
***Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Salmonella* Cinsi Bakterilerde Katı Fazda, Değişik Sıcaklıklarda Konjugatif Direnç Aktarımı**

Sibel GERGİN GÜNDEŞ*, Aynur KARADENİZLİ**, Fethiye KOLAYLI**,
Haluk VAHABOĞLU*, Ayşe WILLKE*

* Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı,
** Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİT

ÖZET

Konjugasyon, iki bakteri membranının birleşerek, gen aktarımının sağlanmasıdır. Bakteri içinde çoğalan konjugatif plazmidler, bu birleşmeyi sağlayan pililerin yapımından sorumludur. Konjugatif plazmid aktarımının katı, sıvı fazda ya da membran üzerinde farklı gerçekleştiği bilinmektedir. Enterobacteriaceae ailesine ait bazı cinslerde plazmid konjugasyonu ısıya da duyarlıdır. Bu çalışmada, Enterobacteriaceae ailesine ait çoğul dirençli *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Salmonella* cinslerinin iki farklı konsantrasyon ve üç farklı sıcaklıkta, direnç plazmidlerini alıcı *E. coli* J53-2'ye aktarmaları incelenmiştir. Bu amaçla her cinsten beş bakteri seçilmiş ve her bir bakteri iki farklı konsantrasyonda alıcı ile karşılaştırılmıştır [(a) grubunda verici:alıcı oranı 4:1; (b) grubunda ise 1:4'dür]. Tüm konjugasyonlar, plak yüzeyinde ve 32°C, 37°C, 42°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta karşılaştırılmıştır. "Repeated measures one way ANOVA test" ile yapılan "multivariate" analizlerde her üç grupta kendi içinde değişik sıcaklık ve konsantrasyon kıyaslamasında anlamlı farklılıklar göstermiştir. "Univariate" kıyaslamalarda tüm bakterilerde alınan değerlerin ortalama değerlerle karşılaştırılması sonucunda (b) grubuna ait 37°C'de gerçekleştirilen konjugasyonların daha başarılı olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, plak konjugasyon deneyinin her incelemeye alınacak bakteri cinsi için optimize edilmesi gerektiği, ısı olarak 37°C'nin tercih edilmesi ve verici:alıcı oranının 1:4 olmasının daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Transkonjugasyon, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*

SUMMARY

Evaluation of Resistance Transfer by Conjugation, in *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Salmonella* Species, on Solid Phase at Different Temperatures

Conjugation means transfer of genetic material via bacterial membranes. Fimbrial characters that are responsible for this transfer are coded by conjugative plasmids that multiply in the cytoplasm. This transfer efficiency may be different in solid, liquid phases or on membranes. Conjugation in some of the members of Enterobacteriaceae family is also temperature dependant. This study was carried out to determine the optimal temperature and donor-acceptor ratios for transconjugation in *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Salmonella* species which belong to Enterobacteriaceae family. Fifteen strains, five from each of these species that

mentioned above, which were determined to be multiresistant, were introduced to standart recipient *E. coli* J53-2 in two different concentration [(a) donor:recipient ratio 4:1; and (b) donor:recipient ratio is 1:4] and three different temperatures 32°C, 37°C and 42°C. "Multivariate" analysis was done with "repeated measures one way ANOVA test" whereas "univariate" analysis was done with "Wicoxon Sign Rank" tests. The results of these two tests correlated well and the results were found to be statistically different. In conclusion, transconjugation on solid phase was found to be optimal for group (b) where the recipient:donor ratio was 4:1 and the temperature was 37°C.

Key Words: Transconjugation, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*

Mikroorganizmalar arasında gerek in vivo gerekse in vitro koşullarda DNA aktarımları meydana gelmektedir. Bu genetik materyalin aktarılmasındaki yollardan birisi de konjugasyondur. Konjugasyonda (seksüel transfer) bir bakteriye ait genetik madde (DNA), aynı cins içerisinde bulunan veya aynı türden diğer bir mikroorganizmaya direkt temas ya da seks pilusları aracılığı ile transfer edilir. Verici ve alıcı hücre arasındaki ilişkiyi sağlayan pililerin sentezinden plazmidler sorumludur. Doğal olarak da bulunabilen bu DNA karakterindeki ekstrakromozomal genetik elementlere (plasmid), *Escherichia coli*, *Klebsiella* türleri, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*'de sıkça rastlanılmakta ve bunların bazıları da virulans ile ilişkili bulunmaktadır^[1]. Enterobacteriaceae ailesinde tüm konjugatif plazmidler sert ve esnek olmak üzere iki ana formda pili oluşturur. Esnek pililer de kalın ve ince olmak üzere iki gruba ayrılır^[1]. Sert pilileri kodlayan konjugatif plazmidlerin konjugasyonu zorunlu olarak bir yüzey üzerinde gerçekleşirken, konjugatif plazmid sentezinin katı, sıvı fazda ya da membran üzerinde farklı gerçekleştiği artık bilinmektedir.

Bu çalışmada, direnç genlerinin transferinde en önemli mekanizma olan konjugasyon; bu aktarım şeklini en sık kullanan Enterobacteriaceae ailesi içerisinde incelenmiştir. Bu amaç ile çoğul dirençli olduğu belirlenen *E. coli*, *Klebsiella* ve *Salmonella* cinslerinin iki farklı konsantrasyon ve üç farklı sıcaklıkta, direnç plazmidlerini alıcı *E. coli* J53-2'ye aktarmaları incelenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Eylül 1999-Aralık 1999 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakterioloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarı'nda izole edilen çoğul dirençli beş *E. coli*, beş *Klebsiella* ve beş *Salmonella* cinsi olmak üzere toplam 15 bakteri çalışmaya alınmak üzere seçilmiştir.

Bakteri İdentifikasyonu

Gram boya ve KOH testi ile Gram özellikleri tanımlanan bakterilerin MacConkey agardan alınan

saf kültürleri üç şekerli demirli besiyerine, sitrat, üre ve SIM agara çekilerek, 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Koloniler besiyerlerindeki üreme özelliklerine, sitrat, üre kullanımı, hareket, H₂S yapımı, laktoz ve glukozu kullanımlarına göre isimlendirildi.

Antibakteriyellere Dirençliliğin Saptanması

Disk diffüzyon yöntemi ile Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid) ve aynı firmadan tedarik edilen disklerle gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar "National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)"ın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir^[2].

***E. coli* J53-2 suşu**

Deneylerde *E. coli* J53-2 (met pro rif^r) suşu kullanılmış ve yapılan incelemelerde bu suşun hareketli, laktoz (+), indol (+), sitrat (d), Metil-Red (+), Voges-Proskauer (-), H₂S (-), üreaz (-) özelliklere sahip olduğu görülmüştür. Kontrol edilen antibiyogram sonuçlarına göre rifampisine (RIF) dirençli, ampisilin (AMP) ve seftazidime (CAZ) duyarlı olduğu saptanmıştır.

Verici (Donör) Suşlar

Yukarıda adı geçen, klinik örneklerden izole edilen toplam 15 bakteri kontrol amacı ile 8 mg/L ampisilinli, 100 mg/L rifampisilinli ve 8 mg/L seftazidimli Isosensitest agara ekildi. Ampisilin ve seftazidime dirençli, rifampisine duyarlı olduğu saptanan suşlar aranan verici suşlar olarak doğrulandı.

Besiyerlerinin İnokülasyonu ve Transkonjugasyon

Onbeş verici ve bir alıcı olmak üzere toplam 16 suş, antibiyotikli besiyerlerinden MacConkey agara tek koloni pasajı yapılarak 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Buradan alınan dört ila beş koloni (a) 2 mL ve (b) 500 µL olmak üzere iki ayrı tüpteki "Mueller-Hinton buyyon (MHB)" içerisinde süspanse edildi. İnokulum yoğunluğunun standardize edilmesi için 0.5 McFarland standardı kullanıldı (bu standart 10⁸ cfu/mL bakteri yoğunluğuna eşittir). Mc Farland 0.5 bulanıklığa ulaşıncaya kadar 37°C'de iki-dört saat çalkalanarak inkübe edildi. Alıcı *E. coli* J53-2 suşu

da aynı şekilde fakat 50 mL olarak hazırlandı. Üreme gözlemlendikten sonra (a) grubu saf verici süspansiyonlarına alıcı *E. coli*'den 500 µL (b) grubu saf verici süspansiyonlarına alıcı *E. coli*'den 2 mL eklendi. 37°C'lik etüvde, "shaker"da yarım saat çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyonu takiben her bir tüpten 10'ar µL alınarak üç ayrı antibiyotiksiz MHA'ya ekim yapıldı ve petriyer ayrı ayrı 32°C, 37°C, 42°C'lerde 16-18 saat bekletildi. Ertesi gün üreyen karışık bakteriler 1 mL MHB içerisine McFarland 0.5 olacak şekilde süspansiyon edilerek, hazırlanan rifampisinli (100 mg/L) ve ampisilinli (8 mg/L) besiyerlerine 10'ar µL pasaj edildi.

Burada üreyip, transkonjugat olduğu düşünülen tek ve büyük koloniler kontrol amacı ile tekrar alınarak antibiyotikli besiyerlerine yoğun ekim, antibiyotiksiz besiyerlerine de tek koloni ekimi yapıldı. Antibiyotikli besiyerlerinde üreyen kolonilerin identifikasyonu ve antibiyogramı yapıldı. RIF ve AMP'li besiyerlerinde, AMP duyarlı olan orjinal alıcı *E. coli* üreyemedi. Deneye tabi tutulan AMP ve CAZ dirençli ama RIF duyarlı suşlar da üreyemedi. Sadece AMP direncini alan, kendisi zaten RIF dirençli olan transkonjugat *E. coli* üreyebildi. Yapılan IMVIC testlerinde de üreyen koloninin *E. coli* olduğu doğrulandı. Her bir petride üreyen koloni sayısı karşılaştırma yapmak üzere hazırlanan tablolara yerleştirildi.

İstatistik Değerlendirme

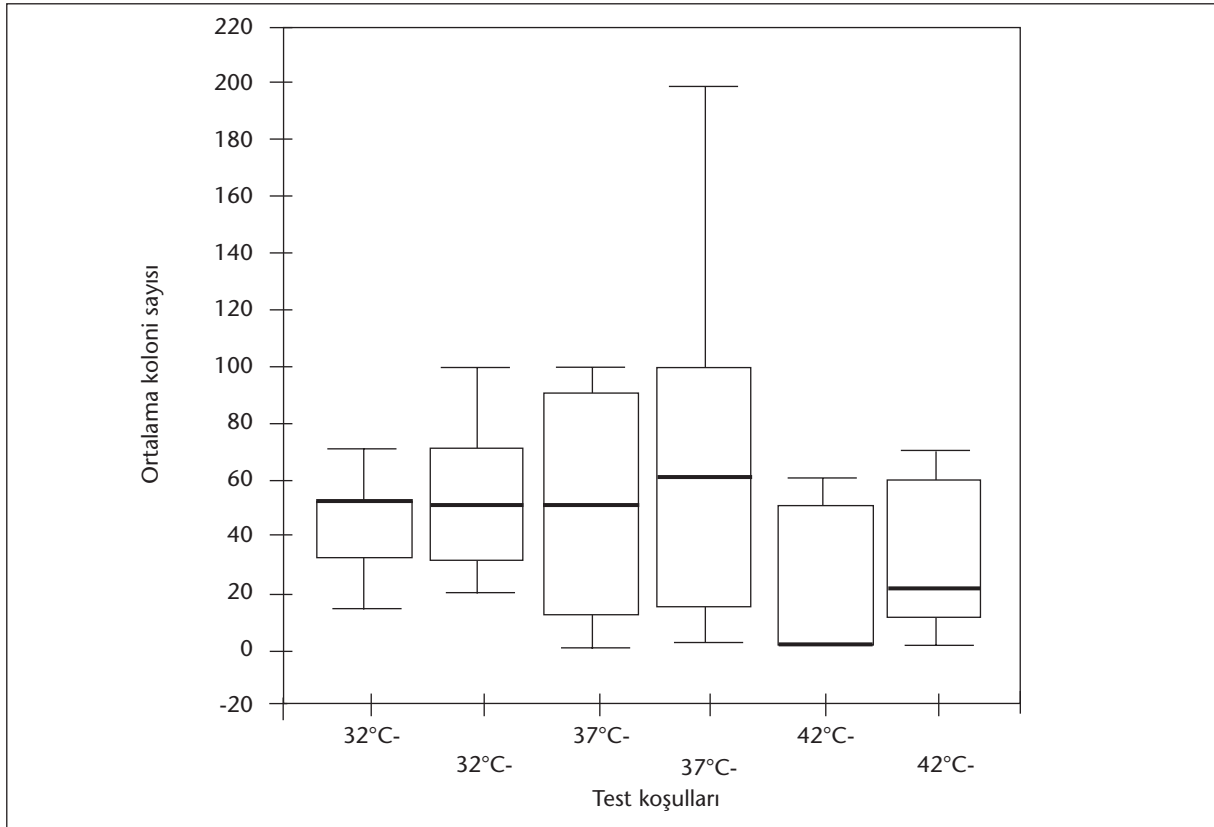
Koloni sayıları "repeated measures one way ANOVA" testi ile "multivariate" olarak kıyaslandı. İstatistik olarak anlamlı bulunan test sonuçları ikili olarak "Wicoxon Sign Rank test" ile kıyaslanarak anlamlı farklılıklar $p < 0.05$ seviyesinde tanımlandı.

BULGULAR ve TARTIŞMA

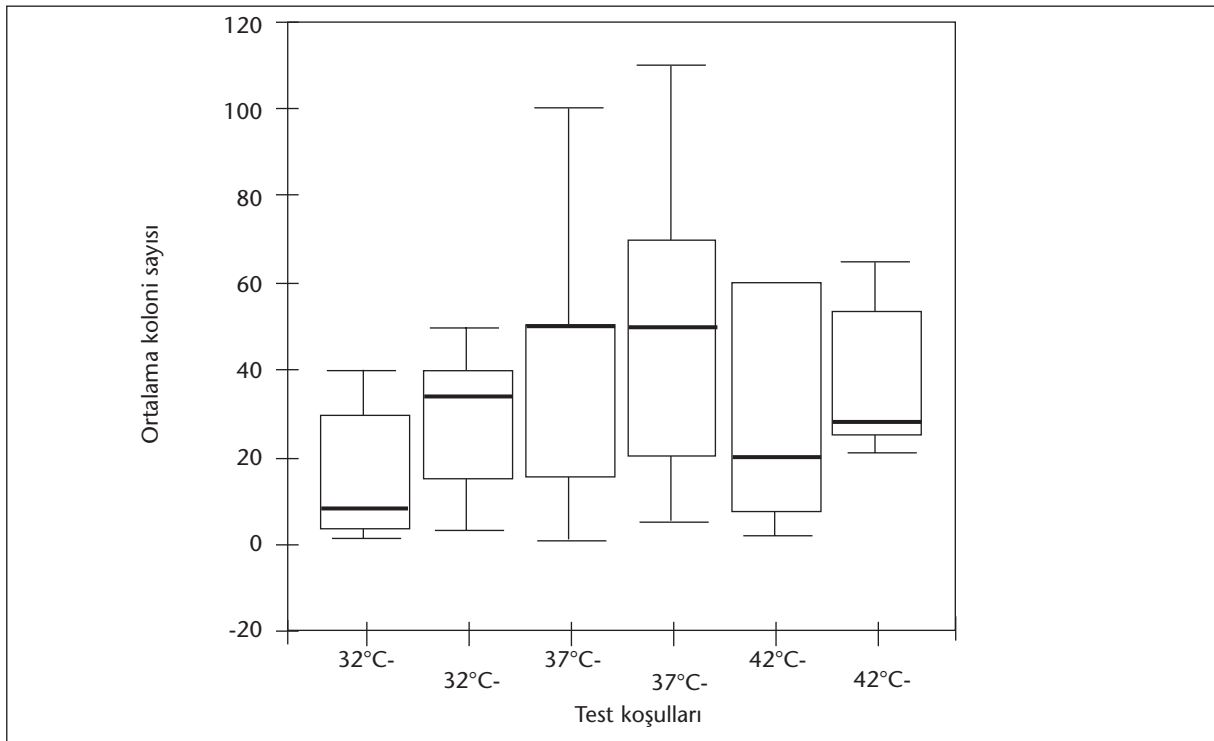
Konjugatif direnç aktarımının özellikle Enterobacteriaceae ailesinde fazlaca rastlanılmasından dolayı, deneyleri yürütmek amacı ile bu aileye ait *E. coli*, *Klebsiella* ve *Salmonella* cinsleri seçildi. Seçilen 15 suşun ampisilin ve seftazidim dahil olmak üzere antibakteriyellerin çoğuna dirençli, rifampisine duyarlı olmasına dikkat edildi. Her bir suş alıcı *E. coli* ile iki farklı konsantrasyonda karşılaştırıldı ve bu grupların transkonjugasyonu üç farklı sıcaklıkta denendi. Sonuçta elde edilen transkonjugat koloniler tek tek sayılarak mililitredeki koloni sayıları elde edildi (Tablo 1). Bu yol ile direnç aktarımının hangi sıcaklık ve konsantrasyonda daha fazla olabileceği araştırıldı. Suşların tümünde transkonjugat elde edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre hem sıcaklık farkı, hem de karşılaşılan hacim transkonjugasyonu etkilemektedir (Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3). Literatürde bakteriler arasındaki konjugatif transfer sıkça çalışılmakla beraber transfer koşullarının irdelendiği bir çalış-

Tablo.1 Transkonjugatların farklı sıcaklık ve konsantrasyondaki koloni sayıları. Verici:alıcı oranı, (a) için 4:1, (b) için 1:4'tür.

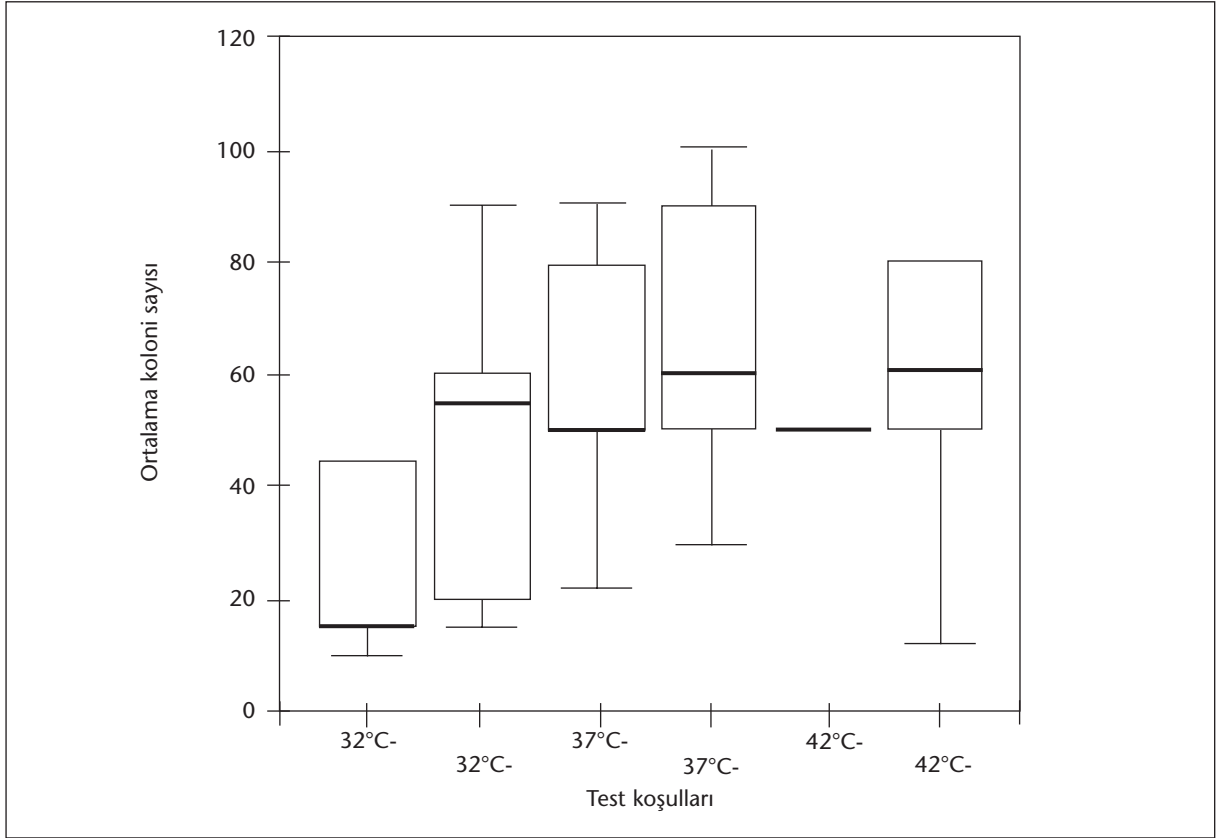
No	Bakteri	32°C (a)	32°C (b)	37°C (a)	37°C (b)	42°C (a)	42°C (b)
1	<i>E. coli</i>	50	70	100	200	1	10
2	<i>E. coli</i>	50	50	1	2	1	1
3	<i>E. coli</i>	15	20	11	15	50	70
4	<i>E. coli</i>	70	100	90	100	2	20
5	<i>E. coli</i>	30	30	50	60	60	60
6	<i>Salmonella</i>	40	40	100	110	20	25
7	<i>Salmonella</i>	30	50	15	20	7	28
8	<i>Salmonella</i>	8	34	50	70	2	20
9	<i>Salmonella</i>	2	3	1	5	60	65
10	<i>Salmonella</i>	3	15	50	50	60	53
11	<i>Klebsiella</i>	90	90	80	100	50	80
12	<i>Klebsiella</i>	15	20	22	30	50	80
13	<i>Klebsiella</i>	15	15	50	50	50	50
14	<i>Klebsiella</i>	10	60	50	60	50	60
15	<i>Klebsiella</i>	45	55	90	90	15	12



Şekil 1. *E. coli* cinsi bakterilerin uygulanan test koşullarına göre ortalama koloni sayıları. Verici ve alıcının karşılaştırıldığı oranlar a gruplarında (verici:alıcı) 4:1, b gruplarında ise 1:4'tür.



Şekil 2. *Salmonella* cinsi bakterilerin uygulanan test koşullarına göre ortalama koloni sayıları. Verici ve alıcının karşılaştırıldığı oranlar a gruplarında (verici:alıcı) 4:1, b gruplarında ise 1:4'tür.



Şekil 3. *Klebsiella* cinsi bakterilerin uygulanan test koşullarına göre ortalama koloni sayıları. Verici ve alıcılardan karşılaştırıldığı oranlar a gruplarında (verici:alıcı) 4:1, b gruplarında ise 1:4'tür.

maya rastlanmamıştır^[4,5]. Bu da bizi sonuçlarımızı kıyaslama olanağından yoksun bırakmıştır. Her bir bakteri için alınan istatistikî sonuçlar kendilerine ait tablolarda gösterilmiştir. Sonuç olarak plak konjugasyon deneyinin incelemeye alınacak her bakterinin cinsine göre farklı sıcaklık ve konsantrasyonlarda farklı sonuçlar verebileceği anlaşılmış ve bu üç cins için en verimli sonuçlar alıcının vericiye göre 1:4 oranında kullanıldığı (b) grubunda ve 37°C'de gerçekleştiği görülmüştür. Elde edilen bu sonuca göre, transkonjugasyon deneylerinin bu verilere dayanılarak yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Davis GL, Dabler M, Battey J. The basics of molecular biology. In: Basic methods in molecular biology. Section 1. New York: Elsevier, 1986.
2. NCLLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards 1999:M2- A6 and M7-A4.
3. Coetzee JN, Datta N, Hedges RW. R-factors from *Proteus rettgeri*. J Gen Microbiol 1972;72:543-52.

4. Ohno A. The conjugative transfer of beta-hemolysin plasmid in *Enterococcus faecalis* to *Enterococcus faecium*. Kansenshogaku Z 1990;64:436-43.
5. Oswald W, et al. A single step transconjugation system for the introduction of unmarked deletions into *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7 using a sucrose sensitivity marker. FEMS Microbiol Lett 1999;1:179: 153-60.

Yazışma Adresi:

Dr. Sibel GERGİN GÜNDEŞ

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi

Klinik Bakteriyoloji ve

İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

İZMİR

Makalenin Geliş Tarihi: 20.05.2000

Kabul Tarihi: 08.11.2000