

Özgün Araştırma/Original Article

Doğal yoğurtlardan izole edilmiş *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının antibiyotik direnç özelliklerinin moleküler olarak belirlenmesi

Molecular determination of antibiotic resistance properties of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated natural yogurts

Filiz Doğan¹, Yekta Gezginç^{1*}, Şerife Nur Akyar Yavaş¹

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, KAHRAMANMARAŞ, TÜRKİYE
(Yazar sıralamasına göre)

ORCID ID: 0000-0002-7902-2274, Yük. Müh.

ORCID ID: 0000-0002-3230-2850, Doç. Dr.

ORCID ID: 0000-0001-7869-491X, Doktora Öğrencisi

*Sorumlu yazar/Corresponding author: yekgan@ksu.edu.tr

Geliş Tarihi : 03.06.2022

Kabul Tarihi : 20.07.2022

Öz

Amaç: Bu çalışmada, doğal yoğurtlardan izole edilmiş *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve yöntem: Çalışmada doğal yoğurtlardan izole edilen ve tanımlamaları yapılan Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı stoklarında muhafaza edilen *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının antibiyotik dirençlilikleri fenotipik (disk difüzyon) ve genotipik (PCR ile) olarak belirlenmiştir.

Tartışma ve sonuç: *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* izolatlarında en yüksek direnç kanamisin (%51) antibiyotiğine karşı bulunmuştur. Bunu streptomisin (%11), kloramfenikol (%10) ve vankomisin (%8) antibiyotikleri izlemektedir. Antibiyotik direnç genlerini incelemek için yapılan PCR uygulamaları sonucunda, *aph(3')-IIIa* (%95), *str(B)* (%36), *blaZ* (%100) ve *van(E)* (%67) genleri bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi ile kanamisine direnç gösterdiği tespit edilen suşların %60'unda *aph(3')-IIIa* bölgesi, streptomisine direnç gösterdiği tespit edilen suşların %36'sında *str(B)* bölgesi, vankomisine direnç gösterdiği tespit edilen suşların %44'ünde *van(E)* bölgesi, penisiline direnç gösterdiği tespit edilen suşların tamamında *BlaZ* bölgesi saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunan izolatların %51'inde direnç genleri tespit edilmiştir. Bu çalışma ile gıda kaynaklı bazı bakterilerin antibiyotik direnç genleri için rezervuar olabileceği sonucuna varılabilir.

Anahtar kelimeler: antibiyotik dirençlilik; disk difüzyon; laktik asit bakterisi; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*; genotipik tanımlama

Abstract

Objective: In this study, the detection of phenotypic and genotypic antibiotic resistance for *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from natural yogurts was aimed.

Materials and method: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains were isolated from natural yogurt and kept in the Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Faculty of Engineering and Architecture, Food Engineering Department, Biotechnology laboratory stocks of which characterizations were determined phenotypically (with disc diffusion) and genotypically (with PCR).

Discussion and conclusion: *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolates were found to have the highest resistance against kanamycin (51%), followed by streptomycin (11%),

chloramphenicol (10%) and vancomycin (8%). As the result of PCR applications to examine antibiotic resistance genes, *aph(3')-IIIa* (95%), *str (B)* (36%), *blaZ* (100%) and *van (E)* (67%) genes were found. Utilizing the disc diffusion method, the *aph(3')-IIIa* region was found in 60% of kanamycin-resistant strains, the *str(B)* region was found in 36% of streptomycin-resistant strains, the *van(E)* region was found in 44% of vancomycin-resistant strains, and the *BlaZ* region was found in all penicillin-resistant strains. Resistance genes were detected in 51% of the isolates examined to be resistant by disc diffusion. With this study, it can be concluded that some foodborne bacteria may be reservoirs for antibiotic resistance genes.

Keywords: antibiotic resistance; disc diffusion; lactic acid bacteria; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; *Streptococcus thermophilus*; genotypic identification

1. Giriş

Antibiyotik direnç, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal bir ajanın yok edici veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanabilir (Durupınar, 2001). Bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanması hayvansal ve tarımsal süreçlerde antibiyotik kullanımı açısından hem gıda hem de klinik mikrobiyolojide dikkate alınmaktadır (Terkuran vd., 2019). Bakteriler, yapısal veya işlevsel özelliklere sahip olması sonucu antibiyotiklere doğal olarak dirençli olabilmemesinin yanı sıra kromozomal genlerin mutasyonu veya ekzojen DNA edinimi yoluyla da antibiyotik direnç geliştirebilmektedir (Nawaz vd., 2011). Yapısal direnç ve kromozomal mutasyona bağlı direnç, yatay yayılma için düşük bir potansiyel gösterirken, hareketli genetik elemanların (örneğin plazmitler veya transpozonlar) edinilmesinden kaynaklanan direncin yayılması çok daha kolay olabilmektedir (Manaia, 2017). Antibiyotik direncine ilişkin önceki epidemiyolojik çalışmalar, temelde klinik olarak ilgili patojenik bakterilere odaklanmışken (Mathur ve Singh 2005), son çalışmalarda, iyi bir probiyotik olarak bilinen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi patojenik olmayan bakterilerin de antibiyotik dirence sahip olabileceği ve antibiyotik direnç genlerinin insan patojenleriyle birlikte diğer mikroorganizmalara yayılmasına neden olabileceğini göstermektedir (Sharma vd., 2014; Çelik vd., 2016; Fatahi-Bafghi vd., 2021). Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda gıda ürünleri, patojenik olmayan bakterilerden tüketicilere antibiyotik direncinin bulaşmasına yol açan kritik bir yayılma etkeni olarak hizmet edebilmektedir. Özellikle, fermente gıdalar, çok sayıda patojenik olmayan antibiyotik dirençli bakteriyi yapılarında barındırarak, antibiyotik direncinin bir rezervuarı olarak hizmet edebilmektedir (Hereros vd., 2005; Ammor vd., 2007; Gazzola vd., 2012; Morandi vd., 2015; Wang vd., 2019; Zarzecka vd., 2022).

Bakteriyel antibiyotik direncinin küresel olarak yayılması, yüksek tıbbi maliyet, hastaneye yatış

vakalarının artması ve ölüm oranlarının artmasıyla tüm dünyada büyük bir sorun haline gelmiştir. Antibiyotiğe dirençli bakterilerle enfekte olan ve bunun sonucunda ölen kişilerin sayıları her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle, tarımsal gıda gibi çeşitli sektörlerde yayılmayı kontrol etmek ve antibiyotiğe dirençli bakterilerin riskini azaltmak için direnç profillerinin araştırılması acil ve zorunlu bir ihtiyaçtır (Chai vd., 2014; Tavşanlı vd., 2021).

Günümüzde gıda güvenliğinin uluslararası alanda önem kazanmasıyla birlikte, mikrobiyal bozulmalara karşı ekonomik kayıpların önlenmesi, gıda kaynaklı hastalıkların azaltılması ve hızla artan dünya nüfusunun gıda ihtiyaçlarının karşılanması için; en uygun doğal gıda koruyucularının belirlenmesi ve sektörde yer edinmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (Ross vd., 2002; Soomro vd., 2002; Galvez vd., 2008). Bu bağlamda laktik asit bakterileri (LAB), gıdaların muhafazasında önemli bir alternatif olmuş ve gıda katkıları konusunda tüketicilerin endişelerini azaltmış olup, ilgilerini kimyasal koruyucu eklenmeden üretilen doğal ve geleneksel gıdalara yönlendirmiştir (Settanni ve Corsetti, 2008; Yerlikaya vd., 2020).

Birçok LAB ve propiyonik asit bakterileri (PAB), genel olarak güvenilir kabul edilen (GRAS) statüde bulunmasına ve Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) tarafından güvenli mikroorganizmalar arasında listelenmesine (Bourdichon vd., 2012) rağmen; mikrobiyal genom dizilim çalışmaları, birçok antibiyotik direnç geninin, çeşitli LAB'ların kromozomlarına entegre olduklarını ortaya koymuştur (Makarova vd., 2006; Ammor vd., 2008; Sharma vd., 2014; Campdelli vd., 2019; Fatahi-Bafghi vd., 2021).

Günümüzde bakterilerin antibiyotik duyarlılık ve dirençliliğini belirlemeye yönelik birçok analiz yöntemi uygulanmakta olup, her yöntem kendine özgü bir değerlendirme sistemi bulunmaktadır (Jorgensen vd., 2003; Richter ve Ferrano, 2007). Disk difüzyon yöntemi, temelde $1-2 \times 10^8$ kob/g düzeyinde standardizasyonu yapılmış bakteri

süspansiyonunun hazırlanan besiyerine inokülasyonunun yapılması ve belirli konsantrasyonlarda antibiyotik türevi içeren disklerin belirli prosedürler çerçevesinde inkübasyonun gerçekleştirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi temeline dayanmaktadır (Anonim 2009; Jorgensen ve Turnidge, 2015).

Genotipik ve moleküler yöntemler, antibiyotik dirençlilik konusunda bakterinin sahip olduğu DNA, RNA gibi genetik materyallerde var olan türe özgü direnç genlerinin veya gen bölgelerinin tespit edilmesi prensibine dayanmaktadır (Fluit ve Schmitz, 2001; Ledeböer ve Hodinka, 2011).

Bu çalışma ile doğal yoğurtlardan elde edilmiş olan *S. thermophilus* (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) ve *Lb. bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) bakterilerinin antibiyotik dirençlilik profilinin disk difüzyon yöntemi ve moleküler olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, toplum sağlığı açısından tehdit oluşturabilen ve ekonomik açıdan kayıplara yol açabilen antibiyotik direnci bulunan başlangıç kültürlerinin tespit edilerek, dirençli kültürlerin başlangıç kültürü olarak kullanımının önlenmesi hedeflenmiştir.

2. Materyal ve metot

2.1. Bakteriye suşlar ve gelişme şartları

Bu çalışmada doğal yoğurtlardan izole edilerek genetik tanımlaması yapılan, starter kültür olma potansiyeli taşıyan 68 adet *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, 5 adet *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* olmak üzere toplamda 73 LAB izolatu Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarında mevcut stok kültürlerden temin edilmiştir. Örnekler -80 °C'de %30'luk gliserol çözeltilisinde saf kültür olarak saklanmıştır.

LAB' ları canlandırma ve antibiyotik dirençliliklerini belirleme amacıyla *Lb. bulgaricus* için MRS Broth, MRS agar ve *S. thermophilus* için SM17 Broth, SM17 Agar (Merck, Germany) besiyerleri kullanılmıştır.

Antibiyotik dirençlilik belirlemede kullanılan antibiyogram diskleri (Bioanalyse,); vankomisin (30 mcg), kloramfenikol (30 mcg), streptomisin (10 mcg), rifampisin (5 mcg), tetrasiklin (30 mcg), kanamisin (2 mcg), ampisilin (10 mcg), gentamisin (10 mcg) ve penisilin (10 U)'dir.

Çalışmada kullanılacak LAB izolatlarının genomik DNA izolasyonları için Vivantis GF-1 Bacterial DNA Extraction Kitleri (Sigma-Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

2.2. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik olarak belirlenmesi

Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen LAB' ların antibiyotiklere karşı direncini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Gülay, 2003; Mayrhofer vd., 2008). LAB suşlarının, 24 saatlik *Lb. bulgaricus* için 37°C ve *S. thermophilus* 42°C'lerde inkübasyonu sonrasında antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları elektronik kumpas yardımıyla ölçülmüştür. (Çetin ve Gürler, 1989). Çalışmalar iki paralel olarak yürütülmüş ve sonuçlar ortalama değerler alınarak hesaplanmıştır.

2.3. Laktik asit bakterilerinden DNA izolasyonu

Öncelikle LAB izolatları, *Lb. bulgaricus* için MRS agarda 37°C ve *S. thermophilus* için SM17 agar ortamında 42°C'de 48 saatlik inkübasyona tabi tutulmuş ve bu kültürlerden saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılmış bakteri izolatlarının genomik DNA izolasyonları, Vivantis GF-1 Bacterial DNA Extraction Kitleri kullanılarak yapılmış, izole edilen genomik DNA'lar -20 °C'de steril eppendorflarda saklanmıştır. İzole edilen DNA'lar daha sonra antibiyotik direnç genlerinin taranmasında kullanılmıştır.

2.4. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç genlerinin genotipik olarak belirlenmesi

Çalışmamızda, disk difüzyon yöntemiyle LAB izolatlarının direnç gösterdiği antibiyotik türleri saptanmış ve antibiyotik direnç genlerin PCR tekniğiyle araştırılmıştır. PCR'de kullanılan antibiyotik direnç primerleri, ampikon uzunlukları ve yapışma sıcaklıkları Çizelge 1'de verilmiştir.

PCR örnekleri 0,2 mL'lik tüplerde hazırlanarak her bir direnç genine özgü PCR koşullarında muamele edilmiştir. PCR işleminde, 94°C DNA'nın denatürasyonu, değişken yapışma, 72°C'de uzama sıcaklığı olarak ayarlanmıştır ve PCR 30 döngü olarak yapılmıştır.

İzole edilen genomik DNA ve PCR ürünleri %1'lik Agaroz jelde 120 volt, 60 miliamperde 45 – 60 dakika yürütülmüştür. DNA 100 baz çiftlik ya da 1000 baz çiftlik DNA markörleri (Vivantis) kullanılmıştır. Agaroz jel EtBr (0,5µg/mL) ile 30 dakika boyanarak UV ışığında görüntülenmiştir.

Çizelge 1. PCR işleminde kullanılan antibiyotik direnç primerleri, amplicon uzunlukları ve yapışma sıcaklıkları

Antibiyotik	Primer Dizisi (5'→3')	Yapışma Sıcaklığı (°C)	Gen Amplifikasyonu (bp)	Referans
Vankomisin <i>van (E)</i>	F:TGTGGTATCGGAGCTGCAG R:GTCGATTCTCGCTAATCC	52	513	Fines vd., 1999
Streptomisin <i>str(B)</i>	F:ATCGTCAAGGGATTGAAACC R:GGATCGTAGAACATATTGGC	56	509	Ouoba vd., 2008
Penisilin <i>blaZ</i>	F:CAGTTCACATGCCAAAGAG R:TACACTCTTGGCGGTTTC	53	772	Schnellmann vd., 2006
Kanamisin <i>aph(3')-IIIa</i>	F:GCCGATGTGGATTGCGAAAA R:GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	60	292	Rojo-berares vd., 2006

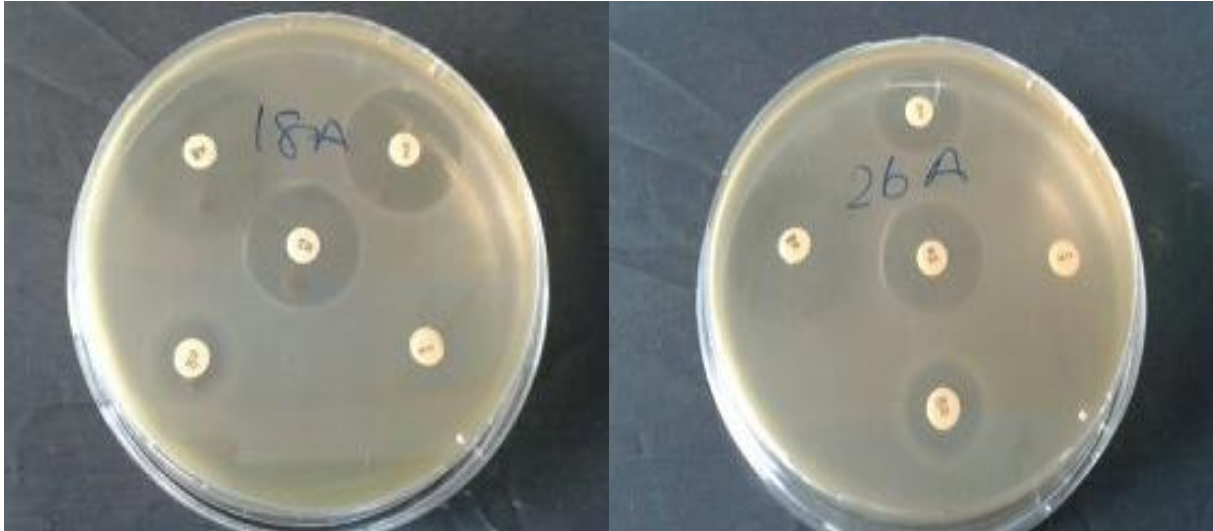
3. Bulgular ve tartışma

Gıda kaynaklı doğal başlangıç izolatlarından elde edilmiş olan *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* bakterilerinin antibiyotik direnç profillerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi, toplum sağlığı açısından tehdit oluşturan ve ekonomik açıdan kayıplara yol açan antibiyotik dirençliliği bulunan başlangıç kültürlerinin tespit edilmesi bu çalışma kapsamında incelenmiştir.

3.1. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıklarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi

Çizelge 2 ve 3'te incelenen 73 LAB'nin 9 farklı antibiyotiğe karşı % duyarlılık oranları verilmiştir. Araştırılan izolatlardan *S. thermophilus*'a ait olanların tamamının tüm antibiyotiklere %43 ile

%97 oranında yüksek duyarlılık gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 1). Rifampisin (%97), tetrasiklin (%97) ve penisilin (%97) antibiyotikleri en yüksek duyarlılık gösteren antibiyotikler olarak belirlenmiştir. Suşların kullanılan antibiyotiklerden kanamisin antibiyotiklerine genel olarak dirençli (%57) olduğu görülmüştür. *S. thermophilus*'un nükleik asit sentezini inhibe eden rifampisin (%3), hücre duvarı sentezini inhibe eden penisilin (%3), vankomisin (%7) ve ampisilin (%6) ve protein sentezini inhibe eden tetrasiklin (%3), streptomisin (%10), gentamisin (%18), kloramfenikol (%6) antibiyotiklerine düşük seviyede dirençli oldukları bulunmuştur. En yüksek dirençlilik, protein sentezini inhibe eden kanamisin (%57) antibiyotiğine karşı tespit edilmiştir (Çizelge 2).



Şekil 1. Antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen zon görüntüleri

Çizelge 2. *S. thermophilus* izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları

Antibiyotikler	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)	Toplam (%)
Tetrasiklin	3	4	93	100
Gentamisin	18	-	82	100
Streptomisin	10	31	59	100
Ampisilin	6	-	94	100
Kloramfenikol	6	3	91	100
Vankomisin	7	-	93	100
Rifampisin	3	1	96	100
Kanamisin	57	6	37	100
Penisilin G	3	7	90	100

(-): Tespit edilemedi.

Temmerman vd. (2003) tarafından Avrupa’da elde edilen 55 probiyotik üründen izole edilen bazı bakterilerin antibiyotik direnci araştırılmış, disk difüzyon metodu kullanılarak 187 izolattan %79 kanamisine, %65 vankomisine, %26 tetrasikline %23 penisilin G’ye, %16 eritromisine ve %11 kloramfenikole direnci tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki toplam suşların (*Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus*) kanamisine %60 oranında direnç göstermesi Temmerman vd. (2003)’nin çalışması ile paralellik göstermektedir. Buna karşın, kloramfenikole %90, vankomisine %86, tetrasikline %93 penisiline %93 oranlarında duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Aslım ve Beyatlı (2004), yoğurtlardan izole edilen *S. thermophilus* türlerinde plazmit taşıyıcılığı ve bu türlerin antibiyotik dirençliliklerini araştırmışlardır. *S. thermophilus* suşlarının büyük bir çoğunluğunun gentamisine (%79) penisiline G (%64) dirençli, kloramfenikole (%94) ve tetrasikline (%88) ise hassas olduklarını bulunmuşlardır. Benzer şekilde, çalışmamızda da

tetrasiklin ve kloramfenikol’ün *S. thermophilus* suşlarına en etkili antibiyotiklerden olduğu söylenebilir ve araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Aslım ve Beyatlı (2004) çalışmasıyla bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar arasında, gentamisin ve penisilin direnci önemli düzeyde farklılıklar içermekte olup, kloramfenikol ve tetrasiklin duyarlılığı paralellik göstermektedir.

Bu araştırmadaki *Lb. bulgaricus* izolatlarının tümü vankomisine, streptomisine, penisiline ve kanamisine dirençli bulunmuştur. Suşların tamamının tüm antibiyotiklere %40 ile %100 oranında dirençli oldukları saptanmıştır. Suşların kullanılan antibiyotiklerden ampisiline genel olarak duyarlı (%60) olduğu, gentamisine (%20) ise düşük seviyede duyarlı olduğu görülmüştür. En yüksek dirençliliğin vankomisin (%100), streptomisin (%100), penisilin (%100) ve kanamisin (%100) antibiyotiklerine karşı olduğu belirlenmiş, en düşük dirençlilik %40 oranında ampisilin antibiyotiginde gözlenmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. *Lb. bulgaricus* izolatlarının antibiyotiklere gösterdiği % duyarlılık oranları

Antibiyotikler	Dirençli (-)	Orta Derece Duyarlı (+)	Duyarlı (++)	Toplam (%)
Tetrasiklin	60	20	20	100
Gentamisin	80	-	20	100
Streptomisin	100	-	-	100
Ampisilin	40	-	60	100
Kloramfenikol	60	-	40	100
Vankomisin	100	-	-	100
Rifampisin	60	-	40	100
Kanamisin	100	-	-	100
Penisilin G	100	-	-	100

(-): Tespit edilemedi

Hummel vd. (2007), endüstriyel starter kültürlerin antibiyotik dirençlerini belirlemek amacıyla yapmış oldukları araştırmada *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp.

ve *Leuconastoc* spp. ait 45 adet LAB suşunun antibiyotik direncini incelemişlerdir. Çalışmada, eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ya da β -laktam dirençleri %7 gibi çok düşük bulunmasına

karşın, aminglikosid (gentamisin ve streptomisin) ve siprofloksasin dirençleri %70'den daha fazla olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda elde edilen bulgular neticesinde *Lactobacillus*, *Streptococcus* suşlarının kloramfenikol, tetrasiklin duyarlılığı ile *Lactobacillus* suşlarının gentamisin ve streptomisin direnci bu çalışma ile paralellik göstermekte olup, *Streptococcus* suşlarının gentamisin ve streptomisin dirençleri değişkenlik göstermektedir.

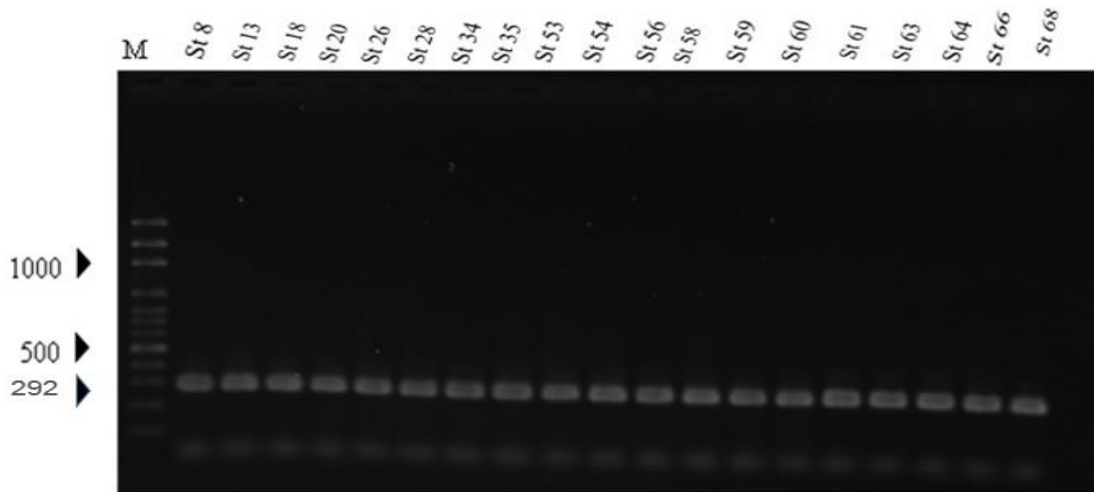
Tatlı (2009), tarafından yapılan çalışmada, izole edilen tüm geleneksel süt ürünlerinde bulunan *Lactobacillus spp.*'lerin %59'u vankomisine %27'si siprofloksasine, %27'si gentamisine, %11'i eritromisine ve %4'ü tetrasikline direnç gösterdiği saptanmıştır. İzole edilen *Lactobacillus spp.*'lerinin hiçbirinde kloramfenikol, ampisilin, nitrofurantoin ve rifampisin direncine rastlanmamıştır. İzole edilen *Streptococcus spp.* suşlarının %40'ının vankomisine, %30'unun siprofloksasine, %20'sinin gentamisine ve %10'unun eritromisin ve kloramfenikole karşı dirençli olduğu saptanmıştır. İzolatlarda tetrasiklin, ampisilin, rifampisin ve nitrofurantoin karşı direnç saptanmamıştır. Benzer şekilde çalışmamızda da *Lactobacillus spp.*'lerin vankomisin, gentamisin ve tetrasiklin dirençleri araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunmakla beraber, kloramfenikol ve ampisilin direncinde farklılıklar gözlenmektedir. Çalışmamızda *Streptococcus spp.* suşlarının vankomisin, gentamisin dirençlilik oranı yapılan çalışma ile paralel olup, kloramfenikol direnci ise önemli düzeyde farklılık göstermektedir.

Kirtzalidou vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada izole edilen laktobasillerin büyük çoğunluğunun, ampisilin, amoksisilin / klavulanik asit, tetrasiklin, eritromisin, sefalotin, kloramfenikol ve rifampisin antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Suşların %34'ünün ise vankomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise *Lactobacillus* türlerinde önemli oranda ampisilin, tetrasiklin, rifampisin ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı duyarlılık gözlenmiştir. *Lb. bulgaricus* suşlarının vankomisin antibiyotiğine dirençliliği ise %100 olarak bulunmuştur.

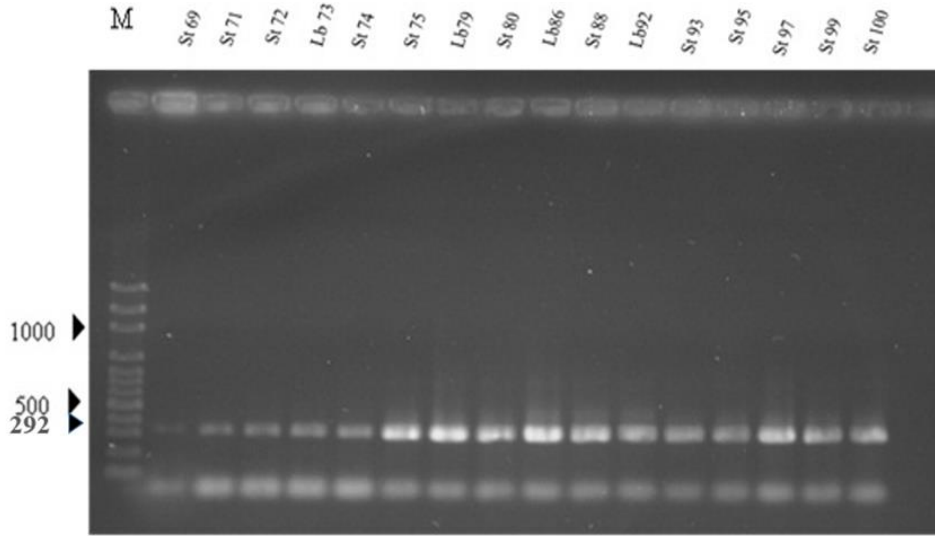
3.2. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin genotipik olarak belirlenmesi

Bakterilerin antibiyotik dirençlilik özelliklerinin genotipik olarak belirlenmesi, kromozomlar üzerinde direnç sağlayan özellikleri taşıyabilmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu genleri diğer bakterilere transfer etmesi de gıdalarda ve insan sağlığı üzerinde risk oluşturabilmektedir.

aph(3')-IIIa primerleri kullanılarak yapılan taramada, disk difüzyon yönteminde kanamisine dirençli olduğu saptanan 44 adet izolatın DNA izolasyonu yapılmış olup, izole DNA'ların 35'inde (32 adet *S. thermophilus*, 3 adet *Lb. bulgaricus*) *aph(3')-IIIa* bölgesi saptanmıştır. Kanamisine fenotipik direnç gösteren *S. thermophilus* izolatlarından St70 ve *Lb. bulgaricus* izolatlarından Lb86'da istenen gen bölgesi bulunamamıştır. *aph(3')-IIIa* fragmanı yaklaşık 292 bp uzunluğundadır. Çizelge 1'de verilen primerler kullanılarak yapılan taramada PCR sonucu izolatlarda saptanabilen direnç genlerine ait jel görüntüleri Şekil 2 ve Şekil 3'de verilmiştir.



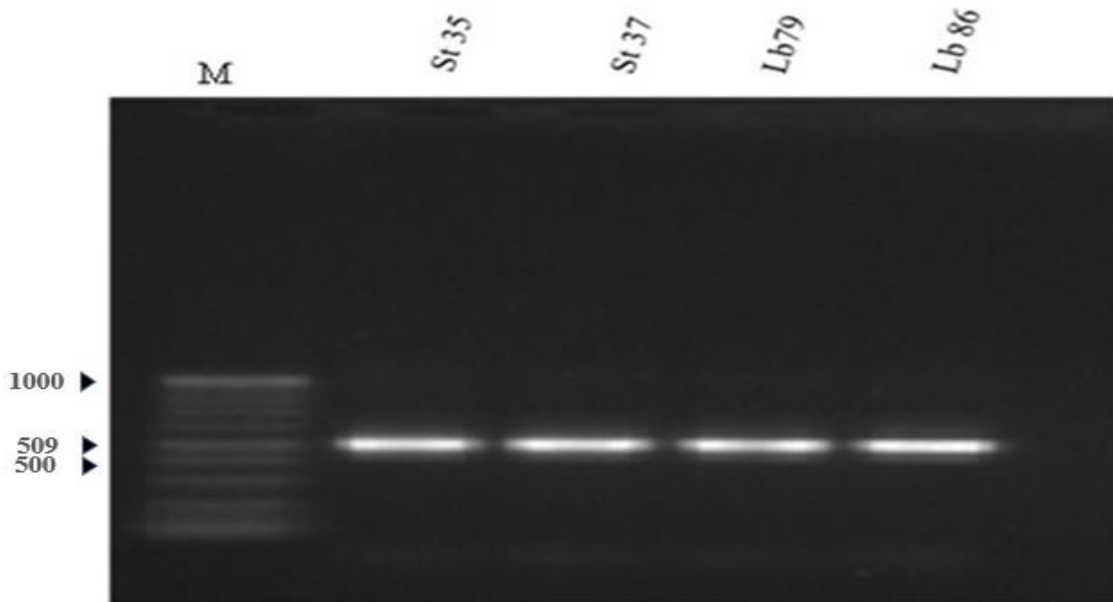
Şekil 2. İzolatlarda belirlenen *aph(3')-IIIa* geninin (292 bp'de) jel görüntüsü



Şekil 3. İzolatlarda belirlenen *aph* (3')-IIIa geninin (292 bç'de) jel görüntüsü

Zhou vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada Çin'de farklı bölgelerden alınan yoğurtlardan, antibiyotik dirençliliği test edilen bakterilerden 35 suşta ampicilin, kloramfenikol, tetrasiklin, klortetrasiklin, linkomisin, streptomisin, gentamisin ve neomisin direnci fenotipik ve genotipik yöntemlerle tespit edilmeye çalışılmış, PCR yöntemi ile tespit edilmeye çalışılan direnç genleri sonucunda, 5 *Lb. bulgaricus* ve 2 *S. thermophilus* izolatında *aph* (3')-IIIa genleri saptanmıştır.

Str(B) primerleri kullanılarak yapılan taramada, streptomisine dirençli 11 izolatın DNA izolasyonu yapılmış olup izole DNA'ların 4 adedinde *str(B)* bölgesi saptanmıştır. Streptomisine fenotipik direnç gösteren 5 *Lb. bulgaricus* izolatından Lb79 ve Lb86 hariç diğerlerinde *str(B)* gen bölgesine rastlanmamıştır. 3 *S. thermophilus* izolatından St22 hariç diğer iki izolatta istenen gen bölgesi tespit edilmiştir (Şekil 4). Özteber (2013) yaptığı çalışmada elde ettiği bulgulara paralel olarak, çalışmamızda PCR uygulamaları sonucunda *str(B)* (%36) genleri bulunmuştur.

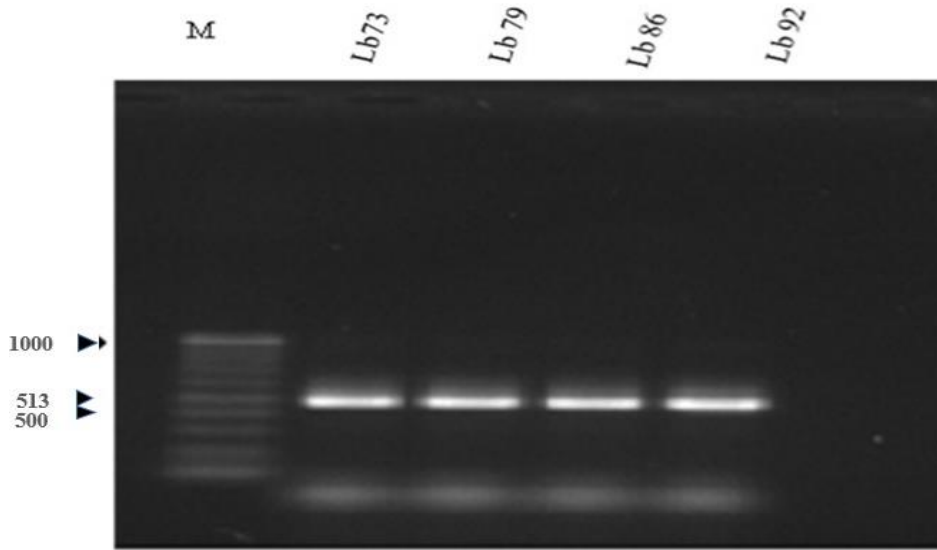


Şekil 4. İzolatlarda belirlenen *Str(B)* genlerinin (509 bç'de) jel görüntüleri

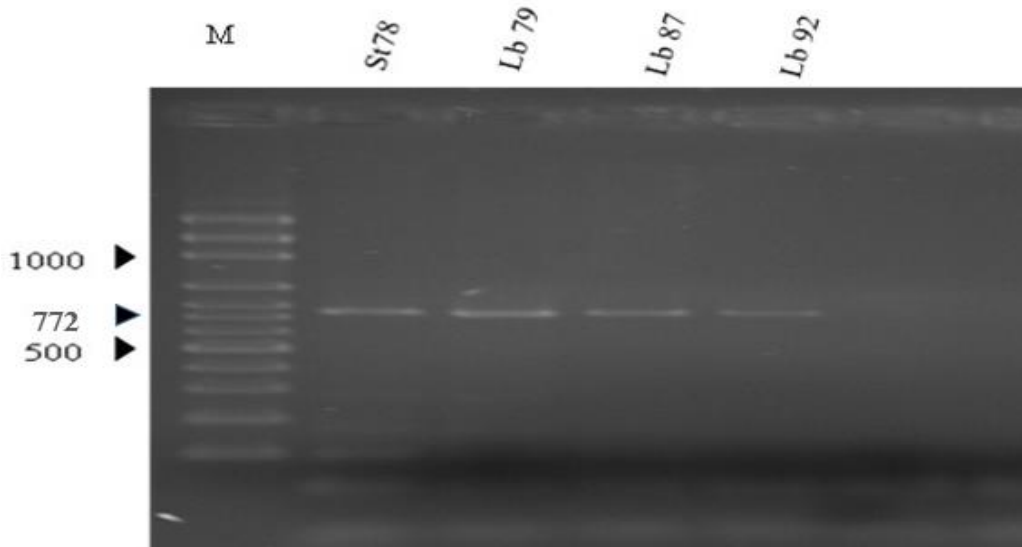
Özteber (2013)'in, farklı kaynaklardan aldığı fermente süt ürünlerinden izole edilmiş LAB'nin antibiyotik dirençliliklerini fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırmış, eritromisin (*erm*), tetrasiklin (*tet*) ve aminoglikozid direncini kodlayan *aac* (6')-*aph* (2'') primerleri ile yaptığı PCR uygulamaları sonucunda *tet* (M) (%7,14), *aac* (6')-*aph* (2'') (%5,95), *erm* (B) (%4,76), *tet* (L) (%2,38), *van* (C) (%1,19), *erm* (C) (%0,59) ve *tet* (K) (%0,59) genleri bulmuştur. Çalışmamızda ise PCR denemeleri sonucunda *aph*(3')-IIIa (%95) genleri bulunmuştur. Bizim bulduğumuz sonuçlar, Özteber (2013) tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir.

Van (*E*) primerleri kullanılarak yapılan taramada vankomisine dirençli 9 izolatın 6 tanesinin DNA izolasyonu yapılmış olup, izole DNA'ların 4 tanesinde *van* (*E*) bölgesi saptanmıştır. Vankomisine dirençli 1 *S. thermophilus* izolatı (St8) bulunmasına rağmen ilgili direnç geni gözlenememiştir. Fenotipik direnç gösteren 5 *L. bulgaricus* izolatlarından Lb87 hariç diğerlerinde ilgili gen bölgesi bulunmuştur. *Van* (*E*) fragmanı yaklaşık 513 bp uzunluğundadır (Şekil 5).

Çalışmamızdaki PCR denemeleri sonucunda izolatlarda *van* (*E*) (%67) genleri tespit edilmiştir. Bu durum Özteber (2013) tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.



Şekil 5. İzolatlarda belirlenen *van* (*E*) genlerinin (513 bp'de) jel görüntüleri



Şekil 6. İzolatlarda belirlenen *BlaZ* genlerinin (772 bp'de) jel görüntüleri

BlaZ primerleri kullanılarak yapılan taramada ise penisiline dirençli 4 izolatın DNA izolasyonu yapılmış olup izole DNA'ların tümünde *BlaZ* bölgesine rastlanmıştır. *BlaZ* fragmanı yaklaşık 772 bp uzunluğundadır (Şekil 6).

Disk difüzyon yöntemi ile kanamisine direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan %60'ında *aph(3')-IIIa* bölgesi, streptomisine direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan %36'sında *str(B)* bölgesi, vankomisine direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan %44'ünde *van (E)* bölgesi, penisiline direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan tamamında *BlaZ* bölgesi saptanmıştır.

Elde edilen bulgular dikkate alınarak fenotipik direnç gösteren izolatların bir kısmı değişken olarak test antibiyotiklerinin bazılarının dirençlilik genlerini [*str(B)*, *van (E)*, *blaZ* ve *aph (3')-IIIa*] taşıdığı tespit edilmiştir (Çizelge 4). Bu durum mutasyon gibi evrimsel olaylarla açıklanabilir ve izolatlar dirençlilik geni kazanmış olabilir ya da uygulanan metotlarla dirençli gen tespit edilememiş olabilir (Liu vd., 2009).

4. Sonuç ve öneriler

Yapılan bu çalışmada doğal yoğurt örneklerinden izole edilmiş ve genetik tanımlaması yapılmış bakteri stoklarından *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterilerine ait izolatlar canlandırılarak antibiyotik direnç özellikleri belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik dirençliliği saptanan izolatların en fazla direnç gösterdikleri

antibiyotiklere ait primerler kullanılarak genotipik tarama yapılmış; disk difüzyon yöntemi ile kanamisine direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan %60'ında *aph(3')-IIIa* bölgesi, streptomisine direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan %36'sında *str(B)* bölgesi, vankomisine direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan %44'ünde *van (E)* bölgesi, penisiline direnç gösterdiği tespit edilen suşlardan tamamında *BlaZ* bölgesi saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunan izolatlardan %51'inde direnç genleri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak hem insanları hem de hayvanları kapsayan sağlık problemlerinin çözüme ulaşmasında pratik olarak antibiyotiklere başvurulması, antibiyotiklerin LAB'nin aracılığıyla direnç kazanması sonucu önemli sorunlar meydana getirebilme riski taşımaktadır. Fermente gıda üretiminde tercih edilen LAB'nin genellikle güvenli mikroorganizmalar oldukları düşünülmekte, bağırsak sistemindeki patojenleri baskılayarak florada hâkim olmaları istenmektedir. Ancak, sahip oldukları antibiyotik direnç genini patojenlere aktarma ihtimalinin önemli bir tehdit olduğu düşünülmektedir. Hem yapılan mevcut çalışmadan elde edilen hem de farklı çalışmalardan elde edilen bulgular, gıda zincirinde önemli bir yeri olan fermente süt ürünlerinin, insan ve hayvan popülasyonu arasındaki antibiyotik dirençlilik gösteren bakterilerin taşınmasının bir aracı ve gıda kaynaklı bakterilerin antibiyotik direnç genlerinin kaynaklarından biri olduğu konusunda yapılan tahminleri desteklemektedir.

Çizelge 4. Çalışmada tespit edilen gıda kaynaklı *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* izolatlarının fenotipik ve genotipik antibiyotik direnç profilleri

LAB izolatı	Fenotipik antibiyotik direnç profili / resistant (sayı; yüzde)	Genotipik direnç profili (<i>str(B)</i> , <i>van (E)</i> , <i>blaZ</i> ve <i>aph (3')-IIIa</i>)/(+)
<i>Lb. bulgaricus</i>	bVankomisin / (5; %100)	<i>van (E)</i> /(4; %80)
	Kloramfenikol / (3; %60)	-
	Ampisilin / (2; %40)	-
	Gentamisin / (4; %80)	-
	Kanamisin / (5; %100)	<i>aph (3')-IIIa</i> /(4; %80)
	Penisilin / (3; %60)	<i>blaZ</i> /(3; %100)
	Rifampisin / (3; %60)	-
	Streptomisin / (5; %100)	<i>str (B)</i> /(2; %40)
Tetrasiklin / (3; %60)	-	
<i>S. thermophilus</i>	Vankomisin / (5; %7)	-
	Kloramfenikol / (4; %6)	-
	Ampisilin / (4; %6)	-
	Gentamisin / (12; %18)	-
	Kanamisin / (39; %57)	<i>aph (3')-IIIa</i> /(31; %79)
	Penisilin / (2; %3)	<i>blaZ</i> /(1; %50)
	Rifampisin / (2; %3)	-
	Streptomisin / (7; %10)	<i>str (B)</i> /(2; %29)
Tetrasiklin / (2; %3)	-	

Bu çalışmada elde edilen bulgular sonucunda, fermente gıdalarda tercih edilen LAB'nin kullanımına izin verilmeden önce antibiyotik direnç profillerinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

5. Teşekkür

Bu çalışma; Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2014/3 dönemi 1649B021412580 no'lu ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2014/3-3 YLS no'lu projeleri ile desteklenmiştir.

6. Kaynaklar

Ammor, M. S., Şorez, A.B. and Mayo, B., 2007. Antibiotic Resistance in Nonenterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24: 559-570.

Ammor, M. S., Flórez, A. B., Van Hoek, A. H., Clara, G., Aarts, H. J., Margolles, A. and Mayo, B. (2008). Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbial Physiology*, 14(1-3), 6-15.

Anonim, (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards For Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2–A10. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Aslim, B., and Beyatli, Y. (2004). Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yoghurts. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28, 257-263.

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P. ... and Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International journal of food microbiology*, 154(3), 87-97.

Cai, L., Ju, F. and Zhang, T. (2014). Tracking human sewage microbiome in a municipal wastewater treatment plant. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(7), 3317-3326.

Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S. ... and O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1), e01738-18.

Çelik, H., Durak, Y. ve Uysal, A. (2016). Bazı ticari ve ev yapımı yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik duyarlılıkları. *Selçuk*

Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 42(2), 149-160.

Çetin, T. E. ve Gürler, N. (1989). Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılık deneyinin yapılması. *Kükem dergisi*, 12(2).

Durupınar, B. (2001). Antibiyotiklere Dirençlerde Yeni Eğilimler. *Klinik Dergisi*, 14(2): 47-55.

Fatahi-Bafghi, M., Naseri, S. and Alizehi, A. (2021). Genome Assessment of Antibiotic Resistance Genes in Probiotic Bacteria and a Literature Review. *Research Square*, 1-13.

Fluit, A. C. and Schmitz, F. J. (2001). The use of molecular techniques to detect antimicrobial resistance in clinical bacterial isolates. *Microbiology Today*, 28, 14-15.

Galvez, A., Lopez, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E. and Omar, N. B. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 28(2), 125-152.

Gazzola, S., Fontana, C., Bassi, D. and Cocconcelli, P. S. (2012). Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and-independent methods. *Food Microbiology*, 30(2), 348-354.

Gülay Z (2003). Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu, *Toraks Dergisi* 1, 75–85.

Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M. and Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food microbiology*, 22(5), 455-459.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzappel, W. H. and Franz, C. M. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 73(3), 730-739.

Jorgensen, J. H., Ferrano, M. J. and Turnidge, J. D. (2003). Susceptibility tests methods: Dilution and disk diffusion methods. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press: 1108-1127.

Jorgensen, J. H. and Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, 1253-1273.

- Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M. and Kyriacou, A. (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17(6), 440-443.
- Ledeboer, N. A. and Hodinka, R. L. (2011). Molecular detection of resistance determinants. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9_Supplement), S20-S24.
- Liu, C., Zhang, Z., Dong, K., Yuan, J. and Guop, X. 2009. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22: 401-412.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. ... and Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(42), 15611-15616.
- Manai, C. M. (2017). Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk. *Trends in microbiology*, 25(3), 173-181.
- Mathur, S. and Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International journal of food microbiology*, 105(3), 281-295.
- Mayrhofer, S., Domig, K. J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G. and Kneifel, W. (2008). Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3745-3748.
- Morandi, S., Silveti, T., Miranda Lopez, J. M. and Brasca, M. (2015). Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *Journal of Food Safety*, 35(2), 193-205.
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., ... and Xu, J. (2011). Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current microbiology*, 62(3), 1081-1089.
- Özteber, M. (2013). Fermente süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençliliklerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi (Master's thesis, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Richter, S. and Ferraro M., (2007). Susceptibility Testing Instrumentation and Computerized Expert Systems For Data Analysis and Interpretation. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Edition. Washington Dc: American Society For Microbiology. s. 245-256.
- Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 3-16.
- Settanni, L. and Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International journal of food microbiology*, 121(2), 123-138.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V. and Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195.
- Soomro, A. H., Masud, T. and Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(1), 20-24.
- Tatlı, D. (2009). Geleneksel süt ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye*, 81s.
- Tavşanlı, H., Mus, T. E., Cetinkaya, F., Aynaoglu, E. and Cibik, R. (2021). Isolation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from nature: Technological characterisation and antibiotic resistance. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(4), 305-311.
- Terkuran, M., Turhan, E. Ü. and Erginkaya, Z. (2019). The risk of vancomycin resistant enterococci infections from food industry. In *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies* (pp. 513-535). Springer, Cham.
- Wang, K., Zhang, H., Feng, J., Ma, L., de la Fuente-Núñez, C., Wang, S. and Lu, X. (2019). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *Journal of Agriculture and Food Research*, 1, 100006.
- Yerlikaya, O., Saygili, D. and Akpınar, A. (2020). Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*, 41, 418-425.
- Zarzecka, U., Chajęcka-Wierzchowska, W. and Zadernowska, A. (2022). Microorganisms from starter and protective cultures-Occurrence of

antibiotic resistance and conjugal transfer of tet genes in vitro and during food fermentation. *LWT*, 153, 112490.