

ENTEROKOK SUŞLARININ YÜKSEK DÜZEYDE AMİNOGLİKOZİDLERE VE AĞIR METALLERE KARŞI İN VİTRO DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *ENTEROCOCCUS* STRAINS TO HIGH LEVEL AMINOGLYCOSIDES AND HEAVY METALS

Yaşar NAKİPOĞLU¹, Defne GÜMÜŞ¹, Deniz SERTEL ŞELELE¹, Mine ANG KÜÇÜKER¹

¹ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. (yasarnakip@yahoo.com)

ÖZET

Hastanelerde antimikrobiyal ilaçların yoğun kullanımı ve ağır metaller ile çevresel kontaminasyon sonucunda, mikroorganizmalarda gözlenen direnç gelişimi son zamanlarda ilgi çekici boyutlara ulaşmıştır. Bu çalışmada, enterokok suşlarının yüksek düzeyde aminoglikozidlere ve bazı ağır metallere [kurşun (Pb²⁺), kadmiyum (Cd²⁺), cıva (Hg²⁺), arsenik (As⁵⁺)] karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, hastanede yatan hastaların dışkı ve rektal sürüntü örneklerinden izole edilen 20'si glikopeptidlere dirençli (11'i vankomisin ve teikoplanine, 9'u vankomisine dirençli) toplam 39 enterokok suşu dahil edilmiştir. Aminoglikozid direnci (gentamisin 120 µg ve streptomisin 300 µg) disk difüzyon yöntemiyle, ağır metallerin çeşitli konsantrasyonlarına (0.005-20 mM) karşı duyarlılık ise agar dilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. Ağır metallerle ait belirlenmiş minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) direnç sınır değerlerinin bulunmaması nedeniyle bu konuda yapılan çeşitli çalışmalardan yararlanılarak direnç kriterleri oluşturulmuş ve MİK değerleri arsenik için ≥10 mM, kadmiyum ve kurşun için ≥ 1 mM ve cıva için ≥ 0.1 mM olan suşlar dirençli kabul edilmiştir. Çalışmamızda, vankomisin (V) ve teikoplanin (T) direncine sahip 11 izolatın 10 (%91)'unda ve glikopeptidlere duyarlı 19 izolatın 8 (%42)'inde yüksek düzey aminoglikozid (YDAG) direnci saptanmıştır. İncelenen 39 enterokok suşunun tümünde (%100) kurşun direnci saptanırken, arsenik ve cıva karşı direncin sadece birer (%2.6) suшта olduğu görülmüş, kadmiyuma dirençli suş ise rastlanmamıştır. İzolatların %71.8'inde (28/39) antibiyotik (aminoglikozid ve/veya vankomisin ve/veya teikoplanin) ve ağır metal (kurşun ve arsenik ve/veya cıva) direncinin bir arada bulunduğu belirlenmiş ve suşların yedi farklı direnç profili gösterdiği saptanmıştır (10 suшта V + T + YDAG + Pb; 1 suшта V + T + Pb; 1 suшта V + As + Pb; 1 suшта YDAG + Hg + Pb; 8 suшта V + Pb; 7 suшта YDAG + Pb; 11 suшта sadece Pb direnci). Tüm izolatların kurşuna dirençli olması ve kurşun direnci açısından antibiyotiklere duyarlı ve dirençli suşlar arasında fark görülmemesi dikkat çekici bulunmuştur. Sonuç olarak; klinik enterokok suşlarındaki antibiyotik ve ağır metal direnci arasında ilişkinin ve yüksek kurşun direncinin mekanizmalarının ileri çalışmalarla ortaya konması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Enterokok, glikopeptid, aminoglikozid, ağır metal, duyarlılık.

ABSTRACT

The widespread use of antimicrobial agents in the hospitals and environmental contamination with heavy metals are increasingly related to resistance progression in microorganisms. The aim of this study was to investigate the resistance of enterococci to high level aminoglycosides and some heavy metals [lead (Pb^{+2}), cadmium (Cd^{+2}), mercury (Hg^{+2}), arsenic (As^{+5})]. A total of 39 *Enterococcus* strains, isolated from stool and rectal swabs of hospitalized patients were included to the study. Twenty of the strains were resistant to glycopeptides (11 were resistant to vancomycin + teicoplanin and 9 were resistant to only vancomycin). Disk diffusion method was performed to determine the high level resistance to aminoglycosides (gentamicin 120 µg and streptomycin 300 µg), and agar dilution method was used to detect the sensitivities of the strains against different concentrations (0.005-20 mM) of heavy metals. Since there is no specified minimum inhibitory concentration (MIC) breakpoints for heavy metals, resistance criteria described in previous studies were used. Accordingly, enterococci which exhibited MIC $\geq$ 1 mM for lead and cadmium, MIC $\geq$ 0.1 mM for mercury, and MIC $\geq$ 10 mM for arsenic were accepted as resistant. High level aminoglycoside (HLAG) resistance rates were found as 91% (10/11) for vancomycin (V) + teicoplanin (T) resistant and 42% (8/19) for glycopeptide susceptible strains. While all of the isolates were resistant to lead (100%), arsenic (2.6%) and mercury (2.6%) resistance was detected in one isolate for each metal. No cadmium resistance has been detected. In our study, enterococci have exhibited seven different resistance profiles (10 strains were resistant to V + T + HLAG + Pb; 1 was resistant to V + T + Pb; 1 was resistant to V + As + Pb; 1 was resistant to HLAG + Hg + Pb; 8 were resistant to V + Pb; 7 were resistant to HLAG + Pb; 11 were only resistant to Pb). Resistance to antibiotics (aminoglycosides and/or vancomycin and/or teicoplanin) and heavy metals (lead and arsenic and/or mercury) were detected concurrently in 28 (%71.8) of the strains. It was considered remarkable that all of the isolates were resistant to lead and there was no difference between antibiotic-resistant and-susceptible strains in terms of lead resistance. In conclusion, further investigations are needed to reveal the extreme lead resistance and the relations between antibiotic and heavy metal resistances in clinical enterococcus strains.

Key words: *Enterococcus*, glycopeptide, high level aminoglycoside, heavy metal, susceptibility.

GİRİŞ

Enterokok cinsi bakteriler artropodlar dahil tüm hayvan ve insanların normal bağırsak flora üyesidir. On dörtten fazla türü tanımlanmış olmasına rağmen enfeksiyon etkeni olarak en sık rastlanan türler *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'dur¹. Enterokokların en önemli özellikleri, geniş ısı (10-45°C), tuz (hipotonik, hipertonic) ve pH (asidik, bazik) spektrumlarında üreyebilmeleri, sodyum azide ve konsantr safra tuzlarına diğer bakterilerden farklı olarak direnç göstermeleridir². Endojen enfeksiyon etkeni olan enterokoklar, özellikle çoğul antibiyotik direnci gösteren suşların etken olduğu ve kimi zaman salgınlar şeklinde ortaya çıkan hastane enfeksiyonlarının %12'sinden sorumludur³.

Enterokoklar, düşük düzeyde penisilin, sefalosporin, linkozamid, nalidiksik asit, aminoglikozid ve klindamisine doğal direnç gösterir^{2,4}. Bazı suşlarda görülen yüksek düzeyde beta-laktam, aminoglikozid ve vankomisin direnci ise kazanılmış dirence örnekler.

Ağır metallerin bakteriler ile olan ilişkisi çok değişkendir. Kobalt, bakır, nikel ve çinko gibi ağır metaller bakterilerin yaşamı için gereklidir, ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterebilir. Buna karşın kurşun, kadmiyum, cıva, gümüş gibi ağır metallerin bakteriler için bilinen herhangi bir yararı yoktur ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkilidir. Ağır metallerin hayatımızın çeşitli alanlarına girmesinden sonra (egzoz gazları,

kirli hava, böcek ilaçları, tarım ilaçları, musluk suyu, konserve gıdalar, çeşitli dezenfektanlar, sigara dumanı vb.), çevrede ve insanda normal flora üyesi olarak bulunan bakterilerde de bu metal iyonlarına karşı bir tolerans veya dirençten söz edilmeye başlanmıştır. Ağır metallere dirençlilik özelliği de genellikle plazmid veya transpozon üzerinde kodlanmaktadır ve bakteriler arasında aktarılabilir^{5,6}.

Bu çalışmada, hastanede yatan hastaların dışkı veya rektal sürüntü örneklerinden izole edilen ve glikopeptid duyarlılıkları belirlenen enterokok suşlarında, YDAG ve ağır metal direncinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde Mayıs 2006 - Eylül 2008 tarihleri arasında yatan hastalardan alınan dışkı veya rektal sürüntü örneklerinden izole edilen ve glikopeptidlere duyarlılıkları saptanan 39 enterokok suşu alındı. Tanımlama, Gram boyanma özelliği (gram-pozitif kok), katalaz deneyi (negatif), safra eskülini hidrolize etmesi, %6.5 tuz içeren beyin kalp infüzyon agar (Oxoid, İngiltere) besiyerinde üreyebilmesi ve L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide (PYR) (BBL, BD dry slide, Becton Dickinson, ABD) pozitifliğine göre yapıldı¹ ve *Enterococcus* spp. olarak tanımlanan suşlar -20°C'de saklandı. Standart kontrol suş olarak *E.faecalis* ATCC 29212 kullanıldı.

Glikopeptid ve YDAG Direncinin Saptanması

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi "Clinical Laboratory Standard Institutes (CLSI)" önerileri doğrultusunda uygulandı⁷. Vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), YD gentamisin (120 µg) ve YD streptomisin (300 µg) diskleri (Oxoid) kullanıldı. CLSI önerileri doğrultusunda inhibisyon zon çapı vankomisin için ≤ 14 mm, teikoplanin için ≤ 10, YD gentamisin ve streptomisin için 6'şar mm olarak saptanan suşlar dirençli kabul edildi⁷.

Ağır Metal Duyarlılık Deneyleri

CLSI'nın önerdiği agar dilüsyon yöntemi modifiye edilerek uygulandı⁸. Bunun için 24 saatlik bakteri kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan ve daha sonra fizyolojik tuzlu su (%0.85 NaCl) ile 10 kat seyreltilen bakteri süspansiyonları hazırlandı. Kurşun (Pb²⁺), cıva (Hg²⁺), kadmiyum (Cd²⁺), ve arsenik (As⁵⁺) çözeltilerinin hazırlanması amacıyla sırasıyla, kurşun (II) asetat trihidrat (Merck, Almanya), cıva (II) klorid (Merck, Almanya), kadmiyum nitrat-4-hidrat (Riedel-de-Haen, Almanya) ve sodyum arsenat dibasik heptahidrat minimum %98 (Sigma, Almanya) preparatları kullanıldı. Her bir ağır metal için 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM, 0.05 mM, 0.01 mM, 0.005 mM olmak üzere seri konsantrasyonlarda ağır metal içeren Mueller Hinton agar (MHA, Merck, Almanya) besiyerleri hazırlandı. Otomatik inokülatör cihazı (Mast Diagnostic, Almanya) kullanılarak 2'şer µl bakteri süspansiyonlarından nokta ekimler gerçekleştirildi. Kontrol amacıyla ağır metal içermeyen MHA besiyerine de aynı şekilde paralel ekim yapıldı. Ekim yapılan tüm besiyerleri 35°C de 24 saat inkübe edildi. Üremenin görülmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyon

(MİK) değeri olarak belirlendi. Günümüzde ağır metallerle ait belirlenmiş MİK direnç sınırlarının bulunmaması nedeniyle bu konuda yapılan çeşitli çalışmalardan yararlanılarak direnç kriterleri oluşturuldu ve MİK değerleri arsenik için ≥ 10 mM, kadmiyum ve kurşun için ≥ 1 mM ve cıva için ≥ 0.1 mM olan suşlar dirençli olarak kabul edildi^{6,9}.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 39 enterokok suşunun 20'si glikopeptidlere dirençli (11'i vankomisin ve teikoplanine, 9'u vankomisine), 19'u ise duyarlı olarak saptanmıştır. Vankomisin ve teikoplanine dirençli 11 izolatın 10'unda ve glikopeptidlere duyarlı izolatların 8'inde YDAG direnci saptanmıştır.

Suşların tümünün (%100) kurşuna, bir suşun (%2.6) cıvaya, bir suşun (%2.6) ise arseniğe dirençli olduğu belirlenirken kadmiyum direncine rastlanmamıştır. Suşların, test edilen ağır metallerin çeşitli konsantrasyonlarına karşı duyarlılık oranları Tablo I'de; metal iyonlarının MİK dağılımı, MİK aralığı ve direnç sınır değerleri Tablo II'de verilmiştir.

Çalışılan izolatlarda yedi farklı direnç profili saptanmış ve bunların dağılımı da Tablo III'te gösterilmiştir. Çalışmamızda, suşların %71.8'inde (28/39) antibiyotik (aminoglikozid ve/veya vankomisin ve/veya teikoplanin) ve ağır metal (kurşun ve arsenik ve/veya cıva) direncinin bir arada bulunduğu belirlenmiştir (Tablo III).

E.faecalis ATCC 29212 suşu için elde edilen MİK değerleri; arsenik için 0.25, kadmiyum için 5, cıva için 0.25 ve kurşun için 10 mM olup, arsenik ve kadmiyuma duyarlı, cıva ve kurşuna dirençli olarak saptanmıştır.

Tablo I. Enterokok Suşlarının Ağır Metal İyonlarının Çeşitli Konsantrasyonlarına Karşı İn Vitro Duyarlılıkları*

Ağır metal iyonu	Konsantrasyon (mM)										
	0.005	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	20
Arsenik	0	0	0	0	0	61.5	79.5	94.9	97.4	97.4	100
Kadmiyum	0	53.8	64.1	97.4	97.4	100	100	100	100	100	100
Cıva	0	2.6	97.4	97.4	97.4	100	100	100	100	100	100
Kurşun	0	0	0	0	0	0	0	7.7	25.6	100	100

* Tabloda verilen sayılar kümülatif duyarlılık yüzdesini ifade etmektedir.

Tablo II. Metal iyonlarının MİK dağılımı, MİK aralığı ve direnç sınır değerleri*

Ağır metal iyonu	Konsantrasyon (mM)											MİK aralığı (mM)	Direnç sınırı (mM)
	0.005	0.01	0.05	0.1	0.25	0.5	1	2.5	5	10	20		
Arsenik				10	14	7	6	1		1		0.1-10	≥ 10
Kadmiyum	21	4	13		1							0.005-0.25	≥ 1
Cıva	1	37			1							0.005-0.25	≥ 0.1
Kurşun							3	7	29			1-5	≥ 1

* Tabloda verilen sayılar suş sayılarını ifade etmektedir.

Tablo III. Enterokok Suşlarının Ağır Metallere ve Antibiyotiklere Karşı Direnç Profilleri

Direnç profil tipi	Suş sayısı (%)
Vankomisin, teikoplanin, YDAD, kurşun	10 (25.6)
Vankomisin, teikoplanin, kurşun	1 (2.6)
Vankomisin, arsenik, kurşun	1 (2.6)
YDAD, cıva, kurşun	1 (2.6)
Vankomisin, kurşun	8 (20.5)
YDAD, kurşun	7 (17.9)
Kurşun	11 (28.2)
Toplam	39 (100)

YDAD: Yüksek düzeyde aminoglikozid (gentamisin ve streptomisin) direnci.

TARTIŞMA

Neden oldukları çevre kirliliğinin tüm canlılar için zararları bilinen ağır metaller, yüksek konsantrasyonlarda mikroorganizmalar için de toksik etkilidir. Ağır metallerin bu etkisi, sterilizasyon ve dezenfeksiyon amacıyla kullanılmalarının da temelini oluşturmaktadır. Ancak ağır metallerin gerek bu amaçla kullanımları ve gerekse çevrede birikimleri, bakterilerde bunlara karşı direnç gelişimine ve giderek dirençli klonların seleksiyonuna neden olmaktadır. Yapılan araştırmalarla çoğunluğu çevresel bakteriler olmak üzere birçok bakteri türünde ağır metal direncinin yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir^{6,9-15}. Bu konuda klinik örneklerden izole edilen bakteriler ile yapılan çalışmalar ise sınırlıdır^{5,11}. Antibiyotik direnç genlerinin olduğu gibi ağır metal direnç genlerinin de genellikle plazmid veya transpozonlarda ve aynı genetik elemanlarda birlikte bulunmaları nedeniyle, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler arasında antibiyotik direnciyle birlikte ağır metal direncinin de yatay geçişinin mümkün olduğu gösterilmiştir^{5,16}. Dolayısıyla, antibiyotiklere dirençli bakterilerin özellikle hastane ortamlarında seleksiyona uğramaları, ağır metallere dirençli suşların da seleksiyonla baskın hale gelmesi-ya da tersi-anlamını taşımaktadır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, hastanede yatan hastalardan kolonizasyon etkini olarak izole edilen 39 enterokok suşunun YDAG ve ağır metallere karşı in vitro duyarlılıkları araştırılmış ve ayrıca bu suşlar için glikopeptid, YDAG ve ağır metal direnci açısından olası direnç patern tipleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda 39 enterokok suşunun tamamı (%100) kurşuna dirençli (MİK: 2.5-5 mM) bulunmuş, cıva ve arseniğe dirençli suşların oranları %2.6 olarak belirlenmiş, kadmiyuma karşı ise suşların hiçbirisinde direnç saptanmamıştır. Abou-Shanab ve arkadaşları¹² gram-pozitif ve gram-negatif toplam 46 suş ile yaptıkları bir çalışmada, kurşun direncini %100 (MİK: 5-15 mM), arsenik direncini %18 (MİK: 10-20 mM), cıva direncini %29 (MİK: 0.1-0.5 mM) ve kadmiyum direncini %42 (MİK: 1-5 mM) olarak bulmuşlar ve toprakta bulunan ağır metallerin dirençli bakterilerin seleksiyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Tolun ve arkadaşları¹¹, 41 metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşunun %70.7'sinin kadmiyum, %14.6'sının arsenik ve %2.4'ünün cıvaya dirençli oldu-

ğunu saptamışlardır. Kimiran-Erdem ve arkadaşları¹⁰ da 2007 yılında yaptıkları çalışmada, deniz suyundan izole edilen 100 enterokok suşundan %87'sinde kadmiyum direnci tespit etmişler; kadmiyuma dirençli suşların nalidiksik asit, streptomisin, kanamisin ve kloramfenikol gibi antibiyotiklere de dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda kadmiyuma dirençli suşa rastlanmamış ve suşların %97'den fazlasında kadmiyum için belirlenen 1 mM direnç sınırının ancak dörtte biri (0.25 mM) gibi düşük MLK değeri saptanmıştır.

Uğur ve Ceylan'ın⁵ çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen 22 stafilokok suşunun tamamının kurşunun farklı konsantrasyonlarına (MLK: 2.5-5 mM) direnç gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, kurşun ve penisilin direnci arasında bir ilişki olduğu ve bu dirençten 2.224-20.650 kb büyüklüğündeki plazmidlerin sorumlu olduğu gösterilmiştir⁵. Calomiris ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında ise, sulardan izole edilen çoğul antibiyotik dirençli bakterilerin %24.4'ünde iki ağır metale (kurşun, bakır) ve %20.9'unda üç ağır metale (kurşun, bakır, çinko) karşı direnç saptamış, antibiyotiğe duyarlı suşların ancak %4.3'ünün bu ağır metallere karşı tolerans gösterdiği belirtilmiştir. Timoney ve arkadaşları¹⁴ cıva, kadmiyum ve ampisilin direnci arasında bir ilişki olduğunu; Novick ve Roth¹⁵ da *S.aureus* suşlarında penisilinaz enzimini kodlayan geni taşıyan plazmidin eritromisin, kadmiyum, kurşun ve cıva direncinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Davis ve arkadaşları¹⁷ ise, cıva, tetrasiklin ve streptomisine dirençli bir *E.faecium* suşundan klonladıkları cıva direncinden sorumlu geni (*mer*) taşıyan transpozonun, streptomisine direnç plazmidinin üzerinde yer aldığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda 11'i vankomisin ve teikoplanine dirençli olmak üzere toplam 28 suшта (%71.8) çoğul antibiyotik direnci ve ağır metal direncinin bir arada bulunduğu saptanmıştır. On bir suşun ise test edilen antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, sadece kurşun direnci gösterdiği belirlenmiştir (Tablo III). Ayrıca, sadece vankomisine dirençli bir ve YDAG direncine sahip bir suş olmak üzere toplam iki suşun arsenik ve cıvaya da dirençli oldukları izlenmiştir. Tüm isolatlarımızın kurşuna dirençli olması ve ayrıca antibiyotiklere duyarlı ve dirençli suşlar arasında kurşun direnci açısından bir fark görülmemiş olması dikkat çekici bulunmuştur. Enterokoklarda kazanılan direnç olarak ortaya çıkan, gerek glikopeptidlere ve gerekse YDAG'lere dirençli suşların, hastane ortamlarında bu antibiyotiklerin yoğun kullanımının neden olduğu seleksiyon sonucunda baskın hale geldikleri bilinmektedir. Ancak ağır metallere, özellikle de kurşuna karşı direncin, bu antibiyotiklerle birlikte bakteriler arasında hangi mekanizma ile yayıldığıнын aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara gerek duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Moellering RC. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species, pp: 2147-56. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000. 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 239-48.

3. Sümerkan B. Vankomisine Dirençli Enterokoklar. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon, Hastane Enfeksiyonları 2002 Kongre Kitabı. Samsun Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Araştırmaları Derneği, Simad Yayınları, Samsun.
4. Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance-an overview. Indian J Med Microbiol 2005; 23: 214-9.
5. Ugur A, Ceylan O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. Arch Med Res 2003; 34: 130-6.
6. Trajanovska S, Britz ML, Bhavne M. Detection of heavy metal ion resistance gene in gram-positive and gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site. Biodegradation 1997; 8: 113-24.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement. CLSI Document M100-S18. 2008. CLSI, Wayne, PA.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A7. 2006. 7th ed. CLSI, Wayne, PA.
9. Nieto JJ, Ventosa A, Ruiz-Berraquero F. Susceptibility of Halobacteria to heavy metals. Appl Environ Microbiol 1987; 53: 1199-202.
10. Kimiran-Erdem A, Arslan EO, Sanli Yurudu N, Zeybek Z, Dogruoz N, Cotuk A. Isolation and identification of enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. Environ Monit Assess 2007; 125: 219-28.
11. Tolun V, Törümküney D, Susever S ve ark. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının faj tipleri, siderofor sentez yetenekleri, antibiyotiklere ve ağır metallerle duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2001; 31: 143-8.
12. Abou-Shanab RA, van Berkum P, Angle JS. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. Chemosphere 2007; 68: 360-7.
13. Calomiris JJ, Armstrong JL, Seidler RJ. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol 1984; 47: 1238-42.
14. Timoney JF, Port J, Giles J, Spanier J. Heavy metal and antibiotics resistance in the bacterial flora of the sediments of New York Bight. Appl Environ Microbiol 1978; 36: 465-72.
15. Novick RP, Roth C. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1968; 95: 1335-42.
16. Silver S, Phung LT. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu Rev Microbiol 1996; 50: 753-89.
17. Davis JJ, Roberts AP, Ready D, Richards H, Wilson M, Mullany P. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. Plasmid 2005; 54: 26-38.