

İşlenme Aşamalarındaki Çay Yapraklarından İzole Edilen Koliform Grubu Bakterilerde Antibiyotik Direnç Profilinin Araştırılması

Elif SEVİM¹, Ali SEVİM¹, Ahu KANBUROĞLU², Zuhale KALYONCU³, Şengül ALPAY KARAOĞLU^{4*}

¹ Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 40100, KIRŞEHİR

² Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 61100, TRABZON

³ Çaykur, Atatürk Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, 53100, RİZE

⁴ Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 53100, RİZE

ÖZET

Çay bitkisi (*Camellia sinensis*) dünyada sudan sonra en çok kullanılan içecektir. Bu çalışmada, fabrikaya getirilen yaş çayın kuru çay olarak imal edilinceye kadar olan her bir işleme aşamasındaki süreçte üzerinde doğal olarak bulunan, Gram negatif koliform bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. İzole edilen koliform bakterilerin identifikasyonu koloni morfolojisi, Gram boyanma özelliği geleneksel yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Agar disk difüzyon metodu ile antibiyotik direnç profilleri belirlenmiş ve TEM tipi beta-laktamaz ve tetrasiklin direnç genlerinin varlığı PCR ile araştırılmıştır. Yaş çayın işleme aşamalarında toplam 312 enterik bakteri izole edilirken işlenmiş çayda herhangi bir mikroorganizma gözlemlenmemiştir. İzolatların %35,8'i *Klebsiella*, %17,6'sı *Citrobacter*, %15,1'i *Enterobacter*, %8,3'ü *Edwardsiella*, %7,1'i *Escherichia* cinslerine ait oldukları belirlenirken %16,1'i tanımlanamamıştır. İzole edilen suşlarda en yüksek direnç %81,73 ile ampisiline karşı gözlenirken, nalidiksik asit, netilmisin ve imipenem dirençli suş bulunmamıştır. Ampisilin dirençli suşların ikisinde TEM tipi beta-laktamaz geni (*bla_{TEM}*) tespit edilmiştir. İzole edilen suşlarda *tet*(A), (B) ve (C) genlerinin varlığı araştırılmış ve tetrasiklin dirençli suşlarda *tet*(B) geninin yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan transformasyon çalışmaları sonucunda tetrasiklin, ampisilin, streptomisin, seftazidim ve trimetoprim/sülfametaksazol dirençlerinin transfer edilebilir olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çay yaprakları, koliform bakteriler, antibiyotik direnci, *bla_{TEM}* geni, *tet*(A)-(B)-(C) geni

INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF COLIFORM BACTERIA ISOLATED FROM TEA LEAVES IN THE PROCESSING STAGES

ABSTRACT

Tea plant (*Camellia sinensis*) is the most common beverage in the world after water. In this study, it was aimed to determine antibiotic resistance profiles of Gram negative coliform bacteria which were naturally found on fresh tea leaves for each tea processing stage. The identification of the isolated coliform bacteria was performed based on colony morphology, Gram staining and conventional methods. The antibiotic resistance profiles of the isolated bacteria were determined by agar disc diffusion assay and the presence of TEM type of beta-lactamase and tetracycline resistance genes was investigated by PCR. Although a total of 312 enteric bacteria were isolated from the processing stages of tea leaves, no microorganism was observed from processed tea. The isolates were identified as *Klebsiella* sp. (35,8%), *Citrobacter* sp. (17,6%), *Enterobacter* (15,1%), *Edwardsiella* (8,3%), *Escherichia* sp. (7,1%) and unidentified (16,1%). While the highest resistance among the isolated strains was observed from ampicillin (81,73%), no resistance was found with respect to nalidixic acid, netilmicin and imipenem. TEM type of beta-lactamase gene (*bla_{TEM}*) was detected in two of ampicillin resistance strains. The presence of *tet* (A), (B) and (C) genes were investigated from the isolated strains and it was found that *tet* (B) gene was the most common. It was determined that the resistance of tetracycline, ampicillin, streptomycin, ceftazidime, and trimethoprim/sulfamethoxazole was transferable based on transformation assays.

Keywords: tea leaves, coliform bacteria, antibiotic resistance, *bla_{TEM}* gene, *tet*(A)-(B)-(C) gene

I. GİRİŞ

Gama Proteobacteria içinde yer alan enterik bakteriler filogenetik olarak oldukça homojen bir grup olup, çubuk şeklinde, hareketsiz ya da peritriş kirpikleriyle hareket eden, fakültatif anaerob, Gram negatif bakterileri kapsamaktadır. Enterik bakteriler çevresel ve ekolojik rollerinden ziyade sıklıkla klinik açıdan bilinen türler içerirler. *Escherichia* cinsi üyeleri evrensel olarak insan ve hayvanların bağırsak florasında bulunmakla birlikte bu habitatlardaki en baskın organizma değildir. *Serratia* ve *Enterobacter* oksidaz negatif olup sıklıkla toprakta, suda, bitkilerde, küçük memeli ve böceklerde bulunan bakterilerdir [1].

Mikroorganizmalar su kaynaklarında, havada, toprakta, hayvan ve bitkiler üzerinde, dolayısıyla tüm çevremizde bulunmakta olup gıda kaynaklarımızın bozulmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Enterobakterler, sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarından çevreye ve atık sulara, buradan da zaman zaman içme ve kullanma sularına bulaşıp insanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. İnsan, hayvan veya bitkiler için patojenik olan pek çok türü olduğu gibi, endüstriyel önemi olan suşlarda bulunmaktadır. Gıdalarda mikrobiyal populasyon yoğunluğu belirli bir düzeye çıktığında gıdanın bozulmasına ve potansiyel patojen olarak gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olur. Bir kısım bakteriler ise bitkinin doğal flora üyesi olup bitki gelişimine ve ürünün oluşumuna yarar (azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğü, fitohormon üretimi, siderofor üretimi vb.) sağlar, bitki zararlılarına karşı pestisit kullanımını azaltmada rolleri bulunur [2, 3].

Çay, *Camellia sinensis* yapraklarından üretilen, sudan sonra dünyada en çok tüketilen sıvıdır. Yeşil ve siyah çay'ın tümü bu bitkinin yapraklarından üretilir. Bu çayların kimyasal içeriği ve tadı büyük oranda fermentasyon işleminin çeşitliliğine bağlıdır. Ülkemizde 1940 yılından beri Doğu Karadeniz bölgesinde Hopa'dan Trabzon-Araklı ilçesine kadar uzanan sahil şeridinde çay üretimi yapılmaktadır. Bu çalışma bölgenin en önemli ekonomik kaynağını oluşturmakta olan çayın işleme aşamalarında ve ürün çayda Gram negatif bakteri populasyonunun halk sağlığı açısından önemini belirlemek amacıyla planlanmıştır.

II. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Çay Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma, Mayıs 2004 – Eylül 2005 tarihleri arasında, Çaykur'a ait Cumhuriyet ve Zihniderin Çay fabrikalarından alınan örneklerde yapıldı. Çalışma Rize Çay Araştırma Enstitüsü ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, işbirliği ile Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Yaş çayın fabrikaya girişi ile kuru çay olarak çıkışı arasında 10 farklı istasyon

belirlenmiştir (Tablo 1). Her istasyondan yaklaşık olarak 50 gr çay örneği steril kaplara alınarak hızlı bir şekilde laboratuvara getirildi.

Tablo 1. Zihniderin ve Cumhuriyet Çay Fabrikalarında belirlenen istasyonlar

İstasyon No	İstasyon Tanımı
1	Soldurma girişi
2	Soldurma çıkışı
3	Birinci kıvrıma
4	Rotervan çıkışı
5	İkinci kıvrıma
6	Fermentasyon girişi
7	Fermentasyon ortası
8	Fermentasyon çıkışı
9	Fırın girişi
10	Fırın çıkışı

2.2. Çay Örneklerinden Enterik Bakterilerin İzolasyonu

Belirlenen 10 farklı istasyondan alınan çay örneklerinden 10 gr tartılıp, 90 ml steril serum fizyolojik içeren cam erlenlere aktarıldı. Erlenler çalkalamalı su banyosunda 30 dk. inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10^{-5} 'e kadar seri dilüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan seri dilüsyonların 10^{-1} , 10^{-3} ve 10^{-5} dilüsyonlarından Gram negatif enterik bakteriler için seçici ve ayırt edici olan EMB (Eosine methylene blue) agar besiyerine yayma ekimleri gerçekleştirildi. Petri kapları 37°C 'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda EMB agar besiyerinde büyüyen kolonilerden Nutrient Agar besiyerine tek koloni ekimleri gerçekleştirildi. Gram boyama sonucunda Gram negatif olarak tespit edilen saf kültürlerin gliserol stokları gerçekleştirildi ve identifikasyon işlemleri için morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testleri gerçekleştirildi.

İzolatların morfolojik olarak Gram boyama özellikleri Claus'un Prosedürüne göre gerçekleştirildi [4]. Ayrıca izolatların hareket, kapsül oluşturup oluşturmadığı ve Nutrient sıvı besiyerinde üreme özellikleride belirlendi [5].

İzolatların fizyolojik olarak optimum büyüyebilmeleri için ısı, pH ve NaCl toleransları belirlendi. Optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla Nutrient Broth besiyeri içinde yapılan 16–24 saatlik kültürlerden, OD600 = 0,1 olacak şekilde yeniden Nutrient Broth besiyerine ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 10, 15, 30, 37, 45, 50 ve 55°C 'de 18 saat çalkalamalı olarak inkübe edildi ve optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar belirlendi. İzolatların büyüyebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12) sahip Nutrient Broth besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C 'ye ayarlı su banyosunda gece

boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına spektrofotometrede (OD_{600} nm'de) ölçümler yapılarak karar verildi. İzolatların NaCl toleranslarının belirlenmesi amacıyla %3, 5, 7, 8, 10, 12 ve 15 oranında NaCl ihtiva eden LB Broth besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 3'er ml deney tüplerine alınarak her bir izolatın ekim yapıldı. Gece boyu 37°C'ye ayarlı su banyosunda inkübe edildi. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi [5].

İzolatların biyokimyasal özelliklerini belirlemek için bir dizi testler gerçekleştirildi. İzolatların katalaz enzimi oluşturup oluşturmadıklarının ortaya çıkarılması amacıyla Nutrient Agar Besiyerinde bir gece inkübe edilen izolatların üzerine %3'lük H_2O_2 çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz karcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi. İzolatların oksidaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla Nutrient Agar Besiyerlerinde bir gece inkübe edilen izolatların üzerine oksidaz testi ayırıcı ilave edildi. Oluşan koyu mavi renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi. IMVIC testleri (indol, metil red, voges-proskauer, sitrat), nitrat indirgeme, üre hidrolizi, jelatin hidrolizi, glikozdan gaz ve H_2S oluşumu testleri gerçekleştirildi [5]. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerin sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de [6] belirtilen sonuçlar ile karşılaştırılarak Gram negatif enterik bakterilerin identifikasyonları gerçekleştirildi.

2.3. İzolatların Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal hassasiyet testleri "ClinicalandLaboratoryStandardsInstitute (CLSI, 2006)" rehberindeki standart disk

difüzyon metoduyla yapıldı [7]. Sonuçlar, aynı rehberdeki standart zon çapları ölçülüp mukayese edilerek yorumlandı. Çalışmada, tetrasiklin (TE, 30µg), seftazidim (CAZ, 30µg), kloramfenikol (C, 30 µg), amikasin (AK, 30µg), netilmisin (NET, 30 µg), ampisilin (AMP, 30µg), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1.25 µg/23.75 µg), nalidiksik asit (NA, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), kanamisin (K, 10 µg) diskleri kullanıldı. İzolatların antibiyotik direnç profilleri MHA besiyeri kullanılarak belirlendi. *E. coli* ATCC 25922 suşu kontrol olarak kullanıldı.

2.4. Ampisilin ve Tetrasiklin Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Ampisilin ve tetrasiklin dirençli izolatlardan DNA izolasyonu Sambrook ve ark. prosedürüne göre gerçekleştirildi [8].

PCR reaksiyonu toplam 50 µl'lik hacimde 200 µl hacimli mikrotüplerde yapıldı. Reaksiyon karışımı her bir primerden 10 pmol, 1X reaksiyon tamponu, 0.2mM her bir deoksiniükleotidtrifosfat (dNTP; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM $MgCl_2$ ve 1 U *Taq* polimeraz kullanılarak hazırlandı. Ampisiline dirençli izolatlarda TEM-tipi β-laktamaz geni (*bla_{TEM}*), gen içi OT1/OT2 ve tam gen OT3/OT4 primerleri, Tetrasikline dirençli izolatlarda *tet(A)*, *tet(B)* ve *tet(C)* genleri için primer çiftleri kullanılarak tarandı (Tablo 2).

Amplifikasyon işlemi ilk denetürasyon 94°C' de 3 dk. daha sonra 35 döngü 94°C' de 45 sn. denetürasyon, 52°C' de 45 sn. primer bağlanma, 72°C' de 2 dk. sentez şeklinde gerçekleştirildi. Son olarak 72°C' de 5 dk. son sentez yapıldı ve PCR ürünleri 4°C' de beklemeye bırakıldı. Amplifikasyon ürünleri daha sonra 0.5µg/mL etidiyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ışığı altında incelendi.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan primer çiftleri

Primer	Hedef gen	Nükleotit sırası	Amlifikasyon (bp)	Kaynak
OT-1 OT-2	<i>bla_{TEM}</i> (gen içi)	5'-TTGGGTGCACGAGTGGGTGA-3' 5'-TAATTGTTGCCGGGAAGCTA-3'	504	[9]
OT-3 OT-4	<i>bla_{TEM}</i> (tam gen)	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCTG-3' 5'-CAATGCTTAATCAGTGAGG-3'	857	[10]
tet(A)-1 tet(A)-2	<i>tet(A)</i>	5'-GTAATTCTGAGCACTGTGCGC-3' 5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'	917	[11]
tet(B)-1 tet(B)-2	<i>tet(B)</i>	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3' 5'-ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	375	[11]
tet(C)-1 tet(C)-2	<i>tet(C)</i>	5'-GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC-3' 5'-CCTCTTGCGGGAATCGTCC-3'	506	[11]

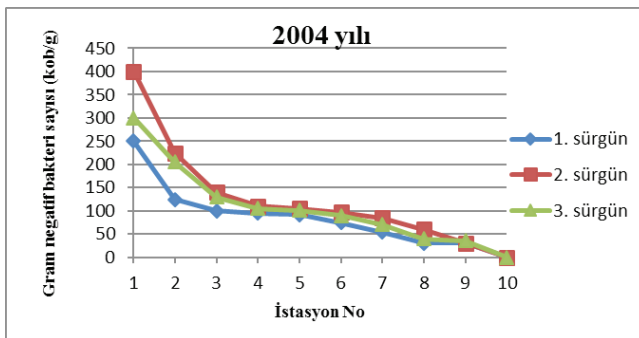
2.5. Plazmit İzolasyonu ve Transformasyon

Ampisilin ve tetrasiklin dirençli izolatlarda gerçekleştirilen *bla*_{TEM} ve *tet*(A), (B), (C) genlerinin aranması çalışmalarında pozitif sonuç elde edilen suşlardan plazmit DNA izolasyonu alkali-lizis metodu kullanılarak gerçekleştirildi [8]. İzole edilen plazmit DNA'lar kalsiyum klorür metodu ile kompetan hale getirilmiş *E. coli* JM101 (*RecA*⁻) hücrelerine ısı şoku metodu ile transfer edildi [12]. Transformantlar 50 µg/ml ampisilin veya 20 µg/ml tetrasiklin içeren Luria-Bertani (LB) agar (%1 tripton, %0.5 sodyum klorür, %0.5 maya özütü, %1.5 agar; pH 7.4) besiyerinde seçildi. Seçici besiyerinde üreyen transformantlardan gerekli antibiyotik içeren LB sıvı besiyerlerine tekrardan ekimleri yapılarak, yeniden plazmit DNA'lar izole edildi. İzole edilen plazmit DNA'lar kullanılarak *bla*_{TEM} ve *tet*(A) ve (B) geni için PCR taramaları yeniden gerçekleştirildi.

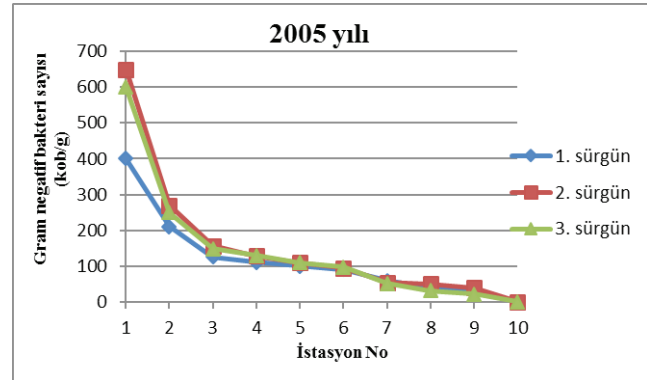
III. BULGULAR

3.1. Çay Örneklerinden Koliform Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada Rize ilinde yer alan iki çay fabrikasının değişik işlem aşamalarından alınan toplam 120 çay örneği koliform bakteri yönünden incelendi. Örneklem istasyonlarında, bir gram çayda sayılan koliform bakterilerin popülasyonu yıl ve sürgün dönemlerine göre ortalama kob/g şeklinde hesaplandı (Şekil 1, Şekil 2). Bakteri sayısının yaprak çayın fabrikaya girişinde en yüksek seviyelerde olduğu gözlenirken 3. istasyon olan birinci kıvrırma aşamasında belirgin bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Üçüncü aşamadan sonra diğer aşamalarda kademeli olarak popülasyonda bir azalma görülürken, son aşama olan fırın çıkışında ise herhangi bir Gram negatif bakteri varlığı tespit edilememiştir.



Şekil 1. 2004 yılı çay yapraklarının işleme aşamalarından izole edilen ortalama Gram negatif bakterilerin sayısı



Şekil 2. 2005 yılı çay yapraklarının işleme aşamalarından izole edilen ortalama Gram negatif bakterilerin sayısı

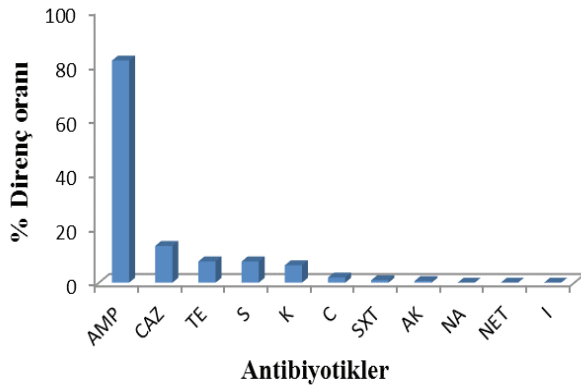
Çalışmada 120 örnekte toplam 312 adet Gram negatif enterik bakteri izole edildi. Konvansiyonel yöntemlerle yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda izolatların tür ve cins seviyesinde identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Çay örneklerinden 75 *Klebsiellapneumoniae*, 20 *K. oxytoca* ve 17 *Klebsiella* sp. olmak üzere 112 *Klebsiella* (% 35,8) cinsi, 13 *C. koseri* ve 42 *Citrobacter* sp. olmak üzere 55 *Citrobacter* (17,6) cinsi, 4 *E. colive* 18 *Escherichia* sp. olmak üzere 22 *Escherichia* (%7,1), 47 *Enterobacter* sp. (%15,1), 26 *Edwardsiella* sp. (%8,3) tanımlanmıştır. Suşların 50'si (%16,1) konvansiyonel yöntemler ile tanımlanamamıştır (Tablo 3).

Tablo 3. İzole edilen enterik bakterilerin cins ve tür düzeyinde dağılımları

Cins ve Tür	Sayı (N)	Yüzde (%)
<i>Klebsiella</i>	112	35,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	75	24,0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	6,4
<i>Klebsiella</i> sp.	17	5,5
<i>Citrobacter</i>	55	17,6
<i>Citrobacter koseri</i>	13	4,2
<i>Citrobacter</i> sp.	42	13,4
<i>Enterobacter</i> sp.	47	15,1
<i>Edwardsiella</i> sp.	26	8,3
<i>Escherichia</i>	22	7,1
<i>Escherichia coli</i>	4	1,3
<i>Escherichia</i> sp.	18	5,8
Tiplendirilemeyenler	50	16,1
Toplam	312	100

3.2. İzolatların Antibiyotik Direnç Profilleri

Tanımlanan 312 suşun test edilen 11 antibiyotiğe karşı direnç oranlarına bakıldığında en yüksek direnç %81,73 oranı ile ampisiline karşı gözlemlendi. Direnç oranları sırasıyla %13,5 seftazidim, %7,8 tetrasiklin ve streptomisin, % 6,4 kanamisin, %1,9 kloramfenikol, % 0,9 trimethoprim/sülfametoksazol, % 0,6 amikasinine karşı tespit edildi. Nalidiksik asit, netilmisin ve imipenem karşı herhangi bir direnç tespit edilemedi (Şekil 3).



Şekil 3.Çayın işleme aşamalarından izole edilen Gram-negatif suşların antibiyotik direnç oranları. AMP: ampisilin, CAZ: seftazidim, TE: tetrasiklin, S: streptomisin, K: kanamisin, C: kloramfenikol, SXT: trimethoprim/sülfametaksazol, AK: amikasin, NET: netilmisin, I: imipenem.

İzole edilen 312 suşun 260 (% 83,3)'ı test edilen 11 antibiyotiğin en az bir veya daha fazlasına karşı dirençli bulunmuştur. Geriye kalan 52 suş (% 16,6) kullanılan tüm antibiyotiklere karşı hassas olduğu tespit edilmiştir. Tür dağılımına göre antibiyotik direncine bakıldığında ise ampisilin, seftazidim ve streptomisin direnci tüm izolatlarda gözlenirken, tetrasiklin direnci *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Edwardsiella* cinslerinde gözlemlenmiştir. Amikasin direnci sadece *K. pneumoniae* ve *Edwardsiella* sp. türlerinde tespit edilmiştir. Trimethoprim/sülfametoksazol direnci ise *K. pneumoniae*, *E. coli* ve tiplendirilmesi yapılamayan bir suşta tespit edilmiştir. Nalidiksik asit, netilmisin ve imipenem direnci ise herhangi bir suşta belirlenmemiştir (Tablo 4).

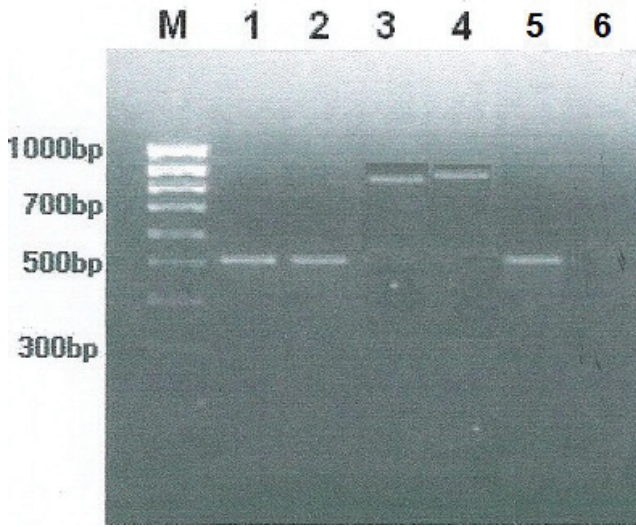
3.3. Ampisilin ve Tetrasiklin Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmada 255 suşun ampisiline karşı, 24 suşun ise tetrasikline karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ampisiline dirençli olarak tespit edilen 255 suşun 159'u *Klebsiella* ve *Enterobacter* cinslerine ait oldukları belirlenmiştir (Tablo 4). *Enterobacter* ve *Klebsiella* cinsleri ampisiline doğal dirençli olduklarından bu suşlarda ampisilin direnç genlerine bakılmamıştır. Ampisilin dirençli diğer 96 izolataın total DNA'ları ve TEM-tipi beta laktamaz spesifik primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda 2 izolataın *bla*_{TEM} pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). Pozitif iki izolataın biri *E. coli* (RÇ 102a) olarak tanımlanırken, diğeri tanımlanamayan izolatlardan (RÇ63j)'dir.

Tablo 4.İzolatların identifikasyon sonuçlarına göre antibiyotik direnç profilleri

Türismi	Sayı	AMP	NA	TE	C	S	AK	STX	K	NET	I	CAZ
<i>K. pneumoniae</i>	75	75	0	9	3	2	7	1	5	0	0	11
<i>K. oxytoca</i>	20	20	0	0	0	2	0	0	2	0	0	4
<i>Klebsiella</i> sp.	17	17	0	1	0	1	0	0	2	0	0	0
<i>C. koseri</i>	13	7	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3
<i>Citrobacter</i> sp.	42	36	0	0	0	8	0	0	4	0	0	10
<i>E. coli</i>	4	3	0	1	0	1	0	1	0	0	0	2
<i>Escherichia</i> sp.	18	14	0	0	0	3	0	0	1	0	0	2
<i>Enterobacter</i> sp.	47	47	0	5	1	1	0	0	1	0	0	1
<i>Edwardsiella</i> sp.	26	13	0	4	1	2	2	0	3	0	0	4
Tiplendirilemeyen	50	23	0	4	1	3	0	1	0	0	0	5
Toplam	312	255	0	24	6	24	9	3	20	0	0	42

AMP: ampisilin, CAZ: seftazidim, TE: tetrasiklin, S: streptomisin, K: kanamisin, C: kloramfenikol, SXT: trimethoprim/sülfametaksazol, AK: amikasin, NET: netilmisin, I: imipenem.



Şekil 4. *bla*_{TEM} pozitif örneklerin agaroz jelde görüntüsü. M, DNA Ladder 100bp (MBI Fermentas, USA); 1, RÇ63j; 2, RÇ 102a; 3, RÇ63j; 4, RÇ 102a; 5, pUC18 (TEM geni pozitif kontrol); 6, *E. coli* ATCC 25922 (TEM geni negatif kontrol). 1 ve 2 nolukuyucuklardaki örnekler OT-1/OT-2 primerleri ile çoğaltılmıştır. 3 ve 4 nolukuyucuklardaki örnekler OT-3/OT-4 primerleri ile çoğaltılmıştır.

Çalışmada tetrasiklin dirençli 24 izolattet(A), tet(B) ve tet(C) genlerinin varlığı açısından incelenmiştir. Genlere

spesifik primerler ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonucunda tet(B) geninin izolatlar arasında yaygın olduğu tespit edilmiştir. İzolatların 8'i tet(B) geni içerdiği, 2'sinin ise tet(A) geni içerdiği tespit edildi. tet(C) geni içeren herhangi bir izolat tanımlanamadı.

3.4. Transforme Olabilen Direnç Genleri

Yapılan transformasyon deneyleri sonucunda ampicilin ve tetrasikline karşı direnç sağlayan genlerin plazmit üzerinde yer aldığı tespit edildi. *bla*_{TEM} pozitif olarak belirlenen tanımlanamayan RÇ63j ve *E. coli* RÇ102a suşlarından izole edilen plazmitlerin alıcı hücre *E. coli* JM101'e aktarıldığı ve JM101 hücrelerini ana hücreler ile aynı antibiyotiklere karşı dirençli hale getirdiği tespit edildi. JM101 hücrelerinden yeniden izole edilen plazmit DNA'sı ile *bla*_{TEM} geni için yapılan PCR sonucunda ise pozitif sonuçlar tekrardan elde edildi.

tet(A) geni pozitif olarak tespit edilen *Edwardsiella* sp., RÇ41b ve *Enterobacter* sp. RÇ 54a suşlarından izole edilen plazmitlerintetrasiklin direnci ve tet(A) genini *E. coli* JM101 hücrelerine kazandırdığı tespit edilmiştir. tet(B) geni pozitif olan sekiz izolatda ise aynı şekilde tetrasiklin direncinin ve tet(B) geninin plazmit aracılığı ile JM101 hücrelerine aktarıldığı belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 5'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 5. Çayın işlenme aşamalarından izole edilen enterik bakterilerin genotipik, fenotipik ve aktarılabılır direnç profilleri

Suş	Tür	Direnç fenotipi ^a	tetgeni	<i>bla</i> _{TEM} geni	Transfer edilebilen direnç fenotipi
RÇ 41b	<i>Edwardsiella</i> sp.	TE	<i>tet</i> (A)	-	TE
RÇ 52d	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, TE	<i>tet</i> (B)	-	AMP, TE
RÇ 54a	<i>Enterobacter</i> sp.	TE	<i>tet</i> (A)	-	TE
RÇ 63j	Tiplendirilemeyen	AMP, TE, S	<i>tet</i> (B)	+	AMP, TE, S
RÇ 79c	<i>Enterobacter</i> sp.	AMP, TE	<i>tet</i> (B)	-	AMP, TE
RÇ 95f	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, TE	<i>tet</i> (B)	-	AMP, TE
RÇ 102a	<i>E. coli</i>	AMP, TE, CAZ, S, SXT	<i>tet</i> (B)	+	AMP, TE, CAZ, S, SXT
RÇ 111c	<i>Enterobacter</i> sp.	TE	<i>tet</i> (B)	-	TE
RÇ 122a	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CAZ, TE	<i>tet</i> (B)	-	AMP, CAZ, TE
RÇ 146e	Tiplendirilemeyen	AMP, TE, CAZ, SXT	<i>tet</i> (B)	-	AMP, TE, CAZ, SXT

^a: AMP: ampicilin, CAZ: seftazidim, TE: tetrasiklin, S: streptomisin, SXT: trimethoprim/sülfametaksazol

IV. TARTIŞMA

Çay ülkemizde yaygın olarak tüketilen bir içecektir. Kişi başı yıllık siyah çay tüketimi 2 kg'ın üzerindedir. Türkiye'de çay hasadı Mayıs ve Ekim ayları arasında yapılmakta ve bu süre içinde genellikle 3 sürgün dönemi bulunmaktadır [13].

Enterobacteriaceae familyası içerisindeki bakteri türlerinin bitki, böcek, hayvan ve insanlar olmak üzere çok geniş konak alanları vardır. Bu familyaya ait türlerden bir kısmı insan ve hayvanların normal bağırsak florasında bulunur [14]. Bu familya üyesi bakteriler sadece patojen veya bağırsak florasında bulunan bakteriler değildir. Aynı zamanda bunlar hemen hemen her nemli ortamda, özellikle toprakda, suda ve ev ortamlarında oldukça bol bulunurlar [15]. Yapılan çalışmalarda yaprak halindeki çayda doğadan veya çevresindeki temas eden canlılardan kaynaklanabilecek bir enterik bakteri topluluğunun bulunduğu, ancak yaş çayın işlenmesi sırasındaki aşamalardan biri olan soldurma gibi işlemler sonucunda su aktivitesine bağlı olarak bu bakteri topluluğunun azaldığı, mamul çay olan fırın (99 °C'de 20-25 dakika) çıkışında ise psikofil veya mezofil mikroorganizmaların tümünün yok olduğu gözlenmiştir [16]. Yapılan bu çalışmada tarladan gelen çayda yüksek oranda enterik bakteri gözlenirken, 6. istasyon olan fermentasyon girişi basamağından sonra belirgin bir azalma olduğu gözlenmektedir. Bu azalmanın fermentasyon sırasında laktik asit bakteri veya maya florasının artması, ortamda şeker konsantrasyonunun azalması ya da tükenmesi ve ortaya çıkan çeşitli inhibitör (besin kıtlığı, düşük pH, antimikrobiyal maddeler vb.) etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Chorianopoulos ve ark. [17] zeytinde yaptıkları çalışmada fermentasyonun 5. gününden itibaren *Enterobacteriaceae* sayısının azaldığını ve pH'nın da 6,5 den 4,5'e düştüğünü bildirmektedir. Bu çalışmada, yaş çayın mamul kuru çay olarak alınmasındaki son aşamalar olan fırın girişi ve fırın çıkışı aşamalarında ise enterik bakteri sayısı sıfır olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç çayın fırınlamadan sonra sağlıklı koşullarda paketlenip depolandığı taktirde patojen yada saprofit mikroorganizma içermediğini göstermektedir.

Beta-laktamlar hücre duvar sentezini çeşitli aşamalarda inhibe ederek etkili olan antibiyotik grubudur. Dünya çapında tüketilen antibiyotiklerin %50'sinden fazlasını β -laktam grubu antibiyotikler oluşturmaktadır [18]. Çalışmada izole edilen suşlarda beta-laktam antibiyotiklerinden ampicilin ve seftazidim direnci taranmıştır. Ampisiline karşı yüksek bir (% 81,73) direnç tespit edilmiş ve seftazidim de direnç oranı olarak (% 13,5) ikinci sırada yer almıştır. Yapılan birçok çalışma klinikte oldukça sıklıkla kullanılan beta-laktam antibiyotiklerine karşı yüksek oranda direncin birçok çevreden izole edilen enterik bakterilerde bulunduğunu

göstermiştir [19, 20, 21, 22]. Bu grup antibiyotiklere karşı oluşan direnç genellikle transfer edilebilir direnç plazmitleri (R-plazmit) üzerinde bulunmakta ve bu da direncin aynı tür veya farklı tür mikroorganizmalar arasında hızlıca yayılmasına sebep olmaktadır [23].

Çalışmada ampicilin dirençli 255 suşun 159'u *Klebsiella* ve *Enterobacter* cinslerine ait olduğu tespit edilmiş ve bu cinslerde TEM-tipi beta laktamaz geni araştırılmamıştır. *Enterobacter* ve *Serratia* türleri genellikle indüklenebilir AmpC tip kromozomal β -laktamazlar üretirler. Düşük miktarda üretilen bu enzim, bakteri β -laktam antibiyotiklerle karşılaştığında bol miktarda üretilir. Bu yüzden ampisiline her zaman dirençlidirler. *Klebsiella* türleri ise A sınıfı kromozomal β -laktamaz üretirler. Bu yüzden ampisiline doğal olarak dirençlidirler [24]. Çalışmada, geriye kalan 96 ampicilin dirençli suş TEM-tipi β -laktamaz geni (*bla_{TEM}*) varlığı tarafından taranmıştır. Yapılan çalışma sonucunda iki suşun *bla_{TEM}* geni bakımından pozitif olduğu tespit edilmiştir. Beta laktamaz enzimleri kromozomal ve plazmit aracılı olabilirler. Enterik bakterilerde plazmit orijinli β -laktamazlar sıklıkla bulunmakla beraber en sık olanı TEM tipi β -laktamazlardan TEM-1 olduğu rapor edilmektedir [25, 26].

Çalışmada ampicilin ve seftazidim direncinden sonra en yüksek direnç % 7,8 oranı ile tetrasiklin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı gözlemlenmiştir. Tetrasiklin grubu antibiyotikler insan enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmasının yanı sıra hayvancılık ve ziraatçılıkta da oldukça fazla kullanılan antibiyotiklerin başında gelmektedirler. Tetrasiklinler dünya antibiyotik üretiminin %3'lük bir kısmını oluşturmaktadırlar. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde en az 15 farklı tetrasikline direnç sağlayan gen bulunduğu ve bu genlerin plazmit, transpozon veya kromozomal kaynaklı olabileceği gösterilmiştir [15, 20, 27]. Çalışmada tetrasiklin dirençli 24 izolattet(A), tet(B) ve tet(C) genlerinin varlığı açısından incelenmiş ve tet(B) geninin izolatlar arasında yaygın olduğu tespit edilmiştir. İzolatların 8'i tet(B) geni içerdiği, 2'sinin ise tet(A) geni içerdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; bahçeden gelen çayın florasında yoğun bir bakteri popülasyonu olduğu, bu bakterilerin klinikte kullanılan antibiyotiklere karşı oldukça yüksek oranda dirençli olmaları önemli bulunmuştur. Çevre orijinli mikroorganizmalarda antibiyotik direncinin azımsanamaz durumda olması halk sağlığı açısından irdelenmesi gereken bir konu olduğu düşünülmektedir. Ancak işleme aşamalarında bu popülasyonun azaldığı, ürün çayda ise fırınlamadan dolayı hiç kalmadığı gözlemlenmiştir. Halk sağlığı açısından bakıldığında hijyenik koşullarda saklanan ve depolanan ürün çayın insan sağlığını tehlikeye atacak herhangi bir mikroorganizma içermediği tespit edilmiştir.

TEŞEKÜRLER

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: RTEÜ-2010.102.03.1).

KAYNAKLAR

- [1] Silva, C.F., Schwan, R.F., Dias, E.S. ve Wheals, A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 251–260.
- [2] Madigan, M., Martinko, J. ve Dunlap, P. (2009). Brock Biology of Microorganisms, 12 th.Edition, New York.
- [3] Bashan, Y. ve de-Bashan, L.E. (2005). Plant growth-promoting. In: Hillel, D. (Ed.), Encyclopedia of Soils in the Environment, vol. 1. Elsevier, Oxford, U.K., pp. 103–115.
- [4] Claus, M. (1992). A standardized gram staining procedure. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 451–452.
- [5] Prescott, M. ve Harley, J.P. (2001). Laboratory Exercises in Microbiology, McGraw-Hill | Fifth edition, 449-451.
- [6] Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. ve Williams, S. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- [7] CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Approved standard M45-A. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. CLSI., Wayne, Pennsylvania, USA.
- [8] Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T. (1990). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- [9] Arlet, G. ve Philippon, A. (1991). Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable β -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiology Letter*, 82, 19-26.
- [10] Arlet, G., Brami, G., Décrè, D., Flippo, A., Gaillet, O., LAGRANGE, P.H. ve Philippon, A. (1995). Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM β -lactamases. *FEMS Microbiology Letter*, 134, 203-208.
- [11] Aarestrup, F.M., Lertworapreecha, M. ve Evans, M.C. (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 715–8.
- [12] Ausubel, F.M., Brient, R. ve Kingston, R.E. (1995). Short Protocols in Molecular Biology. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons.
- [13] Özdemir, F., Topuz, A. ve Erbağ, M. (1999). Ortodoks ve çay-kuryöntemleri ile üretilen farklı sınıfı yahçayların mineral içerikleri. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 809-815.
- [14] Bilgehan, H. (2000). Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 10. baskı, Barış Yayınları, İzmir.
- [15] Scott, E., Bloomfield, S. F. ve Barlow, C. G. (1982). An investigation of microbial contamination in the home. *Journal of Hygiene*, 89, 279–93.
- [16] Mo, H., Yang, Z. ve Zongmao, C. (2007). Microbial fermented tea a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 124-130.
- [17] Chorianopoulos, N.G., Boziaris, I.S., Stamatiou, A. ve Nychas, G.J.E. (2005). Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. *Food Microbiology*, 22, 117–124.
- [18] Nijjens, S., Florjin, A., Bonten, m.J., Schmitz, F.J., Verhoef, J. Ve Fluit, A.C. (2004). Beta lactam susceptibilities and prevalence ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 585-591.
- [19] Alpay-Karaoglu, S., Ozgumus, O.B., Sevim, E., Kolaylı, F., Sevim, A. ve Yesilgil, P. (2007). Investigation of antibiotic resistance profile and TEM-type β -lactamase gene carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from drinking water. *Annals of Microbiology*, 57, 281-288.
- [20] Ozgumus, O.B., Celik-Sevim, E., Alpay-Karaoglu, S., Sandalli, C. ve Sevim, A. (2007). Molecular Characterization of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Tap and Spring Waters in a Coastal Region in Turkey. *The Journal of Microbiology*, 45, 379-387.
- [21] Ozgumus, O.B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E. ve Sivri, N. (2009). Class 1 and Class 2 Integrons and Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in Coliforms Isolated from Ten Rivers in Northern Turkey. *The Journal of Microbiology*, 47, 1- 10.
- [22] Çolakoğlu, F., Özgümüş, O.B., Sandalli, C., Çelik-Sevim, E. ve Alpay- Karaoğlu, Ş. (2010). Deniz suyu kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 Integron gen kasetleri ve antibiyotik direncinin karakterizasyonu. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 40, 97 – 108.
- [23] Nwosu, V.C. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research Microbiology*, 152, 421-430.
- [24] Livermore, D.M. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*, 8, 557-84.
- [25] Bush, K. ve Jacoby, G.A. (1997). Nomenclature of TEM β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 1-3.
- [26] Roe, M.T., Vega, E. ve Pillai, S.D. (2003). Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 822-6.
- [27] Chopra, I. ve Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 65, 232–60.