

CİVCİV KÖRBARSAĞINDAN İZOLE EDİLEN BAZI LAKTOBASİL SUŞLARININ ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLERİ

Aynur Gül KARAHAN¹,M. Lütfü ÇAKMAKÇI²

Özet : Bu araştırmada, civciv körbarsaklarından 40 adet laktobasil suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşlar *Lactobacillus acidophilus*, *L.agilis*, *L.animalis*, *L.brevis*, *L.coryniformis subsp. torquens*, *L.fermentum* ve *L.plantarum* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların 20 çeşit antibiyotiğe karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Suşların tamamının amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline, büyük kısmının ise penisilin, kloramfenikol, eritromisin, novobiosin, rifampisin ve tetrasikline duyarlı olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık tüm suşlarda polimiksin B'ye karşı direnç saptanırken, basitrasin, gentamisin, kanamisin, nistatin, spektinomisin ve streptomisine karşı direnç gösteren suşların oranı %75-92.5 arasında değişmektedir.

Anahtar Kelimeler : Laktobasil, körbarsak, antibiyotik duyarlılığı.

ANTIBIOTIC RESISTANCES OF SOME LACTOBACILLUS STRAINS ISOLATED FROM CHICKEN CECUM

Summary : The study focused on isolation of *Lactobacillus* strains from the chicken cecums, and determination of their ratio in cecum and of their antibiotic resistances. Mainly *Lactobacillus acidophilus*, *L.agilis*, *L.animalis*, *L.brevis*, *L.coryniformis subsp. torquens*, *L.fermentum* and *L.plantarum* were determined. Beyond that 20 different antibiotics were used to determine their effect on *Lactobacillus* strains growth. According to the antibiotic susceptibility test, all *Lactobacillus* strains were sensitive to amoxicillin, ampicillin and carbenicillin. In a contrast all strains were found to be resistant against to polymyxin B. The resistance were changed between 75-92.5% against bacitracin, gentamycin, kanamycin, nystatin, spectinomycin and streptomycin.

Key Words : Lactobacilli, cecum, antibiotic sensitivity.

Giriş

Gıda maddelerinin üretiminde starter kültür şeklinde geniş ölçüde kullanılan laktobasillerin bulunuş ortamları sadece bu ürünlerle sınırlı değildir. Laktobasil türlerinin özellikle insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerindeki doğal mikrofloranın üyelerinden oldukları bilinmektedir.

Doğal şartlarda dünyaya geliştiren hemen sonra ortamdan ve anneden kazanılan doğal floradaki ana grubu laktik asit bakterileri oluşturmaktadır. *Lactobacillus* türleri ise hayvanların çoğunda ve bebeklerde doğal floranın baskın grubudur (Savage 1977).

Sindirim sistemi ve gastrointestinal sistemdeki epitel yüzeylere tutunarak canlılıklarını sürdüren (Fuller 1973) laktobasillerin civcivlerde daha hızlı ağırlık artışı sağladıkları (Tortuero 1973) ve besin

elementlerinin absorpsiyonunu kolaylaştırdıkları saptanmıştır (Buenrostro 1983).

Ancak enfeksiyonların tedavisi amacıyla ve özellikle tavukçuluk sektöründe düşük dozlarda gelişimi teşvik edici olarak kullanılan antibiyotikler, laktobasilleri olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle antibiyotiklerin laktobasiller üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, laktobasillerin yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotiklere karşı direnç özelliklerinin bulunduğu (Swenson ve ark.1990) ve bu özelliklerin plazmidlerde kodlandığı belirlenmiştir (Vescovo ve ark.1982, Lee-Wickner ve Chassy 1985, Lin ve Savage 1985). Benzer şekilde yoğurt ve peynir starteri olarak kullanılan çeşitli laktobasil türlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve bu duyarlılığı etkileyen faktörler de araştırılmıştır (Cogan 1972, Reinbold ve Reddy 1974, Çavuş 1985, Temiz 1985, Larsen ve Anon 1989).

1. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İl Müdürlüğü - Ankara

2. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Mühendisliği Bölümü - Ankara

Bu çalışmada, omurgalıların gastrointestinal sistemlerinde önemli rol oynayan laktobasillerin model canlı olarak seçilen civcivlerin körbarsaklarından izole edilmesi, tanısı ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada kullanılan civcivler Türkiye Kalkınma Vakfı'na bağlı Köy-Tür Holding'den sağlanmıştır. Laktobasil türlerinin izolasyonu, tanısı ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Oxoid (İngiltere) marka besiyerleri ve antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Laktobasil türlerinin izolasyonu ve tanıları için 37°C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra MRS agar besiyeri üzerindeki koloni özellikleri, MRS sıvı besiyerinde üreme şekilleri, Gram reaksiyonları, katalaz aktiviteleri, morfolojik özellikleri, arjininden NH₃, glukozdan gaz oluşturma, 45°C'de üreme ve şekerleri fermente etme durumları belirlenmiştir (Cowan ve Steel 1966, Köşker 1977, Kandler ve Weiss 1986).

Antibiyotik diskleri bakteri aşılınmış MRS agar üzerine yerleştirilerek 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda Petri kutularında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür (Çetin ve Gürler 1989).

Bulgular ve Tartışma

Doğal floradaki laktobasil kompozisyonunu belirlemek amacıyla civcivlerin körbarsaklarından alınan örneklerden ekim sonucunda agarlı besiyerinde farklı koloni morfolojisine sahip izolatlar seçilmiştir. Seçilen izolatlara uygulanan ilk ayrıcı testler sonucunda 40 adedinin laktobasil olduğu belirlenmiştir. Daha sonra biyokimyasal testlerle izolatların tür düzeyinde tanısı konmuştur. Çizelge 1'de tür düzeyinde ayırım sonuçları ve türlerin populasyon içindeki yüzdeleri verilmiştir.

40 adet izolattan 17 adedinin *Lactobacillus plantarum* olduğu belirlenmiştir. *L. plantarum* izolatların %42.5'ünü oluşturarak ilk sırada yer almıştır. Bunu *L. fermentum* %22.5, *L. agilis* %12.5,

L. acidophilus %7.5'le izlemektedir. *L. animalis*, *L. brevis* ve *L. coryniformis subsp. torquens*'in ise %5 oranında buldukları saptanmıştır. Heterofermantatif türler (*L. brevis*, *L. fermentum*) %27.5 oranında bulunurken, %72.5'lik kısım homofermantatif laktobasillerden meydana gelmektedir.

Tedavi amacıyla ya da gelişimi teşvik edici olarak kümes hayvanlarına verilen antibiyotiklerin barsak florasında önemli paya sahip laktobasillere yaptığı etkinin belirlenmesi için antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Çizelge 2'de laktobasillerin antibiyotiklere duyarlılık durumları verilmiştir.

Yapılan duyarlılık testleri sonucunda körbarsaktan izole ettiğimiz laktobasillerin antibiyotiklere dirençlilik açısından önemli farklılıklar gösterdiği *L. coryniformis subsp. torquens* KY1402'nin sadece 2 antibiyotiğe dirençli, 3 antibiyotiğe orta düzeyde duyarlıyken, *L. plantarum* KY3102'nin 12 antibiyotiğe dirençli, 1 antibiyotiğe orta düzeyde duyarlı, *L. plantarum* KY3002 ve KY3202'nin 11 antibiyotiğe karşı dirençli, 2 antibiyotiğe karşı orta düzeyde duyarlı olduğu bulunmuştur. Diğer laktobasillerin 8 adedi (KY0402, KY0602, KY1502, KY2402, KY2502, KY2802, KY3302, KY3902) 10 antibiyotiğe, 6 adedi (KY0502, KY0902, KY2302, KY3402, KY3502, KY3702) 9 antibiyotiğe, 10 adedi (KY0202, KY0702, KY1202, KY1302, KY1602, KY1702, KY1802, KY1902, KY2002, KY2602) 8 antibiyotiğe, 8 adedi (KY0102, KY1002, KY2102, KY2202, KY2702, KY2902, KY3602, KY4002) 7 antibiyotiğe, 3 adedi (KY0302, KY0802, KY3802) 6 antibiyotiğe, 1 adedi (KY1102) 5 antibiyotiğe direnç göstermiştir.

Laktobasil suşları penisilin grubu antibiyotiklerden amoksisilin, ampisilin ve karbenisiline %100, penisiline %97.5, oksasiline %70, metisiline %35 oranında duyarlı bulunmuştur. Kloramfenikol %92.5, tetrasiklin %85, makrolidlerden eritromisin %85 ve rifampisin %82.5 değerleriyle laktobasillere yüksek düzeyde etkili diğer antibiyotikleri oluşturmaktadır. Ancak aminoglikozidlerle (kanamisin, gentamisin, neomisin, streptomisin) karşı suşların %50'den fazlası direnç göstermiştir. Linkomisin, nistatin, spektinomisin ve peptid grubu antibiyotiklerden basitrasine dirençli suşların oranı ise %60-90 arasında değişmektedir. Yine peptid grubu antibiyotiklerden polimiksin B ye karşı suşların %100'ü dirençli bulunmuştur. Çizelge 3'de antibiyotik duyarlılıklarına göre laktobasil suşlarının yüzdeleri verilmiştir.

Çeşitli çalışmalarda aminoglikozid ve peptid grubu antibiyotiklere karşı direnç özelliğinin, penisilin grubu antibiyotiklere, tetrasiklinlere, fenikollere, rifampisin ve novobiosine duyarlılık özelliklerinin yaygın olduğu, ancak suşlar arasında duyarlılık gözlenen antibiyotiklere direnç ya da orta düzeyde duyarlılık gösterenler olabileceği belirlenmiştir (Cogan 1972, Reinbold ve Reddy 1974, Vescovo ve ark. 1982, Çavuş 1985, Larsen ve Anon 1989, Swenson ve ark. 1990).

Çizelge 1. İzolatların türlere göre dağılımı

Tür Adı	Adet	Oran (%)
<i>L. acidophilus</i>	3	7.5
<i>L. agilis</i>	5	12.5
<i>L. animalis</i>	2	5.0
<i>L. brevis</i>	2	5.0
<i>L. corv. sub. torq.</i>	2	5.0
<i>L. fermentum</i>	9	22.5
<i>L. plantarum</i>	17	42.5
Genel Toplam	40	100.0

Çizelge 2. Laktobasillerin antibiyotik duyarlılıkları.

Tür Adı	Aml	Apl	B	C	Car	Cn	E	K	Me	My	N	Ns	Nv	Ox	P	Pb	Rd	S	Sh	Te
<i>L.acidop</i> .KY0102			**			**	*	**		**	**	**				**				
<i>L.acidop</i> .KY0202			**			**	*	**		**	**	**				**			**	
<i>L.acidop</i> .KY0302				*		**		**		**	**	**				**		*	*	
<i>L.agilis</i> KY0402			**			**		**	*	**	**	**	*			**	**	**	**	
<i>L.agilis</i> KY0502			**			**		**	**	**	*	**				**		**	**	
<i>L.agilis</i> KY0602			**			**		**	**	**	**	**				**		**	**	
<i>L.agilis</i> KY0702			**			*		**	**	**	*	**				**		**	**	
<i>L.agilis</i> KY0802			**					**	**	*	*	*				**		**	**	
<i>L.animalis</i> KY0902						**		**	**	*	**	**		**		**		**	**	
<i>L.animalis</i> KY1002			**	*		**		**		**	**	**				**			*	
<i>L.brevis</i> KY1102			**					**		*	**	**		*		**		**	**	
<i>L.brevis</i> KY1202			**			**		**	**	*	**	*	*	*		**		**	**	
<i>L.torquens</i> KY1302			**					**	**	**	*	**				**		**	**	
<i>L.torquens</i> KY1402									*						*	**		*	**	
<i>L.ferment</i> .KY1502			**			**		**	**	*	**	**	*	**		**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY1602			**			**		**	**	*	**	**		*		**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY1702			**			**		**	**	*	**	**		*		**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY1802			**			**		**	**	*	*	**		*		**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY1902			**			**		**		*	**	**	*			**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY2002			**			**		**		*	**	**		**		**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY2102			**			**		**		*	*	**	*			**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY2202			*			**		*	**	*	**	**		**		**		**	**	
<i>L.ferment</i> .KY2302			**			*		**	**	**	*	**	*			**		**	**	**
<i>L.plantar</i> .KY2402			**			**		**	**	*	**	**				**	**	**	**	
<i>L.plantar</i> .KY2502			**			**		**	*	**	**	**		*		**	**	**	**	
<i>L.plantar</i> .KY2602						**		**		**	**	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY2702			**	*		**		**		**	**	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY2802			*			**	*	**	*	**	**	**	*			**	**	**	**	**
<i>L.plantar</i> .KY2902			**			**	*	**		**	**	**	**			**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY3002						*		**	**	**	**	**	*	**		**	**	**	**	**
<i>L.plantar</i> .KY3102						**		**	**	**	**	**	*	**		**	**	**	**	**
<i>L.plantar</i> .KY3202						**		**	**	**	**	**	*	**		**	**	**	**	*
<i>L.plantar</i> .KY3302			**			**	**	**		**	**	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY3402			**			**		**	**	**	*	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY3502			*			**		**	**	**	**	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY3602			**					*	**			**				**		**	**	**
<i>L.plantar</i> .KY3702			**			*		**	**	**	**	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY3802			**			**	*	**		**	**	*				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY3902			**			**		**	**	**	**	**				**		**	**	
<i>L.plantar</i> .KY4002			**			*		**	**	*	*	**				**		**	**	

** dirençli; * orta düzeyde duyarlı; işaretli olanlar duyarlı oluşu göstermektedir.

Aml,Amoksisilin (25µg); Apl,Ampisilin (10µg); B,Basitrasin (10IU); C,Kloramfenikol (30µg); Car,Karbenisilin (100µg); Cn,Gentamisin (10µg); E,Eritromisin (15µg); K,Kanamisin (30µg); Me,Metisilin (5 µg); My,Linkomisin (2µg); N,Neomisin (30µg); Ns,Nistatin (100IU); Nv,Novobiosin (5µg); Ox,Oksasilin (5µg); P,Penisilin (10IU); Pb,Polimiksin B (300IU); Rd,Rifampin (5µg); S,Streptomisin (10µg); Sh,Spektinomisin (10µg); Te,Tetrasiklin (30µg).

Çizelge 3. Antibiyotik duyarlılıklarına göre laktobasil suşları.

Antibiyotik Adı	Dirençli		Orta Duyarlı		Duyarlı	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Amoksisilin	0	0	0	0	40	100
Ampisilin	0	0	0	0	40	100
Basitrasin	30	75	2	7.5	7	17.5
Kloramfeni.	0	0	3	7.5	37	92.5
Karbenisilin	0	0	0	0	40	100
Gentamisin	30	75	5	12.5	5	12.5
Eritromisin	1	2.5	5	12.5	34	85
Kanamisin	37	92.5	2	5	1	2.5
Linkomisin	24	60	9	22.5	7	17.5
Metisilin	23	57.5	3	7.5	14	35
Neomisin	23	57.5	15	37.5	2	5
Novobiosin	1	2.5	9	22.5	30	75
Nistatin	36	90	2	5	2	5
Oksasilin	7	17.5	5	12.5	28	70
PenisilinG	0	0	1	2.5	39	97.5
PolimiksinB	40	100	0	0	0	0
Rifampisin	7	17.5	0	0	33	82.5
Spektinom.	32	80	2	5	4	10
Streptomisin	31	77.5	2	5	7	17.5
Tetrasiklin	5	12.5	1	2.5	34	85

Ancak Vescovo ve ark. (1982)'nin yaptığı çalışmada *L.acidophilus* ve *L.reuteri* suşlarının çoğunluğunun basitrasine duyarlı, tetrasiklinlere dirençli olduğu bulunmuştur.Çavuş (1985) da farklı laktobasil türlerinin basitrasine ve tetrasikline duyarlılık gösterdiğini saptamıştır.

Denenen 20 antibiyotikten 7'sine karşı 40 laktobasil suşundan %75-100'ünün dirençli olduğu belirlenmiştir.Tedavi edici dozun altında gelişimi teşvik edici olarak ve hastalıkları tedavi etmek amacıyla antibiyotiklerin kullanılması sonucunda mikrofloranın birden çok antibiyotiğe karşı direnç kazanmasının son derece tehlikeli olduğu kabul edilmektedir(Levy 1987).

Tek bir antibiyotiğe direnç genleri küçük ve konjugatif olmayan plazmidlerde yer alırken,çeşitli antibiyotiklere dirençlilik daha büyük ve daha fazla aktarılabilen plazmidlerde bulunmaktadır.Birden fazla antibiyotiğe dirençlilik aktarılabılır genetik elementlerde bulunduğundan farklı ekolojik bölgelerde yaşayan farklı bakteriyel konakçılar arasında yayılabilmektedir.Bunlardan bazıları insanlar için patojendir ve taşıdıkları antibiyotik direnç özellikleriyle tedaviyi güçleştirerek halk sağlığını tehdit etmektedir (Levy 1987).Bu nedenle antibiyotik yerine kullanılacak yöntem veya işlemler önem kazanmaktadır.

Sonuç

Laktobasillerde plazmidlerde kodlanmış olan direnç özelliklerinin de türler arasında aktarılabildiği bilinmektedir.Bu aktarım plazmidler yoluyla olduğu

kadar transformasyonla da gerçekleşmektedir (Lin ve Savage 1986).

Denemede kullanılan 40 adet suşun 17'sini *L.plantarum* oluştururken,bu suşların antibiyotik direnç profilleri farklılık gösterdiğinden çeşitli antibiyotiklere maruz kaldıkları anlaşılmaktadır. Bu durum hastalıklar yönünden potansiyel tehlike olarak kabul edilebilir.Ayrıca literatürden farklı olarak suşların %75'inin basitrasine direnç göstermeleri yemlerde gelişmeyi düzenleyici antibiyotik kullanımının bir belirtisi olarak düşünülebilir (Doğan 1993).Bu nedenle antibiyotiklere alternatif olabilecek yolların araştırılmasının zorunlu olduğu anlaşılmaktadır. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında antibiyotiklere dirençli ve hassas *Lactobacillus* türleriyle beslenme arasındaki ilişki üzerinde durulacaktır.

Teşekkür

Çalışmamızı yakından destekleyen ve katkılarını esirgemeyen Türkiye Kalkınma Vakfı Başkanı Sayın Prof.Dr.Necmi Sönmez ile Sayın Celalettin Tümer'e teşekkürü bir borç biliriz.

Kaynaklar

- Buenrostro,J.L.,F.H.Kratzer,1983.Effect of *Lactobacillus* inoculation and antibiotic feeding of chickens on availability of dietary biotin. Poultry Sci.,62:2022-2029.
- Cogan,T.M.,1972.Susceptibility of cheese and yoghurt starter bacteria to antibiotics. Appl. Microbiol.,23(5):960-965.
- Cowan,S.T.,K.J.Steel,1966. Manual for the identification of medical bacteria. University Press,Cambridge,217s.
- Çavuş,A.,1985.Süt Ürünlerinden İzole Edilmiş Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotiklere Dirençliliklerinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi.A.Ü.Fen Bilimleri Ens.,55s.
- Çetin,E.T.,N.Gürler,1989.Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık deneyinin yapılması. Kükem Dergisi,12(2):97-105.
- Doğan,K.1993.Kümes Hayvanlarının Beslenmesi. Ank.Üni.Zir.Fak.Yayınları:1290,Ders Kitabı: 368, Ankara,355s.
- Fuller,R.,1973.Ecological studies on the *Lactobacillus* flora associated with the crop epithelium of the fowl. J.Appl.Bact., 36:131-139.
- Kandler,O.,N.Weiss,1986.*Lactobacillus*."Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.9th Ed.Volume 2,P.H.Sneath,N.S.Mair,M.Sharpe, J.G:Holt,Williams and Wilkins Publishers, Baltimore,MD."1209-1234.
- Köşker,Ö.,1977.Genel Mikrobiyoloji. Ank.Üni. Ziraat Fak.Yay.No:8, A.Ü.Basımevi, Ankara, 272s.
- Larsen,R.F.,M.C.Anon,1989.Interaction of antibiotics and water activity on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J.Food Sci., 54(4):922-939.

- Lee-Wickner,L.J.,B.M.Chassy,1985. Characterization and molecular cloning of cryptic plasmids isolated from *L.casei*. Appl. Environ.Microbiol.,49:1154-1161.
- Levy,B.S.,1987.Antibiotic use for growth promotion in animals:ecologic and public health consequences.J.Food Protec.,50(7):616-620.
- Lin,J.H.,D.C.Savage,1985.Cryptic plasmids in *Lactobacillus* strains isolated from the murine gastrointestinal tract.Appl. Environ.Microbiol.,49:1004-1006.
- Lin,J.H.,D.C.Savage,1986.Genetic transformation of rifampicin resistance in *L.acidophilus*.J.Gen.Microbiol.,132:2107-2111.
- Reinbold,G.W.,M.S.Reddy,1974. Sensitivity or resistance dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. J.Milk Food Technol.,37(10):517-521.
- Savage,D.C.,1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Ann.Rev.Microbiol., 31:107-133.
- Swenson,J.M.,R.R.Facklam,C.Thornsberry,1990.Anti-microbial susceptibility of vancomycin resistant *Leuconostoc*,*Pediococcus* and *Lactobacillus* species.Antimicrob. Agents Chemoter.,34(4):543-549.
- Temiz,A.,1985.Bazı antibiyotiklerin yoğurt bakterilerinin asit geliştirme özellikleri üzerine etkisi.Gıda,10(6):377-388.
- Tortuero,F.,1973.Influence of the implantation of *L.acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora.Poultry Sci.,52:197-203.
- Vescovo,M.,L.Morelli,V.Bottazzi,1982.Drug resistance plasmids in *L.acidophilus* and *L.reuteri*. Appl.Environ.Microbiol.,43(1):50-56.

Eserin Kabul Tarihi : 18.08.1995