

## YEŞİL SEBZELERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VE KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ENTEROBACTERALES* SUŞLARININ ARAŞTIRILMASI

Vasfi Mehmet Balki<sup>1</sup>, Nükhet Nilüfer Demirel Zorba<sup>1</sup>, Nesrin Çakıcı<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu. Çanakkale, Türkiye

Geliş/Received: 18.11.2022; Kabul /Accepted: 07.04.2023; Online baskı /Published online: 10.05.2023

Balki, V. M., Demirel Zorba, N. N., Çakıcı, N. (2023). Yeşil sebzelerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten *Enterobacteriales* suşlarının araştırılması. GIDA (2023) 48 (3) 575-586 doi: 10.15237/gida.GD22112

Balki, V. M., Demirel Zorba, N. N., Çakıcı, N. (2023). Investigation of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing *Enterobacteriales* strains in green vegetables. GIDA (2023) 48 (3) 575-586 doi: 10.15237/gida.GD22112

### ÖZ

Çanakkale semt pazarlarında satılan 96 adet yeşil sebze örneğinde beta-laktam dirençli *Enterobacteriales* suşlarının varlığı araştırılmıştır. Gövde, yaprak kısımlarından alınan örneklerden Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agara ekilmiştir. *Enterobacteriales* yükleri <1 log KOB/g ile 6.11 log KOB/g arasında tespit edilmiştir. Kromojenik GSBL Agar ve 2 mg/ml meropenem içeren EMB Agarda üreyen 129 adet izolat MALDI-TOF MS yöntemine göre *Serratia liquefaciens* (n=35), *Serratia phymuthica* (n=31), *Klebsiella oxytoca* (n=25), *Klebsiella pneumonia* (n=6), *Raoultella ornithinolytica* (n=14), *Raoultella terrigena* (n=3), *Enterobacter cloacae* (n=11), *Enterobacter ludwigii* (n=4), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Lelliottia amnigena* (n=16), *Escherichia coli* (n=2), *Escherichia hermannii* (n=1), *Leclercia adecarboxylata* (n=3), *Pantoea agglomerans* (n=3), *Kluyvera intermedia* (n=2), *Kosakonia cowanii* (n=1) ve *Hafnia alvei* (n=1) olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon yöntemine göre izolatların %11.62'sinin (n=15) Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL), %4.65'inin (n=6) karbapenemaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Yeşil sebzelerde GSBL ve karbapenem dirençli izolatların varlığı ısıtma işlemi görmeden tüketilen bu gıdalardaki halk sağlığı riskini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Enterobacteriales*, GSBL, karbapenemaz, antimikrobiyal direnç

## INVESTIGATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE AND CARBAPENEMASE PRODUCING *ENTEROBACTERIALES* STRAINS IN GREEN VEGETABLES

### ABSTRACT

The presence of beta-lactam resistant *Enterobacteriales* strains was investigated in 96 green vegetable samples sold in Çanakkale neighborhood markets. Samples taken from stem and leaf parts were inoculated in Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar. Enterobacteriales loads were determined between <1 log CFU/g and 6.11 log CFU/g. One hundred twenty-nine isolates grown on EMB Agar containing 2 mg/ml meropenem and chromogenic ESBL Agar were identified as, *Serratia liquefaciens*

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: ncakici@comu.edu.tr

☎:(+90) 286 218 0018

Vasfi Mehmet Balki; ORCID no: 0000-0002-3196-3016

Nükhet Nilüfer Demirel Zorba; ORCID no: 0000-0001-6851-6474

Nesrin Çakıcı; ORCID no: 0000-0001-8662-7215

( $n=35$ ), *Serratia plymuthica* ( $n=31$ ), *Klebsiella oxytoca* ( $n=25$ ), *Klebsiella pneumonia* ( $n=6$ ), *Raoultella ornithinolytica* ( $n=14$ ), *Raoultella terrigena* ( $n=3$ ), *Enterobacter cloacae* ( $n=11$ ), *Enterobacter ludwigii* ( $n=4$ ), *Enterobacter asburiae* ( $n=1$ ), *Lelliottia amnigena* ( $n=16$ ), *Escherichia coli* ( $n=2$ ), *Escherichia hermannii* ( $n=1$ ), *Leclercia adecarboxylata* ( $n=3$ ), *Pantoea agglomerans* ( $n=3$ ), *Kluyvera intermedia* ( $n=2$ ), *Kosakonia cowanii* ( $n=1$ ) and *Hafnia alvei* ( $n=1$ ) with MALDI-TOF MS method. According to the disk diffusion method, 11.62% ( $n=15$ ) of the isolates were found to be Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and 4.65% ( $n=6$ ) carbapenemase positive. ESBL and carbapenem-resistant isolates in green vegetables reveal the public health risk in these foods consumed without heat treatment.

**Keywords:** *Enterobacteriales*, ESBL, carbapenemase, antimicrobial resistance

## GİRİŞ

Gram negatif bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan en geniş antibiyotik grubu beta-laktamlardır. Bu antibiyotiklerin gittikçe artan kullanımı, bakterilerin direnç geliştirmesine ve bu antibiyotiklerin etkilerinin azalmasına neden olmuştur. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmasının temeli, beta-laktamaz enzimleridir (Poirel vd., 1999). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) Gram negatif bakterilerde sefalosporinlere dirençte öne çıkan bir mekanizma olmuş ve klinikte önemli bir sorun haline gelmiştir. GSBL'ler içerisinde en önemli grup CTX-M enzimleridir. Bu grubu, SHV ve TEM-türevi GSBL'ler izlemektedir. Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon ve integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilmektedir. (Canton vd., 2008). *Enterobacteriaceae* türleri arasında GSBL üretiminin hızı tüm dünyada hızla artmaktadır. GSBL direnci taşıyan türlerin başında *Klebsiella pneumonia* ve *Escherichia coli* gelmektedir.

Karbapenemler beta-laktam sınıfı içerisinde en geniş spektruma sahip, hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir (Budak vd., 2012). Karbapenemleri hidrolize eden karbapenemazlar, nerdeyse tüm beta-laktamları hidrolize edebilen en güçlü beta-laktamazlar olup bu enzimin *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri arasında dünya çapındaki artışı endişe yaratmaktadır. Karbapenemaz üretimi en sık *K. pneumoniae*'de görülmekle birlikte *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, ve diğer *Enterobacteriales* üyelerinde de saptanabilmektedir (Nordmann ve Poirel, 2002).

Taze sebzeler tarladan sofraya kadar pek çok noktada mikroorganizmalar ile temas etmektedir (Taormina ve Beuchat, 1999). Sebzelerin

kontaminasyonu yetiştirme, hasat, ayırma ve dağıtım sırasında meydana gelebilmektedir. *Enterobacteriales* türleri içerisinde insan ve hayvanların bağırsaklarında doğal konak olarak ifade edilen bazı türler de mevcuttur. Bu bakterilerin atıksu yoluyla ve fekal kontaminasyon sonucu yayılabileceğini bildirilmiştir (Bain vd., 2014). Sulama suyu taze sebzelerin bakteriyel kontaminasyonunda ana etken olarak belirlenmiştir. Taze sebzelerin içerdiği besin öğelerinden daha fazla yararlanmak için genellikle çiğ tüketilmeleri birçok mikroorganizmanın da sindirim sistemine girişine olanak sağlamaktadır (Franz vd., 2008; Van Hoek vd., 2015).

Günümüzde gıda kaynaklı mikroorganizmalar aracılığı ile antibiyotik direnç yayılımı ciddi bir halk sağlığı riski oluşturmaktadır. Yapılan çalışmaların birçoğu hayvansal gıdalardan izole edilen mikroorganizmalar ile ilgili olsa da çiğ tüketilen sebze ve meyvelerin de bu konuda risk teşkil ettiği bildirilmektedir (Ayhan vd., 2020; Kısa ve Tuncer, 2021). Antibiyotiklerin hayvanlara profilaktik, kemoteröpatik ve büyümeyi teşvik gibi amaçlar için kullanıldığı bilinmektedir (Demirer ve Özdemir 2021). Gübre olarak hayvan dışıklarının kullanılıyor olması da antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik kalıntılarının sebze ve meyvelere geçmesine neden olabilmektedir (Tien vd., 2017; Hudson vd., 2017). Özellikle taze tüketilen yeşil sebzelerde antibiyotik dirençli bakterilerin varlığı halk sağlığı açısından önem taşımaktadır (Wadamori vd., 2017; de Oliveira Elias vd; 2018; Saksena vd., 2020).

Çiğ tüketilen sebzelerde GSBL ve Karbapenem dirençli bakteri prevalansı ile ilgili çalışmalara rastlanmakla birlikte, ülkemiz verilerinin bu konuda kısıtlı kaldığı görülmektedir. Antibiyotik

dirençli bakterilerin yayılımının izlenmesine katkı sağlayacağı düşünülen bu çalışmada; Çanakkale’de tüketilen yeşil sebzelerdeki *Enterobacterales* türlerinin ve beta-laktam antibiyotiklere dirençlilik durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

### MATERYAL VE YÖNTEM

Çanakkale merkez ve bazı ilçelerinde kurulan semt pazarlarından temin edilen dereotu ( $n=10$ ), marul ( $n=10$ ), roka ( $n=15$ ), maydanoz ( $n=13$ ), yeşil soğan ( $n=8$ ), ıspanak ( $n=8$ ), brokoli ( $n=8$ ), pırasa ( $n=6$ ), nane ( $n=5$ ), semizotu ( $n=7$ ), tere ( $n=4$ ) ve kuzukulağından ( $n=2$ ) oluşan toplam 96 adet sebze örneği incelemeye alınmıştır.

### Sebzelerde *Enterobacterales* yükünün saptanması

Gövde ve yaprak kısımlarından alınan 25 gram örnek 225 mL tamponlanmış peptonlu su ile 2 dakika stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Homojenizattan Maksimum Recovery Broth (MRB) kullanılarak seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Yayma plak yöntemine göre Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Merck) besiyerlerine aktararak ekim yapılmıştır. Petriler 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 30-300 arasında üreme gösteren petriler dikkate alınarak muhtemel *Enterobacterales* türlerine ait bakterilerin sayıları saptanmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

### İzolatların tanımlaması

Yeşil sebze örneklerinden izole edilen izolatlara gram boyama, oksidaz, katalaz, IMVIC (İndol, Metil red, Voges proskauer, Sitrata), Triple Sugar Iron Agarda (TSI) karbonhidrat fermentasyonu ve H<sub>2</sub>S testleri uygulanmıştır. İzolatlar %20 lik gliserollü buyyon içerisinde -20 °C saklanmıştır. Aynı izolatlar MALDI-TOF MS (Bruker Microflex LT, Almanya) ile Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarında tanımlanmıştır. Tanımlamada Flex Control 3.0 yazılımı kullanılmıştır. Örneklerin hazırlanmasında direkt transfer metodu kullanılmıştır. 24-48 saatlik inkübasyon sonunda tek koloniden küçük bir miktar kürdan ile plakaya sürülmüş ve üzerine 1 µl matriks (50% asetonitril varlığında 12.5 mg/ml α-cyano-4-hydroxycinnamic asit ve %2.5

trifloraasetik asit karışımı) solüsyonu eklenmiştir. Sistemle çalışırken, lineer pozitif iyon modunda 2000-20.000 Da kütle aralığında, mikroorganizma tanımlama için optimize edilmiş uygun yöntem ile çift ölçümler gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağı olarak 340 nm’de 60 Hz nitrojen lazer kullanılmıştır. Spektrumları elde etmek için her örneğin ölçümünde toplamda 240 olacak şekilde 40’arlık paketten oluşan lazer darbeleri uygulanmıştır (Cheng vd. 2016., Encu vd. 2022., Fıncıoğulları vd. 2022).

### GSBL tarama testi

*Enterobacterales* izolatları ESBL kromojenik besiyerinde (Hichrome, İngiltere) ve 2mg/ml meropenem içeren Eosin Metilen Blue Agar (EMB, Merck, Almanya) besiyerine çizilerek muhtemel Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ve karbapenemaz üretici olanlar belirlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile yapılmıştır. Nutrient Agar besiyerine (Merck, Almanya) tek düşürme tekniğine göre ekim yapılan kültürler 37°C de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İzolatların disk difüzyon yöntemi ile sefotaksim (5 µg) ve seftazidim (10 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST, 2022) önerileri doğrultusunda analiz edilmiştir. İnhibisyon zon çapı sefotaksim için 21mm, seftazidim için 22 mm’den küçük olması durumunda fenotipik doğrulama testi yapılmıştır. Kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılmıştır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarından temin edilmiştir).

GSBL doğrulaması için kombine disk difüzyon testi ve çift disk sinerji testi uygulanmıştır. Sefotaksim ve seftazidim disklerinden birine veya her ikisine birden dirençli olan bakterilerin sefotaksim/klavulanik asit, seftazidim/klavulanik ve seftazidim/klavulanik asit disklerine karşı duyarlılıkları incelenmiştir (EUCAST, 2022).

### Karbapenemaz tarama testi

İzolatların disk difüzyon yöntemi ile meropenem (10 µg), ertapenem (10µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarına bakılmıştır. İnhibisyon zon çapı meropenem için 22 mm, ertapenem için 25

mm'den küçük olması dirençli olarak değerlendirilmiş ve fenotipik doğrulama testi yapılmıştır (EUCAST. 2022). Kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922 (karbapenem negatif) ve *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (Karbapenem pozitif) kullanılmıştır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı).

### Karbapenemaz doğrulama testi

Karbapenemaz (KPC) varlığının doğrulanmasında EUCAST 2022 kriterlerine göre kombine disk yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı gösteren izolatlar PBA (Sigma) ve APBA (Sigma) kullanılarak kombine diskler hazırlanmış ve KPC varlığı araştırılmıştır. Meropenem 10 µg, meropenem+APBA ve meropenem+PBA ile disk difüzyon testi yapılmıştır (Giske vd. 2011; Coudron vd., 2005). KPC pozitif kontrol suşu olarak *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, KPC negatif kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

### İstatistiksel analizler

Sebzelerde tespit edilen *Enterobacterales* yükü verilerinin tanımlayıcı istatistikleri (Minimum, Maksimum ortalama ve standart sapma değerlerinin hesaplanması), Minitab programı 2017 sürümü ile belirlenmiştir.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Yeşil sebze örneklerinden izole edilen Gram negatif basil, oksidaz negatif, katalaz pozitif izolatlar önce fenotipik testlerle ardından MALDI-TOF MS yöntemine göre tanımlanmıştır. İncelemeye alınan sebze örneklerinin *Enterobacterales* yükleri <1 log KOB/g ile 6.11 log KOB/g arasında tespit edilmiştir. En yüksek *Enterobacterales* yükünün dereotunda olduğu belirlenmiş (6.11 log KOB/g), onu roka ile maydanoz (5.98 log KOB/g) izlemiştir (Çizelge 1).

VRBG Agarda izole edildikten sonra saflaştırılan, 2mg/ml meropenem içeren EMB ve Kromojenik ESBL Agarda üreyen toplam 129 adet izolat incelemeye alınmıştır. Bu izolatlar sebze türlerine göre sırasıyla; maydanozdan 33, rokadan 32, maruldan 27, ıspanaktan 14, yeşil soğandan 8,

semiz otundan 4, brokoli ve naneden 3, pırasadan 2, tere, kuzukulağı ve dereotundan 1'er izolat olmak üzere dağılım göstermiştir. Sebzelerden izole edilen *Enterobacterales* üyesi bakterilerin dağılımı Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Elde edilen 129 izolat MALDI-TOF MS yöntemine göre; *Serratia liquefaciens* (n=35), *Serratia plymuthica* (n=31), *Klebsiella oxytoca* (n=25), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Raoultella ornithinolytica* (n=14), *Raoultella terrigena* (n=3), *Enterobacter cloacae* (n=11), *Enterobacter ludwigii* (n=4), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Lelliottia amnigena* (n=16), *Escherichia coli* (n=2), *Escherichia hermannii* (n=1), *Leclercia adecarboxylata* (n=3), *Pantoea agglomerans* (n=3), *Kluyvera intermedia* (n=2), *Kosakonia cowanii* (n=1) ve *Hafnia alvei* (n=1) olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS yöntemine göre *Enterobacterales* türlerinin dağılımı ve skor aralıkları Çizelge 3'te gösterilmiştir.

Sebzelerden izole edilen 129 izolattan 13'ünün sefotaksime, 71'inin seftazidime, 7 adet izolatın meropeneme dirençli ve 42 adet izolatın ertapeneme dirençli olduğu belirlenmiştir. Dört çeşit antibiyotige (CTX, SFZ, MRP, ERT) aynı anda direnç gösteren izolat sayısının ise 5 adet olduğu belirlenmiştir. İncelenen 55 adet izolatın hiçbir antibiyotige direnç göstermediği ve 74 adet izolatın en az bir antibiyotige direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Buna göre, elde edilen izolatlardan 15 adedi (% 11.62) GSBL pozitif bulunurken 6 adedi (% 4.65) karbapenemaz pozitif bulunmuştur. GSBL fenotipik doğrulama testleri sonuçlarına göre farklı sebzelerden elde edilen *Klebsiella oxytoca* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *Enterobacter ludwigii* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Raoultella terrigena* (n=2), *Raoultella ornithinolytica* (n=1), *Hafnia alvei* (n=1) ve *Pantoea agglomerans* (n=1) üzere toplam 15 (% 11.6) izolatın GSBL üreticisi olduğu fenotipik doğrulama testi ile doğrulanmıştır. Sebzelerden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacterales* türleri Çizelge 4'te verilmiştir. Karbapenemaz doğrulama testi sonuçlarına göre 2 adet *Enterobacter* spp., 1 adet *Klebsiella* spp. ile 1 adet *Pantoea* spp.'nin MBL+KPC üreticisi, 2 adet *Enterobacter* spp.'nin KPC üreticisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 1. Sebze örneklerinin *Enterobacteriales* yükleri.  
 Table 1. *Enterobacteriales* counts of the vegetable samples.

Sebze örnekleri (n) <i>Vegetable samples (n)</i>	<i>Enterobacteriales</i> yükü log kob/g <i>Number of Enterobacteriales</i> log kob/g		
	Minimum <i>Minimum</i>	Ortalama ± standart sapma <i>Mean ± standard</i> <i>deviation</i>	Maksimum <i>Maximum</i>
Dereotu <i>Dill (10)</i>	<1	2.84±2.60	6.11
Marul <i>Lettuce (10)</i>	<1	3.90± 2,19	5.93
Roka <i>Rocket (15)</i>	<1	4.71±1.40	5.98
Maydanoz <i>Parsley (13)</i>	2.78	4.85±0.99	5.98
Yeşil soğan <i>Scallion (8)</i>	<1	3.97±2.47	5.82
Ispanak <i>Spinach (8)</i>	4.59	5.06±0.33	5.43
Brokoli <i>Broccoli (8)</i>	<1	0.50±1.40	3.94
Pırasa <i>Leek (6)</i>	<1	3.16±2.46	5.08
Nane <i>Mint (5)</i>	<1	1.97±2.70	5.04
Semizotu <i>Purslane (7)</i>	<1	2.30±2.30	5.18
Tere <i>Cress (4)</i>	<1	1.79±2.07	3.66
Kuzukulağı <i>Sorrel (2)</i>	3.32	3.95±0.89	4.58

Çizelge 2. Sebze türlerine göre *Enterobacteriales* üyesi bakterilerin dağılımı.  
Table 2. *Distribution of Enterobacteriales member bacteria by vegetable species*

Sebzeler <i>Vegetable (n)</i>	<i>Serratia</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Raoultella</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Lelliottia</i> spp.	<i>Escherichia</i> spp.	<i>Leclergia</i> spp.	<i>Pantaoea</i> spp.	<i>Klugera</i> spp.	<i>Hafnia</i> spp.	<i>Kosakonia</i> spp.	İzolasyon sayısı (n) <i>Number of isolates(n)</i>
Maydonoz <i>Parsley</i> (13)	14	4	6	-	3	2	-	2	2	-	-	33
Roka <i>Rocket</i> (15)	8	11	6	3	1	1	-	-	-	1	1	32
Marul <i>Lettuce</i> (10)	10	3	-	3	11	-	-	-	-	-	-	27
Ispanak <i>Spinach</i> (8)	-	4	2	4	-	-	3	1	-	-	-	14
Yeşil soğan <i>Scallion</i> (8)	-	4	2	2	-	-	-	-	-	-	-	8
Semizotu <i>Purslane</i> (7)	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
Brokoli <i>Broccoli</i> (8)	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Nane <i>Mint</i> (5)	-	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3
Pırasa <i>Leek</i> (6)	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Tere <i>Cress</i> (4)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Kuzukulağı <i>Sorrel</i> (2)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Dereotu <i>Dill</i> (10)	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Toplam <i>Total</i> (96)	36	31	17	16	16	3	3	3	2	1	1	129

Çizelge 3. *Enterobacterales* türlerinin MALDI -TOF skor aralıkları.  
Table 3. MALDI-TOF score ranges of *Enterobacterales* species

Bakteri <i>Bacterium</i>	İzolat sayısı (n) Number of isolates(n)	Skor Değeri (Min- Maks) Score Value (Min-Max)
<i>Serratia liquefaciens</i>	35	1.692 - 2.369
<i>Serratia phymuthica</i>	1	2.16
<i>Klebsiella oxytoca</i>	25	1.552 - 2.325
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	1.702 - 2.265
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	14	1.778 - 2.364
<i>Raoultella terrigena</i>	3	1.853 - 2.111
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	1.678 - 2.287
<i>Enterobacter ludwigii</i>	4	1.784 - 2.205
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	2
<i>Lelliottia amnigena</i>	16	1.99 - 2.478
<i>Escherichia coli</i>	2	2.247 - 2.327
<i>Escherichia hermannii</i>	1	2.067
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3	2.076 - 2.407
<i>Pantoea agglomerans</i>	3	1.935 - 2.123
<i>Kluyvera intermedia</i>	2	2.122 - 2.282
<i>Hafnia alvei</i>	1	1.648
<i>Kosakonia cowanii</i>	1	1.804
Toplam	129	1.552 -2.478
Total		

Çizelge 4. Sebzelerden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacterales* türleri.  
Table 4. ESBL positive *Enterobacterales* strains isolated from vegetables

Sebze <i>Vegetable</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n/%)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n/%)	<i>Enterobacter ludwigii</i> (n/%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n/%)	<i>Raoultella terrigena</i> (n/%)	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (n/%)	<i>Hafnia alvei</i> (n/%)	<i>Pantoea agglomerans</i> (n/%)	GSBL (+) (n/%)
Marul <i>Lettuce</i>	1 (6.6)	-	-	-	-	-	-	-	1 (6.6)
Roka <i>Rocket</i>	-	3 (20)	2 (13.3)	-	2 (13.3)	-	1 (6.6)	-	8(53.3)
Maydanoz <i>Parsley</i>	-	-	-	-	-	1 (6.6)	-	1 (6.6)	2 (13.3)
Ispanak <i>Spinach</i>	1 (6.6)	-	-	1 (6.6)	-	-	-	-	2 (13.3)
Nane <i>Mint</i>	-	2 (13.3)	-	-	-	-	-	-	2 (13.3)
Toplam	2(13.3)	5(33.3)	2 (13.3)	1 (6.6)	2(13.3)	1 (6.6)	1 (6.6)	1 (6.6)	15(100)
Total									

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

ESBL: Extended Spectrum Beta-Lactamase

Çizelge 5. Sebzelerden izole edilen karbapenemaz pozitif *Enterobacterales* türleri.Table 5. Carbapenemase positive *Enterobacterales* strains isolated from vegetables.

Sebze <i>Vegetable</i>	Bakteri <i>Bacterium</i>	Metallo Beta-Laktamaz <i>Metallo Beta-Lactamase</i>	Karbapenemaz <i>Carbapenemase</i>
Marul <i>Lettuce</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
Roka <i>Rocket</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+
Maydonoz <i>Parsley</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	+	+
Yeşil soğan <i>Scallion</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>	+	+
Ispanak <i>Spinach</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+
Semizotu <i>Purslane</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+

Tarımda kullanılan hayvan gübreleri gıda kaynaklı patojenler için önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar bağırsak kaynaklı insan ve hayvan patojenlerinin gübrede ve gübre ile karıştırılmış toprakta uzun süre canlı kalabildiğini göstermektedir (Jiang ve Shepherd, 2009; Szczech vd., 2018). Sebzeler sulama suyuna karışan gübre, kanalizasyon vb. kirlilik kaynaklarıyla doğrudan temas yolu ile kontamine olabilmektedir. İspanya’da, sebzelerde *Enterobacterales* taraması yapılan bir çalışmada *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *S. rubidaea*, *E. cloacae*, *Kluyvera ascorbata*, *E. aerogenes*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*, ve *A. baumannii* suşlarına rastlanmıştır (Rico ve vd., 2013). Kuzey Afrika’da yapılan bir çalışmada 97 adet meyve ve sebze örneğinden 108 adet gram negatif bakteri izole edilmiştir. Bu izolatlar MALDI-TOF MS ile tanımlandığında 44’ünün (%40.74) *Enterobacteriaceae* familyasına ait olduğu tespit edilmiştir (Mesbah Zekar vd., 2017).

Usui vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 130 sebzededen 681 bakteri izole edilmiştir. Baskın tür olarak 587 adet (%86) *Pseudomonas* spp. tanımlanmıştır. Geriye kalan türlerin ise *Acinetobacter* ( $n=14$ ) *Rahnella* ( $n=11$ ), *Enterobacter* ( $n=4$ ), *Stenotrophomonas* ( $n=4$ ), *Ochrobactrum* ( $n=2$ ), *Pantoea* ( $n=1$ ) ile *Serratia* ( $n=1$ ) cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise en fazla rastlanan bakteri *Serratia*

spp. ( $n=36$ ) ardından *Klebsiella* spp. ( $n=31$ ) olmuştur.

Nousiainen vd., (2016) tarafından satılan taze yapraklı sebzelerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada, marul ve ıspanaktan alınan toplam 100 örnekte toplam canlı sayısının ortalama 8.6 log KOB/g, koliform bakteri sayısının ise 6.3 log KOB/g olduğu belirlenmiş, örneklerin %15’inde *E. coli* tespit edilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada marul ve ıspanaktan almış olduğumuz toplam 18 örnekte toplam *Enterobacterales* yükü ortalama olarak marulda  $3.90 \pm 2.19$  log KOB/g ve ıspanakta  $5.06 \pm 0.32$  log KOB/g olarak belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler tebliğinde hazır salatalar için verilen kriterlerde indikatör mikroorganizmalar için bir kriter bulunmazken, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 bulunmaması istenmiştir (Anonim, 2011). Elde edilen izolatlar arasında *Salmonella* spp. bulunmamasına karşın *Escherichia* spp.’nin % 2.23 oranında saptanmış olması bu örneklerin risk taşıdığına bir göstergesi kabul edilebilir.

GSBL üreten *Enterobacterales* ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda, bu bakterilerin sadece hastane ortamından izole edilmediği sebzelerde, çiftlik hayvanlarında ve bunlardan üretilen gıdalarda çıkabileceği tespit edilmiştir (Ben Sallem vd., 2012; Poeta vd., 2009). Sebzelerde antibiyotik dirençli *Enterobacteriaceae* bakterilerinin araştırılması üzerine İngiltere’de yapılan bir



çalışmada; havuçlar ile çiğ salata sebzelerinden alınan toplam 73 örnekten izole edilen bakterilerin %37.5'inin Enterobacteriaceae familyasına ait olduğu tespit edilmiştir. Suşların %70'inden fazlası ampisilin yanısıra birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere, suşların %33'ünün ise ko-amoksilav, sefotaksim veya trimetoprim'e dirençli olduğu tespit edilmiştir (Hamilton-Miller ve Shah, 2001). Tunus'taki pazarlardan toplanan maydanoz ve domateslerle ilgili yapılan bir çalışmada da GSBL pozitif *E. coli* suşları saptanmıştır (Said vd., 2015). Bizim çalışmamızda elde edilen 2 adet *E. coli* ve 1 adet *E. hermanningii* izolatu ise GSBL negatif olarak tespit edilmiştir

Romanya'da perakende olarak satılan taze ürünlerde  $\beta$ -laktamaz üreten *Enterobacteriales* varlığı araştırılmıştır. Sebzelerden elde edilen izolatların %7.9'u GSBL, %5.5'i GSBL/AmpC ve %2.4'ü Karbapenemaz üreticisi olduğu bildirilmiştir (Colosi vd. 2020). Cezayir'in Batna kentindeki taze sebzelerde GSBL, karbapenem ve kolistin dirençli Gram negatif bakterileri taramak amacıyla 400 taze sebze örneğinden 67 izolat incelenmiştir. MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanan türlerden *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. maltophilia*, *E. coli* ve *C. braakii* baskın türler arasında yer almıştır. İzolatlardan 27'sinin GSBL geni, 5'inin karbapenemaz geni taşıdığı tespit edilmiştir (Chelaghma vd. 2022). Çiğ sebzedeki GSBL prevalansının incelendiği başka bir çalışmada, pazardan toplanan 305 örneğin 14'ünde (%4.6) GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izole edilmiştir. Çiğ sebzelerin, çiğ sebze alımı yoluyla insanlara potansiyel olarak bulaşabilen GSBL'ye dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin önemli bir kaynağı olduğu gösterilmiştir (Romyasamit vd. 2021).

Tarım ortamının, taze sebzelerde GSBL üreten Enterobacteriaceae kaynağı olup olmadığını belirlemek için yapılan çalışmada, pişmemiş taze ürünlerin tüketimi yoluyla GSBL ve AmpC üreten bakterilerin yayılması halk sağlığı açısından risk oluşturduğu saptanmıştır (Blaak vd, 2014). Güney Afrika'da yapılan çalışmada, sulama suyundaki ve sebzelerdeki *E. coli* suşlarında GSBL, AmpC varlığı ve genetik benzerlik filogenetik olarak araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen izolatların

%76'sının GSBL ya da AmpC üreticisi olduğu, bunlardan 14'ünün hem GSBL hem de AmpC üreticisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sulama suyundan ve maruldan izole edilen *E. coli*'lerin yüksek genetik benzerlik içerdiği, marula geçen GSBL pozitif *E. coli* suşlarının sulama suyu kaynaklı olabileceği ifade edilmiştir (Njage ve Buys, 2015).

Sonuç olarak; yeşil yapraklı sebzeler lağım sularının sulama suyuna karışması, hayvan barınaklarına yakın bölgelerde yapılan üretim, insan ve hayvanlar tarafından oluşan fekal bulaşlar gibi kontaminasyon kaynaklarına maruz kalabilmektedir. Gıda çalışanları aracılığıyla çapraz kontaminasyon ve kontamine gıdaların tüketilmesi yoluyla patojen bakteriler toplumda yayılabilir. Özellikle antibiyotik direnç mekanizmalarına sahip olan suşların yayılması toplum sağlığı açısından çok önemlidir. Yeşil sebzelerde rastalanan GSBL ve karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriales* türlerinin varlığı antimikrobiyal direnç sorunu konusunda gerekli tedbirlerin alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2019-2808.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

### YAZAR KATKILARI

Makale, Vasfi Mehmet Balki'nin Nükhet Nilüfer Demirel Zorba ve Nesrin Çakıcı danışmanlığında yürüttüğü yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir. Çalışma Nükhet Nilüfer Demirel Zorba ve Nesrin Çakıcı tarafından planlanmış, Vasfi Mehmet Balki laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirmiş, antibiyotik direncin doğrulanması ve makale taslağının oluşturulması kısmında her üç yazarda katkı vermiştir. Yazarlar makalenin son halini okuyarak onaylamışlardır.

## KAYNAKLAR

Anonymous (2011). Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete, Ankara.

Ayhan, Ş., Kahve, H. İ., Aydın, F., Ardiç, M. (2020). Antibiotic resistance and hemolytic activity in enterococci isolated from tulum cheese sold in Aksaray province. *GIDA*, 45(4): 689-698. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20068>

Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Hunter, P., Prüss-Ustün, A., and Bartram, J. (2014). Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, 19: (8), 917-927. <https://doi.org/10.1111/tmi.12334>

Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Saenz, Y., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Jouini, A., ... & Torres, C. (2012). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(12), 1137-1142. 4. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1267>

Blaak, H., van Hoek, A. H., Veenman, C., van Leeuwen, A. E. D., Lynch, G., van Overbeek, W. M., & de Roda Husman, A. M. (2014). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase-and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*, 168, 8-16. 4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006>

Budak, S., Aktaş, Z., & Erdem, H. (2012). Enterik Gram-negatif bakterilerde laboratuvarından kliniğe karbapenemazlar. *Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials*, 1,1-11.

Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machoda, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, TM. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing Enterobacteria In Europe. *Clin Microbiol Infect*, 14 (Suppl1), 144-153. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850>.

Chelaghma, W., Loucif, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., Rolain, J.M. (2022). Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria. *Antibiotics*. 11, 988. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080988>

Cheng, K, Chui, H., Domish, L., Hernandez, D., Wang, G. (2016). Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics Clin App*, 10(4), 346-357. <https://doi.org/10.1002/prca.201500086>

Colosi, I.A., Baciu, A.M., Opris, R.V., Peca, L., Gudat, T., Simon, L.M., Colosi, H.A., Costache, C. (2020). Prevalence of ESBL, AmpC and carbapenemase-producing *Enterobacteriales* isolated from raw vegetables retailed in Romania. *Foods*. 9, 1726. <https://doi.org/10.3390/foods9121726>

Coudron, P. E. (2005). Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: (8), 4163-4167. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4163-4167.2005>

De Oliveira Elias, S., Tombini Decol, L., and Tondo, E. C. (2018). Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. *Food Quality and Safety*, 2 (4), 173-181. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy022>

Demirer, B. ve Özdemir M. (2021). Gıdalardaki Antibiyotik Kalıntıları. *Academic Platform Journal of Halal Lifestyle*, 3:(1), 17-25.

Encu, Ş. B., Soykut, E. A., Çakır, İ. (2022). Geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin maldi tof ms biotyper sistemi ile tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda*, 47 (6), 1059-1082. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22088>

EUCAST. 2022. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf)

- Fıncıoğulları, B., Öner, Z. (2022). Kolesterol düşürücü etkilere sahip lactobacillus spp. suşlarının peynirde başlatıcı kültür olarak kullanımı. *GIDA*, 47(2), 266-276. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21141>
- Franz, E., Semenov, A. V., & van Bruggen, A. H. C. (2008). Modelling the contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157: H7 from manure-amended soil and the effect of intervention strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (5), 1569-1584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03915.x>
- Giske, C. G., Gezelius, L., Samuelsen, Ø., Warner, M., Sundsfjord, A., & Woodford, N. (2011). A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical microbiology and infection*, 17(4), 552-556. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x>
- Gupta, G., Tak, V., Mathur, P. (2014). Detection of AmpC  $\beta$  lactamases in gram-negative bacteria. *Journal of Laboratory Physicians*, 6: 1-6. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.129082>
- Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. (2001). Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(1), 81-83. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00353-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00353-3)
- Hudson, J. A., Frewer, L. J., Jones, G., Brereton, P. A., Whittingham, M. J., Stewart, G. (2017). The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.007>
- Jiang, X., Shepherd, M. (2009). The role of manure and compost in produce safety. X. Fan, B.A. Niemira, C.J. Doona, F.E. Feeherry, R.B. Gravani (Eds.), *Microbial Safety of Fresh Produce*, Wiley-Blackwell Publisher, pp. 143-166.
- Kısa, Ç., Tuncer, Y. (2021). Kanatlı etlerinde staphylococcus aureus yaygınlığı ve antibiyotik direnç profillerinin, antibiyotik direnç ve enterotoksin genlerinin belirlenmesi. *GIDA*, 46(3), 692-706. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21048>
- Mesbah Zekar, F., Granier, S. A., Marault, M., Yaici, L., Gassilloud, B., Manceau, C., Touati, A., and Millemann, Y. (2017). From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of north africa. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1569. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01569>
- Njage, P. M., Buys, E. M. (2015). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 462-473. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12234>
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poriel L, Woodford N, Miriagou V. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection* 18(5): 432-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x>
- Nordmann, P., Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(6), 321-331. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x>
- Nousiainen, L. L., Joutsen, S., Lunden, J., Hänninen, M. L., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2016). Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.020>
- Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Gonçalves, A., Rodrigues, J., Estepa, V., Torres, C., and Igrejas, G. (2009). Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of Basic Microbiology*, 49(6); 584-588. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900066>
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R., & Nordmann, P. (1999). Molecular and

- biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:(3), 573-581. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.3.573>
- Rico, H., Gozalbo, D., Sebastia, C., & Falomir, M.P. (2013). Enterobacter cloacae in fresh vegetables: A potential carrier of antibiotic resistances to consumers. *Food Studies: An Interdiscipl J*, 2, 1–7.
- Romyasamit C, Sornsenee P, Chimplee S, Yuwalaksanakun S, Wongprot D, Saengsuwan P. 2021. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from raw vegetables retailed in Southern Thailand. *PeerJ* 9:e11787 <https://doi.org/10.7717/peerj.11787>
- Said, L. B., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>
- Saksena, R., Malik, M., Gaiind, R. (2020). Bacterial contamination and prevalence of antimicrobial resistance phenotypes in raw fruits and vegetables sold in Delhi, India. *Journal of Food Safety*, 40, (1), e12739. <https://doi.org/10.1111/jfs.12739>
- Szczech, M., Kowalska, B., Smolinska, U., Maciorowski, R., Oskiera, M., Michalska, A. (2018). Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018>
- Taormina, P. J., Beuchat, L. R. (1999). Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa seeds. *Journal of food protection*, 62 (4), 318-324. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.4.318>
- Tien, Y. C., Li, B., Zhang, T., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Topp, E. (2017). Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment*, 581, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>
- Usui, M., Ozeki, K., Komatsu, T., Fukuda, A., and Tamura, Y. (2019). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria on fresh vegetables in Japan. *Journal of Food Protection*, 82, (10), 1663-1666. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-138>
- Ünlütürk A., Turantaş F. (2015). *Gıda Mikrobiyolojisi*, Meta Basım, İzmir, s:16.
- Van Hoek, A. H., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL-and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014>
- Wadamori, Y., Gooneratne, R., Hussain, M. A. (2017). Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (5), 1396-1403. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8125>