), novobiyosin (5µg) ve vankomisin (30 µg) (Bioanalyse,Türkiye) seçilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmada Rize ili ve Çayeli, Pazar, Ardeşen, Fındıklı ilçelerinden 12 kaynak suyu ve 31 şebeke suyu olmak üzere toplam 43 istasyondan 287 su örneği incelenmiştir. Toplam 41 su örneğinde *Bacillus* cinsi bakteri belirlenmiş, en fazla izolasyon ise Rize merkezde (%21,3) tespit edilmiştir (Tablo 1). Şebeke sularında klorlama öncesi depolarda *Bacillus* izole edilirken, klorlama sonrası istasyonlarda belirlenmemiştir.

**Tablo 1.** Alınan su örneklerinin dağılımı ve *Bacillus* izolasyon oranları

İl/İlçe	Örnek Sayısı	İzole edilen <i>Bacillus</i> (n)	(%)
Rize	150	32	21.33
Çayeli	33	3	9.09
Pazar	33	2	6.06
Ardeşen	61	2	3.28
Fındıklı	89	2	2.25
<b>TOPLAM</b>	<b>287</b>	<b>41</b>	<b>14.3</b>

**Tablo 3.** İzole edilen *Bacillus*'ların antibiyotiklere karşı direnç oranları

Tür Adı	P (D/N)	AM (D/N)	B (D/N)	E (D/N)	AK (D/N)	K (D/N)	TE (D/N)	NV (D/N)	VA (D/N)
<i>B. cereus</i>	15 /15	15/15	15/15	0/15	0/15	0/15	1/15	1/15	0/15
<i>B. circulans</i>	7/12	8/12	12/12	2/12	0/12	2/12	0/12	4/12	0/12
<i>B. mycoides</i>	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	0/6	0/6	2/6	0/6
<i>B. sphaericus</i>	0/2	0/2	2/2	0/2	0/6	1/2	0/2	2/2	0/2
<i>Bacillus spp.</i>	1/6	2/6	6/6	0/6	0/6	1/6	0/6	1/6	0/6
<b>TOPLAM (41)</b>	29	31	41	3	0	4	1	10	0
<b>YÜZDE (%)</b>	70.7	75.6	100	7.3	0	9.7	2.4	24.3	0

D: Dirençli suş sayısı, N: Toplam suş sayısı, P: Penisilin, AM: Ampisilin, B: Basitrasin, E: Eritromisin, AK: Amikasin, K: Kloramfenikol, TE: Tetrasiklin, NV: Novobiyosin, VA:Vankomisin

Identifikasyon sonucunda *Bacillus*'ların 35'inde tür tanısı yapılırken 6'sı tanımlanamamıştır. Bu sonuçlara göre içme sularında en sık rastlanan türün %36.58 oranıyla *B.cereus* olduğu belirlenmiştir (Tablo.2)

**Tablo 2.** İzole edilen *Bacillus* türleri

Tür Adı	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>B. cereus</i>	15	36.58
<i>B. circulans</i>	12	29.26
<i>B. mycoides</i>	6	14.63
<i>B. sphaericus</i>	2	4.87
<i>Bacillus spp.</i>	6	14.63
<b>TOPLAM</b>	<b>41</b>	

Suşlarda amikasin ve vankomisin direnci gözlenmezken basitrasine %100, ampisiline %76, penisiline %71 oranında direnç tespit edilmiştir. Ampisiline en fazla (%100) direnç gösteren türler *B. cereus* ve *B. mycoides* iken, *B. sphaericus* suşlarında ise ampisilin direnci gözlemlenmemiştir. Tetrasikline direnç yalnızca bir *B. cereus* (%2.4) suşunda rastlanmıştır. (Tablo 3).

## TARTIŞMA

*Bacillus*'lar topraktan, toprağın üst kısmındaki emilmemiş yağmur sularından, çöplerden, enfekte olmuş bitki materyallerinde olmak üzere çevreden kolaylıkla izole edilebilir. Sporları çevre şartlarına olağanüstü dirençli olmaları ve dormansilerinden dolayı her habitatta uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahiptirler (8). Çalışmamızda topraktan içme sularına karışabileceği düşüncesiyle Rize ve dört ilinden alınan su örnekleri, *Bacillus* içerikleri açısından araştırılmıştır. Toplam 287 su örneğinden 41'inde *Bacillus* suşu izole edilmiştir (Tablo 1). Klorlamanın yapıldığı istasyonlarda ölçümlerin hiçbirinde *Bacillus* gözlenmezken, Rize merkezde belirlenen ve halkın içme suyu olarak kullandığı kaynak sularının hepsinde izole edilmiştir. Bu sonucun il ve ilçelerde şebeke sularında yapılan klorlamanın *Bacillus* kontaminasyonunu engellediği, ancak kaynak sularında kontaminasyonun sürekli varlığını, dolayısıyla yüzey sularının bol olan yağışlardan dolayı yer altı sularına karıştığını göstermektedir.

Tür tanılarına bakıldığında *B. cereus* (% 36,58) en fazla izole edilen tür olarak görülmektedir. Bunu sırasıyla %29,26 oranıyla *B. circulans*, % 14,63 oranıyla *B. mycooides* ve % 4,87 oranıyla *B. sphaericus* takip etmektedir. *Bacillus* türleri çoğunlukla saprofit olup doğada yaygın olarak bulunur ve toz partikülleri ile sulara, bitkilere ve hayvan materyallerine bulaşır. *Bacillus antracis* dışındaki türler nadiren primer patojen olarak karşımıza çıkarlar ve ancak immün yetmezlikli hastalarda karışık enfeksiyonlarda seyrek olarak patojen rol oynarlar. *Bacillus cereus* toprak, su, süt gibi ortamlarda bulunan doğada yaygın bir bakteri olup, insanlarda besin zehirlenmelerinde önemli bir etiyolojik ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Besin zehirlenmesine enterotoksin kompleksi neden olup sürgün yaptıran (diyareli tip) ve kusuran (emetik tip) toksin olarak iki alt birimden oluşmaktadır (5,9).

Antibiyotik duyarlılık testlerinde izole edilen tüm bakteriler basitrasine duyarlı bulunmuştur (Tablo

3). Bazı *Bacillus* türleri basitrasine, polimiksin ve subtilin gibi peptid antibiyotikleri üreterek çeşitli mikroorganizmaların üremesini engellerken, kendilerini bu antibiyotiklere karşı koruma mekanizmalarını geliştirirler. Basitrasine, *Bacillus subtilis* Tracy 1 suşu ve *B. licheniformis* tarafından üretilir ve peptidoglikanın sentezini inhibe ederek etkili olur. (10).

Ampisiline direnç oranı çalışmada %76 gibi yüksek bir değerde bulunmuş ve en dirençli tür ise % 100 oranında *B. cereus* ve *B. mycooides* olarak tespit edilmiştir. İkinci olarak en yüksek direnç oranı penisiline (%71) karşı gözlenmiştir. Penisilin ve ampisilin hücre duvar sentezinin inhibe eden antibiyotikler olup dünya çapında tüketilen antibiyotiklerin %50'sinden fazlasını bu grup antibiyotikler oluşturmaktadır. Bu grup antibiyotiklere karşı oluşan direnç genellikle transfer edilebilir direnç plazmitleri (R-plazmit) üzerinde bulunmakta ve bu da direncin aynı tür veya farklı mikroorganizmalar arasında hızlıca yayılımına sebep olmaktadır (11). Banerjee ve ark. (12) tarafından yapılan bir çalışmada çalışmamızla benzer sonuçları bildirmektedirler. Bazı besin maddelerinde izole edilen 84 *B. cereus* suşlarının %100 oranında ampisilin ve bunu takiben %99 oranında da penisilin direnci tespit etmişlerdir.

Çalışmada aminoglikozid grubu antibiyotiklerden amikasin, glikopeptidlerden vankomisin kullanılmıştır. Bu iki antibiyotiğe karşı hiçbir suşta direnç bulunamamıştır. Banerjee ve ark. (12) tarafından yapılan çalışmada da aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı düşük oranda direnç belirlenirken, vankomisine direnç belirlenmemiştir.

Çalışmada kloramfenikole karşı direnç oranı %10 olarak bulunurken, *B. cereus* ve *B. mycooides* suşlarında direnç tespit edilemedi. Kloramfenikole karşı direnç kloramfenikol asetiltransferaz enziminin varlığı sonucudur. Gram pozitif ve negatif bakterilerde bu enzimin sentezlenmesi genellikle plazmid, bazen de kromozomal kontrol ile gözlenmektedir (13). Çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere karşı ise düşük bir direnç belirlendi.

Tetrasikline %2 ve makrolid grubu olarak kullanılan eritromisine ise %7 oranında bir direnç tespit edilmiştir.

Aslım ve ark. (14) tarafından topraktan izole edilen 30 adet *Bacillus*'u çoktan aza doğru sırasıyla *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* ve *Bacillus* spp. olarak tanımlamışlar ve gentamisin, sulbaktam-ampisilin, kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin, vankomisin, sefalotin, penisilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılıklarına bakmışlardır. Tüm suşların penisiline dirençli, vankomisine duyarlı, suşların %76'sının ampisiline, %20'sinin eritromisine, %3'ünün kloramfenikole ve %7'sinin tetrasikline karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

*Bacillus*'ların hem insan hem de hayvanlarda patojen olmaları, suda ve toprakta yaygın olarak bulunmaları, aktarılabılır plazmid veya kromozomal kökenli direnç genlerini taşımaları nedeniyle antibiyotik direncinin çevreye yayılmasında ve direnç genlerinin evriminde önem taşımaktadırlar (11). Bu çalışmanın, bölge insanının %95'inin sosyal güvenceye sahip olduğu ve kolayca antibiyotik temin edip kullandığı Rize bölgesinde, yağışların da bol olması, evsel atıkların doğal ortama hızlı bir şekilde yayılması, bir çok mikroorganizmada olduğu gibi *Bacillus*'ların da sık kullanımındaki bazı antibiyotik gruplarına karşı direnç kazanmış olabileceğinin araştırılması ve gerekli önlemlerin alınması için yapılacak diğer çalışmalara temel bilgi sağlayacağı açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

## Kaynaklar

1. Mezrioui N, Baleux B. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Researches* 1994; 28: 2399-2406.
2. Wegener H, Aarestrup F, Gerner-Smidt P, Bager, F. Transfer of resistant bacteria from animals to man. *Acta Veterinaria Scandinavia* 1999; 92(suppl.): 51-58.
3. Andersen J, Schäfer T, Jørgensen T, Møller L. Using inactivated microbial biomass as fertilizer: the fate of antibiotic resistance genes in the environment. *Res Microbiol* 2001; 52: 823-833.
4. Koneman EW, Allen SD, Jandan WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*, fifth Ed, Lippincot: New York, 1997: 651-654.
5. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara, 1999.
6. Brenner DJ. *Facultatively Anaerobic Gram negative Rods*. In: Krieg NR and Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1, Williams&Wilkins, Baltimore, 1986: 408-516.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approval Standard, M2-A6, Wayne, PA: NCCLS, 1997.
8. Ince Yılmaz E. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res Microbiol* 2003; 154: 409-415.
9. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. 10. baskı, Barış yayınları, İzmir, 2000.
10. Ohki R, Tateno K, Okada Y, Okajima H, Asai K, Sadaie Y, Murata M, Aiso TA. Bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol* 2003; 185(1): 51-59.
11. Nwosu VC. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol* 2001; 152: 421-430.
12. Banerjee M, Sarkar P K. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. *Food Microbiol* 2004; 21: 335-342.
13. Öztürk R. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu, *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, İstanbul, 1997.
14. Aslım B, Sağlam N, Beyatlı Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk J Biol* 2002; 26: 41-48.