

Atf İçin: Kahraman Ilıkkan, Ö. (2023). Laktik Asit Bakterilerinde Tetrasiklin Direncinin Fenotipik ve Tüm Genom Dizilerinde in silico Genotipik Olarak Araştırılması. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(2), 932-940.

To Cite: Kahraman Ilıkkan, Ö. (2023). Investigation of Tetracycline Resistance of Lactic Acid Bacteria by in silico Genotypically in Whole Genome Sequences and Phenotypically. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(2), 932-940.

Laktik Asit Bakterilerinde Tetrasiklin Direncinin Fenotipik ve Tüm Genom Dizilerinde in silico Genotipik Olarak Araştırılması

Özge KAHRAMAN ILIKKAN^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Laktik asit bakterilerinde tetrasiklin dirençliliği
- Lastik asit bakterilerinde tet Atat O dirençlilik genleri aranması
- Laktik asit bakterilerinde antibiyotik dirençliliği

Anahtar Kelimeler:

- Tetrasiklin direnci
- Laktik asit bakterisi
- Tüm genom sekansı
- MFS dışı atım pompası
- tetO geni

ÖZET:

Laktik asit bakterileri, endüstride starter kültür veya probiyotik olarak kullanılmaktadırlar. European Food Safety Authority (EFSA) tarafından 2021 yılında yayımlanan raporda gıdalarda kullanılacak bakterilerin tüm genom dizileri üzerinden risk değerlendirmesi yapılması gerekliliği vurgulanmıştır. Bu nedenle, laktik asit bakterilerinde dirençlilik geni araştırmaları önem kazanmıştır. Çünkü antibiyotik direnç genlerinin bağırsak sisteminde bulunan patojen bakterilere aktarılma olasılığı vardır ya da laktik asit bakterilerini barındıran gıdalar aracılığıyla alınmaları olasıdır. Bu nedenle, çalışmada, farklı fermente gıdalardan izole edilen dört laktik asit bakterisi (*Lentilactobacillus buchneri* Egmn17, *Levilactobacillus brevis* Atlas17, *Levilactobacillus namurensis* Ozge01, *Lactiplantibacillus plantarum* Gmze16) ve probiyotik bir bakteri olan *Lactiplantibacillus plantarum* 299v suşu kullanılmıştır. Çalışmada, laktik asit bakterileri arasında en yaygın antibiyotik dirençliliği gözlenen tetrasiklin seçilmiştir. 3 bakterinin tetrasiklin antibiyotiğine orta derecede dirençli (zon çapı 15-18 mm) (299v, Gmze16 ve Egmn17) ve 2 bakterinin duyarlı (zon çapı >19 mm) (Atlas17 ve Ozge01) olduğu belirlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin tüm genom sekanslarının incelenmesi sonucu, orta dirençli bakterilerin tetrasikline bağlı antimikrobiyal direnç (AMR) genlerinden *tetA* (MFS dışı atım pompası) ve *tetO*'ya (ribozomal koruma proteini) sahip oldukları görülmüştür. *Levilactobacillus brevis* Atlas17'de ise TetA proteini mevcutken 322. aminoasit sekansında M → T değişimi gözlenmiştir. Ayrıca probiyotik bakteri olan *Lactiplantibacillus plantarum* 299v'nin direnç genlerine sahip olması bu genlerin bağırsaktaki patojenlere aktarılma riskini de arttırmaktadır. *tetA* genine sahip olduğu gözlenen *Levilactobacillus brevis* Atlas17 gibi fenotipi duyarlı olan türler de sessiz dirençlilik genlerine sahip olduklarında bunu diğer bakterilere aktarabilmeleri olasıdır. Bu nedenle genotip ve fenotip birlikte incelenmesi önemlidir.

Investigation of Tetracycline Resistance of Lactic Acid Bacteria by in silico Genotypically in Whole Genome Sequences and Phenotypically

Highlights:

- Tetracycline resistance in lactic acid bacteria was investigated
- Search for in silico tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria
- tetA* and *tetO* resistance genes were found in lactic acid bacteria

Keywords:

- Tetracycline resistance
- Lactic acid bacteria
- Whole genome sequence
- MFS efflux pump
- tetO* gene

ABSTRACT:

Lactic acid bacteria are used in industry as starter cultures or probiotics. In the report published by the European Food Safety Authority in 2021, it was emphasized that risk assessment should be carried out on the whole genome sequences of bacteria to be used in foods. Therefore, resistance gene research in lactic acid bacteria has gained importance. Because antibiotic resistance genes are likely to be transmitted to pathogenic bacteria in the intestinal tract or are likely to be ingested through foods containing lactic acid bacteria. Therefore, in this study, four lactic acid bacteria (*Lentilactobacillus buchneri* Egmn17, *Levilactobacillus brevis* Atlas17, *Levilactobacillus namurensis* Ozge01, *Lactiplantibacillus plantarum* Gmze16) isolated from different fermented foods and *Lactiplantibacillus plantarum*, a probiotic bacterium, were used. In the study, tetracycline, which has the most common antibiotic resistance among lactic acid bacteria, was selected. It was determined that 3 bacteria were moderately resistant (zone diameter 15-18 mm) (299v, Gmze16 and Egmn17) to tetracycline antibiotic and 2 bacteria were susceptible (zone diameter >19 mm) (Atlas17 and Ozge01). As a result of examining the whole genome sequences of lactic acid bacteria, it was seen that intermediate resistant bacteria have tetracycline-dependent antimicrobial resistance (AMR) genes *tetA* (MFS efflux pump) and *tetO* (ribosomal protection protein). In *Levilactobacillus brevis* Atlas17, while TetA protein was present, M→T change was observed in the 322nd amino acid sequence. In addition, the fact that the probiotic bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* 299v has resistance genes also increases the risk of transferring these genes to pathogens in the intestine. Species that are susceptible to the phenotype, such as *Levilactobacillus brevis* Atlas17, which has been observed to have the *tetA* gene, are also likely to be able to pass it on to other bacteria when they have silent resistance genes. Therefore, it is important to examine genotype and phenotype together.

¹Özge KAHRAMAN ILIKKAN (Orcid ID: 0000-0001-5843-6868), Başkent Üniversitesi, Kahramankazan Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Ankara, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Özge KAHRAMAN ILIKKAN, e-mail: okilikkan@baskent.edu.tr

GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), glikozu homofermentatif ve heterofermentatif olarak katabolize eden ve insan ve hayvanların gastrointestinal (GI) sistemleri ve gıdalar gibi geniş bir ekolojik aralıkta doğal olarak bulunan türlerdir. Bu grubun önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ve *Weisella* bulunmaktadır (Rezac vd., 2018). LAB uzun süredir ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından “Genel olarak güvenli (GRAS)” statüsüne sahiptir (Dec vd., 2018; Narvhus ve Axelsson, 2003; Yörük, Gamze Nuray; Güner, 2010). Ancak, EFSA (European Food Safety Authority) tarafından 2021 yılında yayımlanan raporda artık gıdalarda kullanılacak bakterilerin tüm genom dizileri üzerinden risk değerlendirmesi yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (EFSA, 2021). 2018 yılında ise, tüm genom dizileme dahil omiks teknolojilerin bu risk değerlendirmesi için kullanımına ilişkin bir rapor yayımlamıştır (EFSA vd., 2018). Fermente gıdalar tüketildiğinde insan vücuduna çok miktarda canlı bakteri girer. Bu durumda, bu bakteriler eğer mevcutsa antibiyotik direncini patojenik bakterilere aktarabilir. Son 10 yılda, gıda ve yem uygulamalarında LAB kültürlerinin güvenli kullanımına ilgi artmaktadır. Bu ilginin nedeni LAB' nin antibiyotiğe direnç genleri üzerine yapılan önemli çalışmalardır. Tüm dünyada antibiyotik direncindeki tehlikeli artış, yaygın enfeksiyonların tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle LAB' nin direnç genlerini barındırması ve iletmesi önemlidir (Sirichoat vd., 2020). LAB, diğer direnç genlerine sahip bakterilerden yatay gen transfer mekanizması ile direnç genlerini alarak çevreye uyum sağlamaktadır (Colautti vd., 2022). Ancak, LAB sadece direnç genlerinin yatay gen transferi ile aktarılmasıyla değil de novo mutasyonlar yoluyla da dirençli hale gelebilmektedir. Ayrıca, yeni direnç mekanizmaları ortaya çıkmakta ve yayılmaktadır (Dec vd., 2018). Bu durum antibiyotiklerin yem, tarım ve veterinerlik uygulamalarında yanlış ve aşırı kullanımı nedeniyle daha da zararlı hale gelmiştir. Fermente süt ürünlerinin bu döngüde hayvansal ürünlerden elde edildiği ve insanlar tarafından tüketildiği düşünüldüğünde bunun önemli bir konu olduğu ortaya çıkmaktadır. Fermente ürünlerden elde edilen LAB' nin starter kültür olarak kullanılabilmesi için belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özelliklerden biri de antibiyotiklere karşı direnç genlerinin gelişmiş olmasıdır. Ancak çalışmaların çoğu, LAB' nin birçok antibiyotik direnç geni (ARG) barındırdığını ve linkomisin, tetrasiklin, meropenem, ampisilin, gentamisin, eritromisin, siprofloksasin, kloramfenikol ve vankomisin gibi antibiyotiklere karşı direnç oluşturabileceğini göstermiştir (Ma vd., 2021). ARG'lerin araştırılması, potansiyel yayılma riskini ortaya çıkarmak için önemlidir. Yapılan çalışmalar, tetrasiklin direnç genlerinin fermente süt ve sosislerde LAB arasında yayıldığını göstermiştir (Samtiya vd., 2022). Bu sebeple, Danimarka, Norveç, İsveç, Hollanda, Amerika ve Kanada gibi ülkeler antibiyotik dirençlilik araştırma raporları yayınlamıştır (CDC, 2019; Høg vd., 2021; PHAC, 2021; WHO, 2022). Özellikle starter kültürleri ve probiyotikler antibiyotik direnç genleri açısından değerlendirilmelidir. Son zamanlarda, yüksek verimli dizileme teknikleri ve omiks teknolojileri, antibiyotik direncine olan ilgiyi artırmıştır ve bu yöntemlerle fenotipik ve genotipik dirençliliğin birlikte incelenmesi gerektiği vurgulanmıştır (Nunziata vd., 2022). Çünkü fenotip olarak duyarlı bulunan bir türün tetrasiklin direncine genellikle dışa atım (efflux) pompası, enzimatik veya ribozomal koruma aracılık eder (Chopra ve Roberts, 2001; Thaker vd., 2010; Villedieu vd., 2003). Tetrasiklin direnci, bu mekanizmalarla ilişkili 63 genden oluşur, yani, 36 gen dışa atım (efflux) pompası, 13 gen ribozomal korumayla, 13 gen enzimatik, 11 gen mozaik ribozomal protein koruması ile ilgilidir ve 1 genin (tetU) rolü de bilinmemektedir (Roberts, 2005; Villedieu vd., 2003; Wang vd., 2022). Dışa atım pompaları aynı zamanda çoklu ilaç direnci (MDR) ile de ilişkilidir. Bu pompalar ilaçları ve toksik maddeleri

hücre dışına pompalayarak ilacın hücreyi etkilemesini engellemektedirler (Catalano vd., 2022). MDR ile ilişkili beş dışa atım pompası süper ailesi vardır: ATP Binding Cassette (ABC), Major Facilitator (MFS), Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE), Resistance- Nodulation - Division (RND) ve Small Multidrug Resistance (SMR) (Pidcock, 2006). Sekonder tip ilaca direnç pompalarından olan “Major Facilitator Superfamily (MFS)” nin tetrasikline karşı oluşan dirençten sorumlu olduğu düşünülmektedir (Kaya ve Sarıbaş, 2012). Pek çok çalışmada çeşitli mutasyonların direnci düşürebildiği bazılarının ise etki etmediği gösterilmiştir. Örneğin, 65. pozisyonda bulunan S → A veya C dönüşümü aktiviteyi etkilemezken, 66. pozisyonda bulunan D → E dönüşümü tetrasikline orta seviyede dirençliliği ortaya çıkarmış, yine 66. pozisyonda bulunan D → N dönüşümü ise tetrasiklinin dışarı atımının engellenmesine neden olmuştur (Shen vd., 2019). 257. pozisyonda bulunan H → D veya H → E dönüşümü H⁺ translokasyonunun olmamasına neden olmuştur (Yamaguchi vd., 1991). Yapılan çalışmalarda pek çok tetrasiklin ile alakalı gen dirençlilik ile ilişkilendirilmiştir. Örneğin bir çalışmada, *tetM*, *tet W/N/W*, *tetL*, *tetS*, *tet45*, *tetW*, *tetO* genlerinin tek başına veya kombinasyonu dirençle ilişkilendirilmiştir (Thumu ve Halami, 2012). Bu nedenlerden dolayı, mevcut çalışmada, farklı fermente gıdalardan izole edilen dört laktik asit bakterisi (*Lentilactobacillus buchneri* Egmn17, *Levilactobacillus brevis* Atlas17, *Levilactobacillus namurensis* Ozge01, *Lactiplantibacillus plantarum* Gmze16) ve bir endüstriyel probiyotik bakterinin (*Lactiplantibacillus plantarum* 299v) tetrasiklin direnç genleri *in silico* olarak taranmış, aminoasit dizileri karşılaştırılmış ve fenotipik olarak tetrasiklin direnci Kirby-Bauer Disk Difüzyon Duyarlılık Testi (30 µg/ml TE) ile belirlenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Bakteri kültürleri

Bu çalışmada dört adet laktik asit bakterisi, probiyotik bir laktik asit bakteri suşu kullanılmıştır. Tetrasiklin dirençlilik çalışmalarında kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 seçilmiştir. Egmn17 ve Atlas17 peynirden, Ozge01 salatalık turşusundan ve Gmze16 Kombucha'dan izole edilmiştir, tüm genom dizilimi ile karakterize edilmiş ve genom verileri NCBI'de depolanmıştır. Sadece probiyotik bakteri suşunun draft genom dizisi NCBI'den indirilmiştir. Kullanılan bakteriler ve NCBI accession kodları şu şekildedir; i) *L. buchneri* Egmn17 (Accession: CP110846), ii) *L. brevis* Atlas17 (Accession: CP110089), iii) *L. namurensis* Ozge01 (Accession: JAPDOC000000000), iv) *L. plantarum* Gmze16 (Accession CP107727), v) *L. plantarum* 299v (NCBI'den indirildi, Erişim numarası: GCA_001888735.1)

Bakteri kültürlerinin hazırlanması ve Kirby-Bauer disk difüzyon duyarlılık testi

Laktik asit bakterileri MRS Broth'ta (Merck, Almanya) geliştirilirken, *S. aureus* ATCC 29213 ise Nutrient Broth'ta (Merck, Almanya) geliştirilmiştir. Bakteriler McFarland 0.5 standardına göre ayarlanmıştır. Laktobasiller için MRS agar (Merck, Almanya) veya *S. aureus* için Plate Count Agar (Merck, Almanya) üzerine 0.1 ml bakteri yayılmıştır. Tetrasiklin antibiyotik diskleri (TE, 30 µg/ml, Bioanalyse, Türkiye) steril forseps ile yerleştirilmiştir. *S. aureus* ATCC 29213 37°C'de, 24 saatte, aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Laktik asit bakterileri ise, 37°C'de, 24 saatte, anaerobik kavanozda inkübe edilmiştir. Değerlendirme “Clinical and Laboratory Standards Institute” M02-A11 dokümanına göre yapılmıştır (R: Dirençli (<19mm), M: Orta dirençli (15-18mm), S: Duyarlı (>19mm)) (Franklin R. Cockerill ve ark., 2012).

Tetrasiklin direnç genlerinin *in silico* olarak taranması

Tüm laktik asit bakterilerinin gen bank dosyaları (*.gb formatında) Galaxy-Europe (<https://usegalaxy.eu/>, erişim tarihi Ocak 2023) web aracında, prokka genom anotasyon aracı ile elde

edilmiş ve Geneious Prime® 2022.2.2 (Biomatters Ltd) programına yüklenerek tetrasiklin dirençliliği ile ilişkili genler belirlenmiştir. Belirlenen genler aynı program ile görüntülenmiştir. Ayrıca antibiyotik dirençlilik araştırması için hazırlanan The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) veri tabanı da gen taraması için değerlendirilmiştir (<https://card.mcmaster.ca/home>, erişim tarihi Ocak 2023).

TetA ve TetO proteinlerinin aminoasit dizileri Geneious Prime® ile elde edilmiş ve MEGAX (v.10.0.5) programında MUSCLE alignment aracı ile hizalanmıştır, hizalanan diziler Geneious Prime® 2022.2.2 programında görüntülenmiştir. Bulunan genlere ait aminoasit dizileri NCBI BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) aracı ile kontrol edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Tetrasiklin direnci ile ilgili istatistiksel analiz JMP Pro 14 programında ANOVA, Tukey HSD yöntemi ile yapılmıştır.

Çizelge 1. Bakterilerin zon çapı (Ortalama \pm SD, n =3). *S. aureus* ATCC 29213 kontrol olarak kullanılmıştır. R: Dirençli (<19mm), M: Orta dirençli (15-18mm), S: Duyarlı (>19mm) (Franklin R. Cockerill ve ark., 2012; Hudzicki, 2016). Birbirinden farklı küçük harfler istatistiksel olarak farkı belirtmektedir (p<0.05).

Bakteriler	Zon çapı (mm)	Duyarlılık
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 299v	16.0 \pm 0.8 ^c	M
<i>Lentilactobacillus buchneri</i> Egmn17	16.5 \pm 0.6 ^c	M
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> Gmze16	13.5 \pm 1.5 ^d	M
<i>Levilactobacillus brevis</i> Atlas17	22.3 \pm 0.6 ^b	S
<i>Levilactobacillus namurensis</i> Ozge01	20.5 \pm 1.0 ^b	S
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	45.3 \pm 0.6 ^a	S

BULGULAR VE TARTIŞMA

In vitro olarak yapılan dirençlilik taramasında probiyotik bakteri de dahil 3 bakteri suşunun orta derecede dirençli olduğu (299v, Egmn17, Gmze16) ve referans bakterisi olan *S. aureus* ile 2 laktik asit bakterisinin de (Atlas17 ve Ozge01) duyarlı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 1). Dirençlilik açısından istatistiki olarak Gmze16 anlamlı şekilde farklı çıkarken, Egmn17 ve 299v dirençlilik bakımından farklı çıkmamıştır (Şekil 1). Tetrasiklin için Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi tarafından verilen dirençlilik değerlendirmesinde cut-off değeri *Salmonella* ve *E. coli* için 8 μ g/ml verilmiştir (EFSA vd., 2021). Laktik asit bakterileri için henüz net olarak tanımlanmasa da EFSA tarafından *L. plantarum* için 32 μ g/ml olarak verilmiştir (EFSA, 2012).

Dirençlilik gen taramasında, orta dirençlilik gözlenen Gmze16 ve 299v'nin bir Major Facilitator Süper Ailesine (MFS) ait "metal-tetracycline/H⁺ antiporter"ı olan dışa atım pompası tetA ve ribozomal koruma proteinini kodlayan tetO genlerine sahip olduğu gözlenirken, Atlas17 ve Egmn17'nin sadece tetA genlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Ozge01'in ise hiçbir tetrasiklin dirençlilik genine sahip olmadığı gözlenmiştir (Şekil 2). Gmze16 ve 299v'nin sahip olduğu TetA proteini NCBI protein blast aracı ile kontrol edildiğinde %100 *L. plantarum* "tetracycline resistance MFS efflux pump" olarak bulunurken, Atlas17 için bu oran %99.75 *L. brevis* "tetracycline resistance MFS efflux pump", Egmen17 için %96.77 *L. buchneri* "tetracycline resistance MFS efflux pump" olarak sonuçlanmıştır. Gmze16 ve 299v'nin sahip olduğu diğer direnç geni olan tetO incelendiğinde blast sonucu %100 eşleşme ile *L. plantarum* "TetM/TetW/TetO/TetS family tetracycline resistance ribosomal protection protein" olarak bulunmuştur. TetO proteini için şimdiye kadar mutasyon

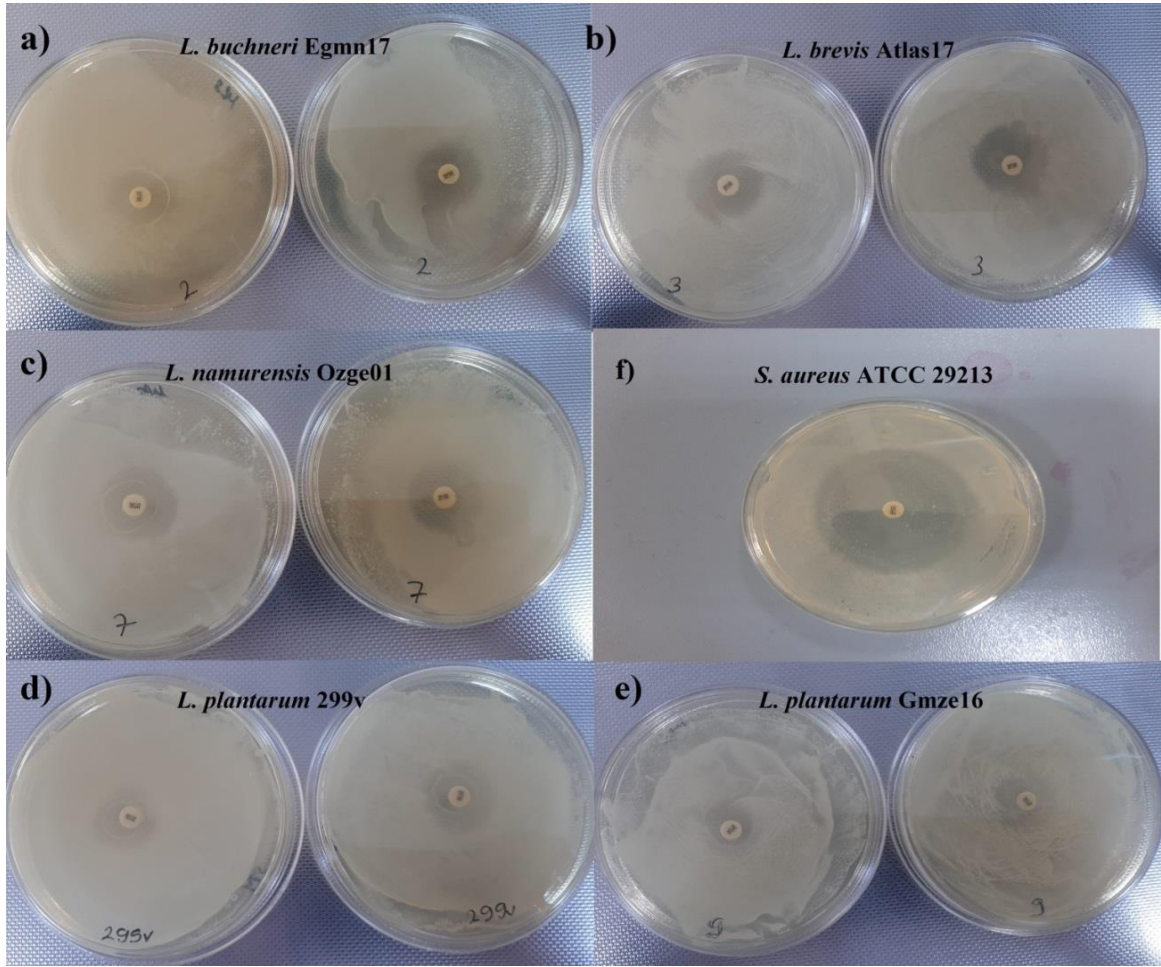
belirtilmemiştir. *tetA* ve *tetO* genlerinin birlikte bulunması dirençliliği arttırmaya katkıları olduğunu düşündürmektedir. Şimdiye kadar *tetA* ve *tetO* genini aynı anda barındıran tetrasiklin dirençli laktik asit bakterileri tanımlanmıştır. Ancak, yapılan bir çalışmada, içme suları biyofilmlerinden izole edilen *E. coli* suşlarında *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* genleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır. Tetrasikline dirençli suşların *tetA*, *tetB* veya bazı suşların bunların her ikisine birden sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, tetrasiklin dirençliliği için en çok rapor edilen belirteçler arasında enerji bağımlı dışa atım sistemleri olarak *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetE* genleri, ribozomal koruma proteinleri ile ilişkili olarak *tetM*, *tetO*, *tetS* genleri bulunmaktadır (Nikodinoska vd., 2023).

Bakterilerin tüm genom sekansları “The Comprehensive Antibiotic Resistance Database” ile tarandığında bakterilerin hiçbirinde herhangi bir dirençlilik genine rastlanmamıştır bunun sebebi veri tabanının patojen bakteriler için hazırlanmış olmasıdır. Bu da bu veri tabanının laktik asit bakterilerinin pek çoğu için uygun olmayabileceğini göstermektedir.

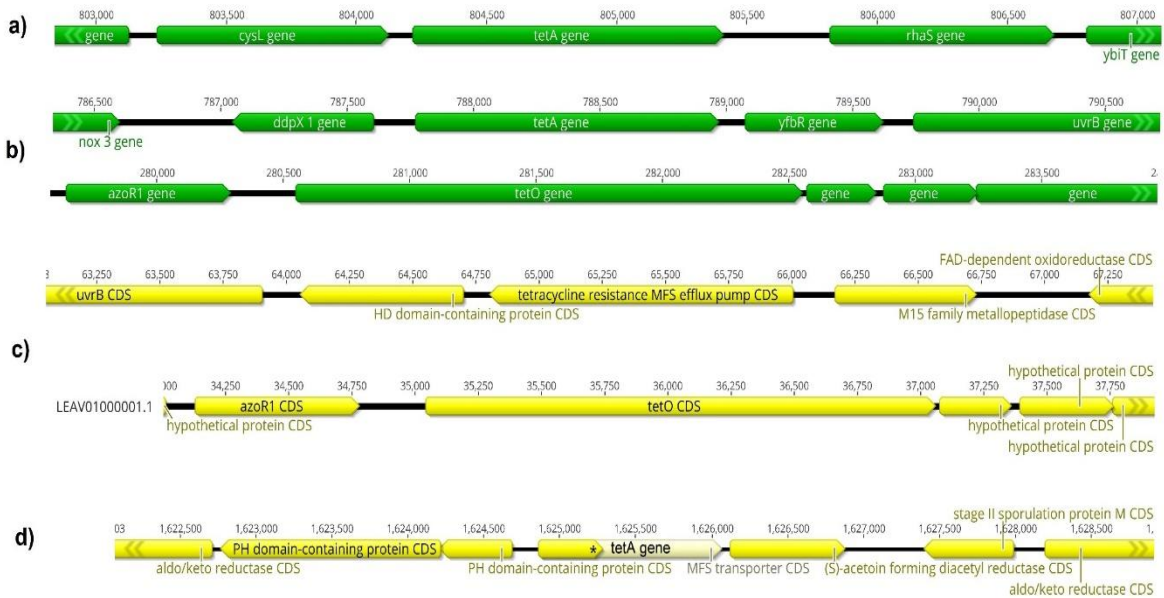
Tetrasiklin direnç proteini TetA, bir metal-tetrasiklin/H⁺ antiporter olarak işlev gören bir tetrasiklin dışa atım proteindir (Sapunaric vd., 2005; Thaker vd., 2010). Bu çalışmada, Gmze16 ve 299v’de TetA yönünden herhangi bir mutasyon görülmezken, Atlas17’de 322. pozisyonda M→T dönüşümü gözlenmiştir. Egmn17’de ise hem boşluklar hem de aminoasit değişimleri gözlenmiştir (Şekil 3). Yapılan diğer çalışmalarda, *tet(M)* ve *tet(K)*’nin bazı *Lactobacillus* sp. suşlarında tetrasikline fenotipik direnç olmasa bile tespit edildiği gösterilmiştir (Das vd., 2020). Bazı çalışmalarda ise, tetrasiklin direnç genleri olmasa bile fenotipik direnç tespit edilmiştir (Ma vd., 2021). Bu da dirençlilik konusunda bizi sadece tetrasiklin ilişkili genlerin rolü olmadığı belki çoklu direnç genleri ile alakalı başka mekanizmaların dirençliliğe yardımcı olabileceği kanısına yönlendirmektedir.

Laktik asit bakterilerinde dirençlilik fenotipe yansımaya bile bu genlerin bağırsak sisteminde bulunan patojen mikroorganizmalara aktarılma olasılığı vardır ve aktarılan genlerin aktarıldığı bakteride fenotipe nasıl yansıyacağı konusunda henüz bilgilerimiz net değildir (Tóth vd., 2021). Yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinden bağırsak sisteminde bulunan enterik bakterilere yatay gen transferi olduğu gösterilmiştir (Reenen ve Dicks, 2011). Bu çalışmada kullanılan bakterilerin fermente ürünlerden elde edildiği düşünüldüğünde gıdalarla beraber dirençlilik genlerinin alınma olasılığı yüksektir. Daha önce laktik asit bakteri, bifidobakteriler ve probiyotikler ile yapılan çalışmalarda beş tetrasiklin dirençlilik geni bulunmuştur bunlar; *tet(M)*, *tet(W/N/W)*, *tet(L)*, *tet(S)* ve *tet(45)* olarak belirtilmiştir (Ma vd., 2021). Yeni nesil sekanslamadan önce yapılan dirençlilik çalışmaları geleneksel PCR yöntemleri ile gerçekleştirildiğinden çalışmalar belirli genler üzerinde yoğunlaşmıştır. Yeni nesil sekanslama yöntemleriyle beraber artık tüm genom taranabildiğinden dirençlilik genleri hakkında bilgimiz daha da artacaktır. Laktobasiller şu anda yaygın olarak probiyotik takviyesi olarak kullanılmaktadır ve seçilen suşların antibiyotik duyarlılığı da dahil olmak üzere çeşitli kriterleri karşılaması gerekmektedir. EFSA’nın tavsiyeleri doğrultusunda, dirençli suşları duyarlı suşlardan ayırt etmek için Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmelidir. EFSA tarafından laktik asit bakterileri ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır ve tür bazında çeşitli değerlendirmeler yapılmaktadır. Ancak, şu ana kadar çalışılan türler çok sınırlıdır.

Laktik Asit Bakterilerinde Tetrasiklin Direncinin Fenotipik ve Tüm Genom Dizilerinde in silico Genotipik Olarak Araştırılması



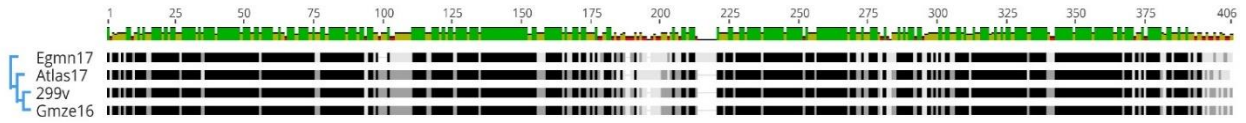
Şekil 1. Laktik asit bakterilerinin tetrasikline direnci, a) *L. buchneri* Egmn17, b) *L. brevis* Atlas17, c) *L. namurensis* Ozge01, d) *L. plantarum* 299v (probiyotik bakteri), e) *L. plantarum* Gmze16 f) *S. aureus* ATCC 29213



Şekil 2. Tetrasiklin dirençliliği ilişkili genlerin genomda yerleşimleri a) *L. brevis* Atlas17 *tetA* (ClassB), b) *L. plantarum* Gmze16 *tetA* ve *tetO* c) *L. plantarum* 299v *tetA* ve *tetO* d) *L. buchneri* Egmn17 *tetA*, *L. namurensis* Ozge01 bakterisinin herhangi bir dirençlilik genine sahip olmadığı görülmüştür

Laktik Asit Bakterilerinde Tetrasiklin Direncinin Fenotipik ve Tüm Genom Dizilerinde in silico Genotipik Olarak Araştırılması

a)



b)



Şekil 3. tetA(a) ve tetO (b) aminoasit sekansı karşılaştırmaları

SONUÇ

Antibiyotik dirençliliği son zamanlarda en çok üzerinde durulan konulardan biridir. Çünkü hem gereksiz antibiyotik kullanımının artışı hem de dirençliliğin bakteriden bakteriye geçme olasılığı antibiyotiklere dirençliliği arttırmıştır. Bu nedenle, son zamanlarda hem gıdalarda hem de starter kültür ve probiyotik özellikteki laktik asit bakterilerinde ve hatta gıdalarda dirençlilik gen arama çalışmaları metagenom ya da tüm genom sekans yaklaşımları ile araştırılmaya başlanmıştır. Araştırmalar artıkça yeni dirençlilik genleri tanımlanmaya ve dirençlilik konusunda yeni bilgiler edinilmeye başlanmıştır. EFSA özellikle son yıllarda yayımladığı raporlarda metabolomik ve tüm genom sekanslama gibi omik teknolojilerle gıdalara entegre edilen bakterilerin antibiyotik dirençliliği ve virulens faktörleri gibi özelliklerinin çalışılması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada gıdalardan izole edilen ve bir de probiyotik özelliğe sahip bir bakterinin tetrasiklin dirençliliği genotipik ve fenotipik olarak ortaya konulmaya çalışılmıştır. *L. plantarum* daha önce çalışılan bir bakteri olsa da *tetA* geni daha önce tanımlanmamıştır. *L. buchneri*, *L. brevis* ve *L. namurensis* ilk defa bu çalışmada kullanılmış ve dirençlilik bakımından değerlendirilmiştir. *L. brevis*' de olduğu gibi direnç genlerinden birine sahip ve fenotipe yansıtmayan türlerin mevcut olması bu direnç genlerinin tüm genom sekanslama yöntemleriyle araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışma Başkent Üniversitesi, Gıda Analiz laboratuvarında yapılmıştır. Yazar, teknik destek için Başkent Üniversitesi'ne teşekkür eder.

Çıkar Çatışması

Yazar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

KAYNAKLAR

- Catalano, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., Scumaci, D., Giuzio, F., Saturnino, C., Sinicropi, M. S. (2022). "Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies". *Molecules*, 1–18.
- CDC. (2019). "Antibiotic Resistance Threats in The United States 2019". Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, 10(1).
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). "Tetracycline Antibiotics: Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance", 65(2), 232–260.
- Colautti, A., Arnoldi, M., Comi, G., Iacumin, L. (2022). "Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli : something to carefully consider". *Food Microbiology*, 103(February 2021), 103934.

- Das, D. J., Shankar, A., Johnson, J. B., Thomas, S. (2020). "Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*". *Nutrition*, 69, 110567.
- Dec, M., Nowaczek, A., St, D., Wawrzykowski, J., Urban-chmiel, R. (2018). "Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys". *BMC Microbiology*, 18(168), 1–15.
- EFSA. (2012). "Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance". *European Food Safety Authority Journal*, 10(6), 1–10.
- EFSA. (2021). "EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain". *European Food Safety Authority journal*, 19(March).
- EFSA, Aguilera, J., Aguilera-gomez, M., Barrucci, F., Cocconcelli, P. S., Davies, H., ... Matthew, C. (2018). "EFSA Scientific Colloquium 24 – ' omics in risk assessment : state of the art and next steps". *European Food Safety Authority Journal*, EN-1512(November), 30.
- EFSA, Amore, G., Beloeil, P.-A., Fierro, R. G., Guerra, B., Papanikolaou, A., ... Stoicescu, A.-V. (2021). "Manual for reporting 2021 antimicrobial resistance data within the framework of Directive 2003 / 99 / EC and Decision 2020 / 1729 / EU European Food Safety Authority (EFSA),". *European Food Safety Authority Journal*, EN-6652(April), 31.
- Franklin R. Cockerill, Wikler, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., ... Hecht, D. W. (2012). "Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests ; Approved Standard — Eleventh Edition". *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32(1).
- Høg, B. B., Sønksen, U. W., Duarte, A. S. R., Müller-Pebody, B., Attaoui, M., Lindegaard, M. (2021). "Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark-Danmap". *National Food Institute, Technical University of Denmark*.
- Kaya, N. M., Sarıbaş, Z. (2012). "Mikobakterilerde Dışa Atım Pompaları ve İlaç Direnci". *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 42(3), 81–84.
- Ma, Q., Pei, Z., Fang, Z., Wang, H., Zhu, J., Lee, Y. K., Chen, W. (2021). "Evaluation of tetracycline resistance and determination of the tentative microbiological cutoff values in lactic acid bacterial species". *Microorganisms*.
- Narvhus, A., Axelsson, L. (2003). "Lactic acid bacteria". *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, (1989), 3465–3472.
- Nikodinoska, I., Heikkinen, J., Moran, C. A. (2023). "Antimicrobial Susceptibility Data for Six Lactic Acid Bacteria Tested against Fifteen Antimicrobials". *Data*, 8(1), 1–7.
- Nunziata, L., Brasca, M., Morandi, S., Silveti, T. (2022). "Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria strains of dairy origin : An update". *Food Microbiology*, 104(February), 103999.
- PHAC. (2021). "Canadian Antimicrobial Resistance Surveillance System Report-2021". *Public Health Agency of Canada*, 1–118. Tarihinde adresinden erişildi <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/canadian-antimicrobial-resistance-surveillance-system-report-2016.html>
- Piddock, L. J. V. (2006). "Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance", 4(August), 629–636.

- Reenen, C. A. Van, Dicks, L. M. T. (2011). "Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review". *Archives of Microbiology*, 193, 157–168.
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., Hutkins, R. (2018). "Fermented foods as a dietary source of live organisms". *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG).
- Roberts, M. C. (2005). "Update on acquired tetracycline resistance genes". *FEMS Microbiology Letters*, 245(2), 195–203.
- Samtiya, M., Matthews, K. R., Dhewa, T., Puniya, A. K. (2022). "Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies". *Foods*, 11(19), 1–20.
- Sapunaric, M., Levy, S. B., Levy, S. B. (2005). "Substitutions in the interdomain loop of the Tn10 TetA efflux transporter alter tetracycline resistance and substrate specificity". *Microbiology*, 151, 2315–2322.
- Shen, Y., Stedtfeld, R. D., Guo, X., Bhalsod, G. D., Jeon, S., Tiedje, J. M., ... Zhang, W. (2019). "Pharmaceutical exposure changed antibiotic resistance genes and bacterial communities in soil-surface- and overhead-irrigated greenhouse lettuce". *Environment International*, 131(June), 105031.
- Sirichoat, A., Flórez, A. B., Vázquez, L., Buppasiri, P., Panya, M., Lulitanond, V., Mayo, B. (2020). "Antibiotic susceptibility profiles of lactic acid bacteria from the human vagina and genetic basis of acquired resistances". *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7).
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G. D. (2010). "The tetracycline resistome". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 419–431.
- Thumu, S. C. R., Halami, P. M. (2012). "Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin", 541–551.
- Tóth, A. G., Csabai, I., Judge, M. F., Maróti, G., Becsei, Á., Spisák, S., Solymosi, N. (2021). "Mobile Antimicrobial Resistance Genes in Probiotics". *Antibiotics*, 10, 1–16.
- Villedieu, A., Diaz-Torres, M. L., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D. A., Wilson, M., Mullany, P. (2003). "Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 878–882.
- Wang, T., Yao, L., Qu, M., Wang, L., Li, F., Tan, Z., ... Jiang, Y. (2022). "Whole genome sequencing and antimicrobial resistance analysis of *Vibrio parahaemolyticus* Vp2015094 carrying an antimicrobial-resistant plasmid". *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30(106), 47–49.
- WHO. (2022). "Antimicrobial resistance surveillance in Europe-2022". World Health Organization.
- Yamaguchi, A., Adachi, K., Akasaka, T., Ono, N., Sawai, T. (1991). "Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon Tn10. Histidine 257 plays an essential role in H⁺ translocation.". *Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6045–6051.
- Yörük, Gamze Nuray; Güner, A. (2010). "Laktik Asit Bakterilerinin Sınıflandırılması ve *Weissella* Türlerinin Gıda Mikrobiyolojisinde Önemi". *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 163–176.