



Ekoloji

13, 52, 28-32
2004

Mersin Kıyı Şeridinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Bazı Antibiyotiklere Karşı Plasmid Kökenli Dirençliliğin Saptanması

Fahri KARAYAKAR, Özcan AY, Bedii CİCİK

Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yenişehir Kampüsü, MERSİN

Özet

Bu çalışmada istasyon olarak Mersin kıyı şeridinde yer alan Mersin Balıkçı Barınağı, Karaduvar, Çeşmeli ve Taşucu seçilmiştir. Belirlenen istasyonlardan alınan su örneklerinden izole edilen *Escherichia coli* bakterilerinin, III. Kuşak antibiyotiklerden Sefazol (CF), Seftriakson (CRO) ve Sefizox (ZOX)'a karşı doğal dirençlilik frekansları saptanmıştır. En fazla doğal dirençlilik Mersin Balıkçı Barınağı istasyonundan örneklenen bakterilerde saptanırken, bunu Karaduvar, Çeşmeli ve Taşucu istasyon örneklemeleri izlemiştir.

Dirençlilik ile ilgili genetik bilgiyi plasmid üzerinde olan bakterilerin % frekansları, akrinin oranj mutajeninin kullanıldığı plasmid eliminasyon testleri ile belirlenmiştir. Plasmide bağlı dirençlilik en fazla Mersin Balıkçı Barınağı istasyonundan örneklenen bakterilerde saptanmış ve bunu sırasıyla Karaduvar ve Çeşmeli istasyonları takip etmiştir. Taşucundan örneklenen bakterilerde plasmide bağlı antibiyotik dirençliliği belirlenmemiştir.

Doğal ve plasmide bağlı dirençlilik, en fazla Sefazol (CF) antibiyotiğine karşı gelişirken bunu sırasıyla Sefizox (ZOX) ve Seftriakson (CRO)'a karşı dirençliliğin izlediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, dirençlilik, *Escherichia coli*, plasmid.

The Identification of Plasmide Dependent Resistancy of *Escherichia coli* against some Antibiotics Isolated from Stations on Mersin Shore Line

Abstract

This study investigated the water samples collected from Mersin fishing pier, Karaduvar, Çeşmeli and Taşucu stations located on Mersin shore line. *Escherichia coli* isolated from water samples collected from above mentioned stations were investigated for the frequency of their natural resistancy against the third generation antibiotics Sefazol (CF), Seftriakson (CRO) and Sefizox (ZOX). The highest rate of natural resistancy was found in samples collected from Mersin fishing pier station followed by Karaduvar, Çeşmeli and Taşucu stations.

The percentage of frequency of bacteria whose genetic information about resistancy is located on plasmides was identified by plasmide elimination tests employing acridine orange mutagenes. The highest plasmide resistancy was measured in bacteria sampled from Mersin fishing pier station followed by Karaduvar and Çeşmeli stations. No plasmide dependant antibiotic resistancy was identified in bacteria sampled from Taşucu station.

In conclusion, it was demonstrated that the highest natural and plasmide dependant resistancy was found against the antibiotics Sefazol (CF) followed by Sefizox (ZOX) and Seftriakson (CRO).

Keywords: Antibiotic, *Escherichia coli*, plasmid, resistancy.

GİRİŞ

İnsanların günlük yaşam gereği harcadığı ve kullanım sularının oluşturduğu atıksular, çeşitli şekillerde yerleşim birimlerinden çevre sularına katılmaktadırlar. Bu nedenle sucul ortamlar, katılan suların içerdiği kirlilik etkenlerine bağlı olarak organik ve inorganik maddeler tarafından kirletilmektedir. Günümüzde çevre sularının evsel atıklarla kirliliği, endüstriyel atıkların oluşturduğu kirlilik ile hemen

hemen aynı düzeydedir. Atık suların herhangi bir arıtma işlemi uygulanmadan çevre sularına katılımı, içerdikleri organik maddelerin mikroorganizmalarca parçalanması sonucu çevre sularında doğal yaşam koşullarının bozulmasına neden olurken içerdikleri çeşitli toksik maddeler ve patojen mikroorganizmalar nedeniyle insan sağlığı açısından da önemli tehlikeler oluşturur (Garber 1987, Holmström ve ark. 2003).

Bakterilerin bir kısmı plasmid adı verilen ve genetik materyalin bir kısmını oluşturan yapılar taşırlar. Plasmid'in yapısı bakteri kromozomundan farklı olup, konjugasyon yolu ile antibiyotik dirençliliğinin taşınmasında aktif olarak rol oynarlar ve bu nedenle R-plasmidi adını alırlar.

Konjugatif plasmidler, 30 kb (kilobyte)'dan daha küçük olup konjugasyon yolu ile verici bakteriden alıcı bakteriye geçebilmekte ve konjugasyon yapabilmek için transfer genine gereksinim duymaktadırlar. Spesifik bir şekilde multiple dirençlilik konjugatif plasmidlerin çoğunda, dirençlilik genleri ile transfer genleri kovalent olarak bağlanmış durumda bulunur.

Özellikle evsel atıklar, R-plasmidi taşıyan ve çoğunluğu insan barsak florasından kaynaklanan bakteriler içerir. Bu bakterilerde antibiyotiklere dirençlilik kazandıran R-plasmidleri yaygın olarak bulunduğundan, atık suların çevre sularına deşarjı, bu tip dirençli bakterilerin çevreye yayılmasına neden olmaktadır (Grabow ve ark. 1975, Anders 1998, Zgurskaya ve Nikaido 2000). Sucul ortamlarda R-plasmidlerinin dağılımını etkileyen en önemli faktör, su hareketleridir. Atık suların izole edilen ve antibiyotik dirençliliği gösteren koliform bakterilerin bu tip sulardaki mevcudiyeti, elverişsiz ortam şartlarında bile varlıklarını sürdürdüklerinin göstergesidir (Niemi ve ark. 1983, Alderman ve Hastings 1998).

Meksiko körfezinde yüzey sularından izole edilen *E. coli* suşunun, multiple antibiyotik dirençliliği gösterdiği ve % olarak kromozomal dirençliliğinin Amfisilin için 12,5, Kanamisin için 6,9, Nalidiksik asit için 2,9, Neomisin için 3,2 olduğu belirlenmiştir (Parveen ve ark. 1997).

E. coli suşları ile yapılan bir araştırmada, HKY56 suşunda Amfisilin, Seftazidin, Sefotaksin ve Azetronam antibiyotiklerine karşı dirençlilik bilgisyonu taşıyan plasmidin, HKY273 suşuna aktarımı başarılı bir şekilde sağlanmıştır (Yagi ve ark. 1997).

Denizel ortamlardaki bakteri topluluklarında, konjugasyon yolu ile yüksek düzeyde plasmid transferi yapıldığı ve *Pseudomonas putida*'da plasmid transferinin gerçekleşebilmesi için ortamda temel organik maddelerin bulunması gerektiği saptanmıştır (Dahlberg ve ark. 1998).

Mersin ilinde atıksu arıtma tesislerinin olması, kamuya ait hastaneler ve özel polikliniklerin kanalizasyon deşarjlarının herhangi bir işlem görmeden doğrudan şehir kanalizasyonu ile birlikte, denizin iki mil açığına pompalanması, III. kuşak Sefalosporinlerin toplum tarafından bilinçsiz bir şekilde kullanılması nedeniyle bu araştırmada, Mersin kıyı şeridinde belirlenen istasyonlardan elde

edilen su örneklerinden izole edilen *E. coli*'lerin bazı antibiyotiklere karşı plasmid kökenli dirençliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırma 1999 yılı Eylül ayında, Mersin Kıyı Şeridinde yer alan Karaduvar, Mersin Balıkçı Barınağı, Çeşmeli ve Taşucu istasyonlarında yürütülmüştür. Araştırma istasyonlarından Karaduvar, Mersin Balıkçı Barınağı ve Çeşmeli'nin seçiminde, nüfus yoğunluğunun yüksek düzeyde olması, atıksu arıtma sistemlerinin yeterli düzeyde olmaması, kanalizasyon atıklarının doğrudan doğruya denize verilmesi gibi kriterler dikkate alınmıştır. Taşucu istasyonu ise açık deniz olması, kirletici faktörlerin düşük düzeyde olması nedeniyle referans olarak seçilmiştir. Araştırmada materyal olarak, Enterobacteriaceae üyelerinden *E. coli* kullanılmıştır.

Belirlenen istasyonlardan su örneklemeğinde Anonymous (1992), örneklerin laboratuvara taşınması ve ortamdan Gram (+) bakterilerin uzaklaştırılmasında Arıkan (1990) tarafından belirtilen yöntemler uygulanmıştır. Bakterilerin identifikasyonunda MDCLS (Modifiye Desoxycholat- Citrat - Laktöz - Saccharose- Agarı) besiyeri kullanılırken (Çolak ve Arıkan 1990), izole edilen bakterilerin çoğaltılması ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde N1 (Nutrient agar, Difco) besiyeri kullanılmıştır (Ohara ve ark. 1998). Antibiyotikli besiyeri, Sefazol (CF), Ceftrizoxime (ZOX) ve Ceftriaxone (CRO)'nun 30 µg/ml derişimlerinde N1 besiyerine ilave edilmesi ile elde edilmiştir. Antibiyotik dirençliliği, plasmid kaynaklı olan bakterilerin tanımlanmasında ise 20 µg/ml akridin oranj içeren sıvı besiyerlerinden yararlanılmıştır (Ay 1996).

Belirlenen istasyonların her birinden ayrı ayrı 4 kez örnekleme yapılmıştır. Laboratuvara getirilen örnekler, 37°C'ye ayarlı etüvde 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda bakteri örnekleri MDLCS-Agar besiyerine 10⁶ ve 10⁷ oranında seyreltilerek yayılmış ve yeniden 18 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde üreyen kolonilerden, koloni morfolojileri ve Enterobacteriaceae tanı anahtarı dikkate alınarak 250 adet *E. coli* seçilmiştir. Biyokimyasal testlerle de tanımı yapılan bakteriler, N1 besiyerine alınarak çoğaltılmıştır. Üreme periyodu sonunda bakteriler, içerisinde 30 µg/ml derişiminde antibiyotik içeren besiyerine çizgi yöntemi ile ekilerek üremeye bırakılmış ve dirençlilik gösteren bakteriler belirlenmiştir (Ay 1996).

Antibiyotiklere dirençli oldukları belirlenen bakteri örnekleri, plasmid eliminasyon testlerinden geçirilerek plasmide bağlı dirençlilik saptanmıştır (Ay 1996). Plasmid eliminasyonu, önceki aşamalarda

antibiyotik dirençliliği taşıdığı belirlenmiş suşlarla yapılmıştır. Deneysel verilerinin değerlendirilmesinde "Student-Newman Keul's Test" (SNK) uygulanmıştır (Sokal ve Rohlf 1969).

BULGULAR

Araştırma iki aşamada yürütülmüştür. Birinci aşamada belirlenen istasyonlardan alınan su örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının CRO, ZOX ve CF antibiyotiklerine karşı dirençlilik frekanslarının aritmetik ortalamaları ile istatistik analizleri Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 1. Mersin Balıkçı Barınağı, Karaduvar, Çeşmeli ve Taşucu istasyonlarından alınan su örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının CRO, ZOX ve CF antibiyotiklerine karşı doğal dirençlilik frekansları.

Örneklem İstasyonu	Antibiyotik					
	CRO		ZOX		CF	
	X ± sx	*	X ± sx	*	X ± sx	*
Mersin Balıkçı Barınağı	32,25 ± 0,85	as	39,25 ± 1,65	bs	91,75 ± 1,86	cs
Karaduvar	27,00 ± 1,77	at	29,00 ± 1,87	at	79,00 ± 1,92	bt
Çeşmeli	18,00 ± 1,08	ax	17,00 ± 1,12	ax	59,00 ± 2,54	bx
Taşucu	0	ay	0	ay	9	± 2,01 ax

*SNK; a, b ve c harfleri antibiyotiklere karşı dirençlilik frekansları, s, t, x ve y harfleri ise istasyonlar arasındaki farklılığı göstermek için kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayırım vardır. X ± sx; Aritmetik ortalama ± standart hata.

İzole *E. coli* suşlarının β-laktam antibiyotiklerine karşı doğal dirençliliği, belirlenen istasyonlar arasında önemli düzeyde farklılık göstermiştir. Karaduvar ve Çeşmeli istasyonlarında CRO ve ZOX antibiyotiklerine karşı geliştirilen doğal dirençlilik arasında istatistiksel bakımdan herhangi bir ayırım saptanmamıştır. Belirtilen istasyonlarda CF antibiyotigi ile Mersin Balıkçı Barınağında incelenen tüm antibiyotiklere karşı doğal dirençlilik bakımından önemli düzeyde ayırım belirlenmiştir. Kullanılan antibiyotiklere karşı doğal dirençlilik bakımından örneklem istasyonları arasındaki ilişki aşağıdaki şekildedir.

Mersin Balıkçı Barınağı > Karaduvar > Çeşmeli > Taşucu

Taşucu'nda ise sadece CF antibiyotigine karşı direnç gözlenirken, diğer iki antibiyotige karşı herhangi bir dirençlilik saptanmamıştır.

Araştırmanın ikinci aşamasında, dirençli bakterilere akridin oranj uygulanmış ve plasmid eliminasyon testlerinden elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları ile istatistik analizleri Tablo 2'de sunulmuştur.

Belirlenen tüm istasyonlarda, CF dışında incelenen antibiyotiklere karşı plasmide bağlı dirençlilik bakımından bir ayırım saptanmamıştır. Ancak plasmide bağlı dirençlilik, istasyonlar arasında istatistiksel bakımdan önemli düzeyde farklılık göstermiştir. Plasmide bağlı dirençlilik bakımından istas-

Tablo 2. Mersin Balıkçı Barınağı, Karaduvar, Çeşmeli ve Taşucu istasyonlarından alınan su örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarının CRO, ZOX ve CF antibiyotiklerine karşı plasmide bağlı dirençlilik frekansları.

Örneklem İstasyonu	Antibiyotik					
	CRO		ZOX		CF	
	X ± sx	*	X ± sx	*	X ± sx	*
Mersin Balıkçı Barınağı	28 ± 1,47	as	25 ± 1,11	abs	22 ± 1,05	bcs
Karaduvar	24 ± 1,08	at	22 ± 1,33	abt	19 ± 1,11	bcs
Çeşmeli	16 ± 1,06	ax	16 ± 1,06	ax	15 ± 1,08	at
Taşucu	0	ay	0	ay	(0 ax)	

*SNK; a, b ve c harfleri antibiyotiklere karşı plasmide bağlı dirençlilik frekansları, s, t, x ve y harfleri ise istasyonlar arasındaki farklılığı göstermek için kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayırım vardır. X ± sx; Aritmetik ortalama ± standart hata.

yonlar arasındaki ilişki aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

Mersin Balıkçı Barınağı > Karaduvar > Çeşmeli > Taşucu

TARTIŞMA

Evsel atıksular, antibiyotik dirençliliği gösteren organizmaların en önemli kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Bakteriler, yeni antibiyotiklere dirençli duruma geldikçe, değişik ortam şartlarına kolayca uyum sağlayabilmekte ve bu olayda plasmid adı verilen ekstrasözomal DNA yapılarının taşıdıkları dirençlilik bilgisi önemli rol oynamaktadır (Saunders 1984, Urban ve Rahal 1997). İnsan ve hayvanlar, R-plasmidlerinin en önemli rezervuarlarını oluştururlar (Bell ve ark. 1983, Yağı ve ark. 1997). Enterik bakterilerin rezervuarı olan kanalizasyon sularının, arıtılmaksızın sucul ortamlara katılması, R-plasmidlerinin geniş alanlara yayılmasına neden olur (Grabow ve ark. 1975, Sobczyk ve ark. 1997).

Plasmid dirençliliğine sahip bakterileri içeren atıksuların, içme suyu rezervuarlarını oluşturan nehir, göl veya akarsu gibi yüzey sularına katılması plasmid taşıyan bakterilerle kontaminasyon tehlikesini artırırken, ortaya çıkabilecek barsak enfeksiyonlarının tedavi başarısını belirgin bir şekilde azaltacaktır (Niemi ve ark. 1983, Jacoby ve ark. 1997, Yağı ve ark. 1997).

III. Kuşak Sefalosporinlerle yapılan bir çalışmada, doğal dirençlilik frekans %'sinin, yüksek düzeyde olduğu ve bunun nozokomiyal atıklarla sucul ortama katılan antibiyotiklerden kaynaklandığı belirlenmiştir (Stewart ve Koditschek 1980). Örneklem istasyonları arasında en yüksek doğal dirençlilik frekansının Mersin Balıkçı barınağında saptanması da, bölgenin şehir atıksu deşarjına yakın olması, barınakta korunan balıkçı ve küçük yük tekneleri ile yatların sintine tanklarını bölgeye boşaltması sonucu meydana gelen organik ve bakteriyel kirlilikten kaynaklandığı olasıdır. Ayrıca konum

itibarıyla bölgede su sirkülasyonunun durağanlığı, doğal R-plasmidi taşıyan Enterobacteriaceae üyeleri arasında konjugasyon köprüleri aracılığı ile dirençliliğin yayılmasında önemli bir etkindir (Ay 1996).

Mersin İli doğusunda yer alan Karaduvar istasyonu; endüstriyel aktivite ile yoğun yerleşim sonucu, endüstriyel ve bakteriyel kirliliğin etkisi altındadır. Endüstriyel kirliliğin tek başına, bakteriler arasında R-plasmidi aracılığı ile antibiyotiklere karşı dirençlilik bilgi aktarımını stimüle etmediği belirlenmiştir (Kathe 1976, Arıkan 1990). Bununla beraber Karaduvar da nozokomiyal atıkların herhangi bir arıtma işlemi uygulanmadan kanalizasyon aracılığı ile denize verilmesinin, bakteriler arasında dirençlilik bilgi transferini sağladığı olasıdır. Ayrıca Karaduvar da doğal dirençlilik frekansının, Mersin Balıkçı Barınağına oranla düşük olması, nüfus yoğunluğunun az olduğunu ve nozokomiyal kökenli bakterileri içermediğini gösterir.

Çeşmeli istasyonundan örneklenen sulardan izole edilen *E. coli*'lerde doğal dirençlilik frekansının, Mersin Balıkçı Barınağı ve Karaduvar istasyonlarındakine göre düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Doğal dirençlilik frekansındaki düşmenin, çeşmeli istasyonundaki yerleşim alanlarında yaşayan insan sayısının az olması ve evsel endüstriyel ve hastane kökenli kanalizasyon deşarjlarının bölgede olmama-

sından kaynaklanabilir.

En düşük doğal dirençlilik frekansı Taşucu istasyonunda belirlenmiştir. Bölgenin düşük yoğunlukta nüfusa sahip olması, sağlık merkezlerinin sayıca az olması, mevcut endüstriyel işletmelerin verimli arıtma sistemlerine sahip olması açık deniz nedeniyle su sirkülasyonunun devamlı olması plasmid aktarımını engelleyerek doğal dirençlilik frekansında düşmeye neden olmuştur.

Araştırmanın ikinci aşamasında, doğal dirençlilik gösteren bakterilere, plasmid eliminasyon testleri uygulanmıştır. Belirlenen istasyonlardan alınan su örneklerinden izole edilen bakterilerin, incelenen CF, CRO ve ZOX antibiyotiklerine karşı plasmid kökenli dirençlilik bakımından istasyonlar arasında aşağıdaki ilişki saptanmıştır.

Mersin Balıkçı Barınağı > Karaduvar > Çeşmeli Taşucu istasyonunda ise plasmid kökenli herhangi bir dirençlilik belirlenmemiştir. İncelenen antibiyotikler arasında ise plasmid kökenli dirençlilik en fazla CF antibiyotiğinde gözlenirken, bunu ZOX ve CRO izlemiştir. Plasmid bağlı dirençliliğinin ortaya çıkması, antibiyotiklerin yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanımı ile nozokomiyal atıklarındaki dirençli bakterilerin herhangi bir işlemde geçirilmeksizin şehir kanalizasyonları aracılığı ile sucul ortamlara katılmasından kaynaklandığı olasıdır.

KAYNAKLAR

- Alderman DJ, Hastings TS (1998) Antibiotic Use in Aquaculture; Development of Antibiotic Resistance-Potential for Consumer Health Risks. *Int. J. of Food Sci. And Techn.* 33, 139 -155.
- Anders D (1998) The Occurrence of Human Pathogenic *Vibrio* spp. and *Salmonella* in Aquaculture. *Int. J. of Food Sci. And Techn.* 33, 127-138.
- Anonymous (1992) Microbiological Examination. In: Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD (Eds), *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, 9.1-9.147, Washington DC.
- Arıkan B (1990) Hastane ve Şehir Atıksularından İzole Edilen Enterobacteriaceae Grubu Bakterilerle III Kuşak Cephalosporin Dirençliliğinin Dağılımı ve Farklı Sıcaklıklardaki Hareketli ve Durgun Besi Ortamları ile *Zoogloea ramigera*'nın Plasmid Transferine Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Ay Ö (1996) Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi Ünitelerinin ve Su Sıcaklığının Bazı Enterobacteriaceae Üyeleri arasında Konjugasyon ile R-Plasmid Transfer Düzeyine Etkisi. *Kükem* 19, 15-22.
- Bell JB, Eliot GE, Smith DW (1983) Influence Swage Treatment and Urbanization on Selection of Multiple-Resistance in Fecal Coliform Populations. *Applied Environmental Microbiology* 46, 227-232.
- Çolak Ö, Arıkan B (1990) Laktöz Pozitif Enterobacteriaceae Üyelerinin Teşhisi için Geliştirilmiş Yeni bir Selektif Agar Besiyeri. *Kükem* 13, 2, 15-21.
- Dahlberg C, Bergstorm M, Hermanson M (1998) In-situ Detection of High levels of Horizontal Plasmid Transfer in Marine Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 2670-2675.
- Garber A (1987) Interactions between Phosphate, Nitrate and Organic Substrate in Biological Nutrient Removal Processes. *Water Sci. Tech.* 19, 183-194.
- Grabow WOK, Prozesky OW, Smith LA (1975) Drug Resistant Coliforms; Call for Review of Water Quality Standards. *Water Res.* 8, 1-9.

Holmström K, Gröslund S, Whalström A, Pongshompoo S, Bengtsson BE, Kautsky N (2003) Antibiotic Use in Shrimp Farming and Implications for Environmental Impacts and Human Health. *Int. J. of Food Sci. And Techn.* 38, 255 -266.

Jacoby G, Han P, Tran J (1997) Comparative in-vitro Activities of Carbapenem L- 749, 345 and other Antimicrobials against Multiresistant Gram-negative Clinical Pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 1830-1831.

Kathe S (1976) Über die Selbstreinigung Naturlicher Gewässer. *Naturwissenschaften* 63, 286-291.

Niemi M, Sibakov M, Niemela AS (1983) Antibiotic Resistance among Different Species of Fecal Coliforms Isolated from Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 79-83.

Ohara K, Haruta S, Sawai T, Tsunoda M, Iyobe S (1998) Novel Metallo β -Lactamase Mediated by a *Shigella flexneri* Plasmid. *FEMS Microbiology Letters* 162, 201-206.

Parveen S, Murhpre RL, Edmiston L, Kapsar CW, Portier KM, Tamplin ML (1997) Association of Multiple-Antibiotic-Resistance Profiles with Point and Nonpoint Sources of *Escherichia coli* in Apalachicola Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2607-2612.

Saunders JR (1984) Genetics and Evolution of Antibiotic Resistance. *British Medical Bulletin* 40, 54-60.

Sobecky PA, Mincer TJ, Chang MC, Helinski DR (1997) Plasmids Isolated from Marine Sediment Microbial Communities Contain Replication and Incompatibility Regions Unrelated to those of Known Plasmid Groups. *Applied Environmental Microbiology* 43, 888-895.

Sokal RR, Rohlf JF (1969) *Biometry*. WH and Freeman and Company, San Fransisco.

Stewart KR, Koditschek L (1980) Drug Resistance Transfer in *Escherichia coli* in New York Bight Sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 11, 130-133.

Urban C, Rahal JJ (1997) Klebsiella and Extended Spectrum β -Lactamases. *Int. J. of Food Sci. And Techn.* 8, 37 -43.

Yagi T, Kurukawa H, Senda K, Ichiyama S, Ito H, Ohsuka S, Shibayama K, Shimokata K, Kato N, Ohta M, Arakawa Y (1997) Nosocomial Spread of Cephem-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying Multiple Toho-1-Like β -Lactamase Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2606-2611.

Zgurskaya HI, Nikaido H (2000) Multidrug Resistance Mechanisms; Drug Efflux Across Two Membranes. *Mol. Microbiol.* 37, 219-225.