ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-011

FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Melihcan ÖZTEBER

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Melihcan ÖZTEBER tarafından hazırlanan "Fermente Süt Ürünlerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Belirlenmesi" başlıklı tez, 24.01.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı		Kurumu	İmzası
Başkan	: Doç. Dr. H.Halil BIYIK	ADÜ	……
Üye:	:Doç.Dr. Bülent BOZDOĞAN	ADÜ	……
Üye:	:Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR	ADÜ	……

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ……. Sayılı kararıyla …… tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN
Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

…/…/2013

Melihcan ÖZTEBER

ÖZET

FERMENTE SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Melihcan ÖZTEBER
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR
2013,136 sayfa

Laktik asit bakterileri (LAB) fermentatif, fakültatif anaerob, aerotolerant mikroorganizmalardan oluşan geniş bir gruptur. Fermente gıda veya yemlerde doğal kontaminant olarak bulunabilirler ya da starter kültür ve probiyotik olarak eklenerek temel mikrobiyal topluluğu oluştururlar. Bu kommensal bakteriler gıda zinciri yoluyla tüketicilerde antibiyotik direnç belirleyicilerinin yayılması için bir vektör olabilmektedirler. Bu sebeple LAB' de antibiyotik direnciyle ilgili çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Bu çalışmada, Aydın Merkez'de yer alan mandıralardan, marketlerden, halk pazarlarından ve ev yapımı şeklinde alınan fermente süt ürünlerinden 168 adet LAB izole edilmiş ve izolatların antibiyotik dirençlilikleri fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılmıştır. 16S rRNA analizi sonucunda izolatların *Lactobacillus* (% 55,95), *Lactoccocus* (% 15,48), *Enterococcus* (% 11,90), *Streptococcus* (% 10,12), *Leuconostoc* (% 5,35) *ve Pediococcus* (% 1,20) cinslerine dahil oldukları belirlenmiştir. Agar MİK dilüsyon sonuçlarına göre tüm LAB izolatlarında en yüksek direnç linkomisin (% 25,59) antibiyotiğine karşı bulunmuştur. Bu değeri sırasıyla tetrasiklin (% 19,04), meropenem (% 16,66), ampisilin (% 16,16), gentamisin (% 7,14), eritromisin (% 5,35), siprofloksasin (% 5,35), kloramfenikol (% 4,16) ve vankomisin (% 3,06) antibiyotikleri izlemektedir. Teikoplanin antibiyotiğine direnç gözlenmemiştir. Antibiyotik direnç genlerini araştırmak için yapılan PCR denemeleri sonucunda, *erm* (B) (% 4,76), *erm* (C) (%0,59), *tet* (M) (%7,14), *tet* (L) (%2,38), *tet* (K) (%0,59), *aac* (6′)-*aph* (2″) (%5,95) ve *van* (C) (%1,19) genleri bulunmuştur. Tez çalışmamızın sonucunda gıda kökenli bakterilerin bazı antibiyotik direnç genleri açısından rezarvuar oluşturduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Fermente Süt Ürünleri, Laktik Asit Bakterileri, Antibiyotik Direnci, Agar Dilüsyon Yöntemi, PCR.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED DAIRY PRODUCTS BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

Melihcan ÖZTEBER
M.Sc. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR
2013,136 pages

Lactic acid bacteria (LAB) are a large group of fermentative, anaerobe facultative, aerotolerant microorganisms. They represent the fundamental microbial community for a large variety of fermented foods and feed either as natural contaminants or as added starter cultures. These commensal bacteria may function as vectors for the dissemination of antibiotic resistance (AR) determinants via the food chain to the consumer. Because of this, researchs on AR in LAB has gained more attention in recent years. In this study, 168 LAB isolated from fermented dairy products obtained from local markets, bazaar and dairies, also home-made products and AR of isolates evaluated by phenotypic and genotypic methods. As a result of 16S rRNA sequence analysis, isolates were found to be belong to the genus *Lactobacillus* (% 55,95), *Lactoccocus* (% 15,48), *Enterococcus* (% 11,90), *Streptococcus* (% 10,12), *Leuconostoc* (% 5,35) and *Pediococcus* (% 1,20). Among the isolated LAB, the most prevalent AR was against the lincomycin (% 25,59), following with tetracycline (% 19,04), meropenem (% 16,66), ampicillin (% 16,16), gentamicin (% 7,14), erythromycin (% 5,35), cyprofloxacin (% 5,35), chloramphenicol (% 4,16) and vancomycine (% 3,06). None of the isolates showed resistance to teicoplanin. Positive amplicons were obtained for resistance genes *erm* (B) (% 4,76), *erm* (C) (%0,59), *tet* (M) (%7,14), *tet* (L) (%2,38), *tet* (K) (%0,59), *aac* (6′)-*aph* (2″) (%5,95) ve *van* (C) (%1,19) from isolates. As a result of our study, it can be concluded that food borne bacteria may be a reservoir for some antibiotic resistance genes.

Key words: Fermented Dairy Products, Lactic Acid Bacteria, Antibiotic Resistance, Agar Dilution Method, PCR.

ÖNSÖZ

Araştırmanın planlanmasından tezin basımına kadar bütün aşamalarda değerli görüşlerini, yardımlarını ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman her konuda bana vakit ayıran, tezim dışında da her konuda desteğini aldığım, anlayışla ve sabırla hep yanımda olan, saygı duyduğum danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL ÖZDEMİR' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteklerini hiç esirgemeyen, tavsiyelerinden ve olumlu katkılarından sürekli yararlandığım Doç. Dr. H. Halil BIYIK hocama içten teşekkür ederim.

Çalışmamın planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde bilgi ve tecrübelerini paylaşan, çalışmamın daha iyiye gitmesi yönünde yaptığı tüm katkılardan dolayı Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN hocama sonsuz teşekkür ederim.

ADÜ Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Arş. Laboratuvarını kullanmama imkan sunan Prof. Dr. Fevzi BARDAKÇI hocama teşekkürlerimi sunarım.

Mikrobiyolojiyle beni ilk tanıştıran ve danıştığım her konuda sonsuz sabrıyla destek olan Uzm. Dr. Canan GEBİTEKİN (Mudanya Şaziye Rüştü Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Uzmanı) hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Tanıştığım günden beri danıştığım her konuda yardımcı olan ve çalışmamın önemli evrelerinde destek sağlayan Dr. Erman ORYAŞIN' a teşekkür ederim.

Aynı laboratuvar ortamını paylaştığım, çalışmamın her evresinde desteğini hiç esirgemeyen Merve YAVUZ' a, bu yola beraber başladığımız Yasemin SERTEL' e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmamın her evresinde hep yanımda olan Uğur Hüseyin ERCİNS' e, ADÜ-BİLTEM' de gerçekleştirdiğim çalışmalarda gece gündüz yardımlarını esirgemeyen Mehmet ÖZTÜRK' e ve Ömer YILDIZ' a ve çalışmamın son evresinde yardımıma koşan Nizamettin BİNGÖL' e ve Esra DEMİR' e teşekkür ederim.

Her konuda desteğini esirgemeyen, saygı duyduğum ADÜ Fen Bilimleri Enstitü sekreteri Ayfer ERDEN' e, her konuda yanımda olan tüm ADÜ Fen Bilimleri Enstitüsü personeline teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-12032 no.lu proje ile çalışmamızı destekleyen ADÜ BAP Başkanlığı'na ve ayrıca Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak destek olan yakın akrabalarıma ve özellikle halam Gülşen ÖZTEBER' e, yengem Nadire DURMAZ' a sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hiçbir zaman fedakarlığını, sevgisini ve sonsuz emeğini benden esirgemeyen babam Müveddettin DURMAZ' a, annem Melek DURMAZ'a ve canım kardeşim Meltem DURMAZ'a her zaman ne kadar teşekkür etsem azdır.

Sonsuz desteğiyle her zaman hep yanımda olan hayat arkadaşım Nil ORHAN' a hayatım boyunca daha çok teşekkürler etmek umuduyla.

"Her şey mümkün olduğunca basit yapılmalı, ama olması gerekenden daha basit değil" (Albert Einstein).

Çalışmamızın gerekenden daha basit değil ama basit, anlaşılır ve bilime katkı sağlayacak düzeyde gerçekleşmiş olması umuduyla…

Melihcan ÖZTEBER

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI v
ÖZET vii
ABSTRACT ix
ÖNSÖZ xi
SİMGELER DİZİNİ xv
ŞEKİLLER DİZİNİ xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ xix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ 10
3. MATERYAL VE YÖNTEM 22
3.1. Materyal 22
3.1.1. Araştırma Örnekleri 22
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler 24
3.2. Yöntem 28
3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu 28
3.2.1.1. Morfolojik Özellikler 28
3.2.1.2. Biyokimyasal Özellikler 28
3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu 29
3.2.3. Toplam Genomik DNA' nın Kantitatif ve Kalitatif Tayini 30
3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA Yöntemi İle Tanılanması 31
3.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi 32
3.2.5.1. Agar Dilüsyon Yöntemi 32
3.2.5.2. MİK Sonuçlarının Yorumlanması 37
3.2.5.3. Gots' Testi 39

3.2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Genotipik Olarak Belirlenmesi 40

4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 46

4.1. LAB İzolasyonu Sonuçları 46

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması 47

4.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Özellikleri 47

4.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Analiziyle Tanılanması..... 47

4.3. Farklı Cinslere Dahil Laktik Asit Bakterisi İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Antibiyotik Dirençlilikleri..... 57

4.3.1. *Enterococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları..... 59

4.3.2. *Enterococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları 64

4.3.3. *Lactobacillus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları..... 67

4.3.4. *Lactobacillus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları 86

4.3.5. *Lactococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları..... 90

4.3.6. *Lactococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları 97

4.3.7. *Leuconostoc* ve *Pediococcus* Cinslerine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları 101

4.3.8. *Leuconostoc* ve *Pediococcus* Cinslerine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları..... 106

4.3.9. *Streptococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları 107

4.3.10. *Streptococcus* Cinslerine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları 113

4.4. Gots' Testi Sonuçları..... 118

4.5. İzolasyon Kaynaklarına Göre LAB'nin Antibiyotik Direnç Yüzdeleri..... 122

5. SONUÇ 124

KAYNAKLAR..... 127

ÖZGEÇMİŞ..... 135

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
AR	Antibiyotik Resistance
AD	Antibiyotik Direnci
bp	Base pair
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAT	Kloramfenikol asetiltransferaz
CFU	Colony-Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
D.D.	Doğal Dirençli
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
EDTA	Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
EFSA	European Food Safety Authority
EMP	Embden Meyerhoff Parnas
FDA	Food and Drug Administration
FEEDAP	EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GC	Guanin-Sitozin
GRAS	Generally Regarded As Safe
GIS	Gastrointestinal Sistem
HMP	Hekzozmonofosfat
kb	Kilobase
LAB	Laktik Asit Bakterisi
LSM	LAB susceptibility test medium
MBK	Minimum Bakterisid Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
mL	Mililitre
MLS	Makrolidler, Linkozamidler, Streptograminler

mM	Milimolar
MRS	DE MAN, ROGOSA and SHARPE
NaCI	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Power of Hydrogen
pMol	Pikomol
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimofik DNA
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SCAN	Scientific Committe on Animal Nutrition
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
tRNA	Transfer ribonucleic acid
U	Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Etki mekanizmalarına göre antibiyotikler 2

Şekil 1.2. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara olası transferi 9

Şekil 3.1. Seyreltme serileri 34

Şekil 3.2. Antibiyotikli Besiyerlerinin Hazırlanışı 35

Şekil 3.3. Multipoint inokülatörün inokülatör başlıkları 36

Şekil 3.4. Otomatik Multipoint İnokülatör 36

Şekil 3.5. İndikatör bakteri süspansiyonlarının steril eküvyon ile yayılması 39

Şekil 4.1. İzolatların elde edildiği kaynaklar 46

Şekil 4.2. İzolatların türlere göre yüzde dağılımı 55

Şekil 4.3. *E. faecium* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı 63

Şekil 4.4. GLM 132 izolatında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü 64

Şekil 4.5. GLM 183 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü 64

Şekil 4.6. GLM 129 ve GLM 157 izolatlarında saptanan *van* (C) geninin jel görüntüsü 65

Şekil 4.7. *Lb. casei* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı 84

Şekil 4.8. *Lb.delbrueckii* subsp. bulgaricus suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı 85

Şekil 4.9. GLM 77 izolatında saptanan *erm* (B) geninin jel görüntüsü 86

Şekil 4.10. GLM 185 izolatında saptanan *tet* (L) geninin jel görüntüsü 86

Şekil 4.11. GLM 77 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü 87

Şekil 4.12. GLM 209 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü 87

Şekil 4.13. *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı 96

Şekil 4.14. GLM 112 ve GLM 152 izolatlarında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü 97

Şekil 4.15. GLM 61 izolatında saptanan *erm* (C) geninin jel görüntüsü 98

Şekil 4.16. GLM 61 izolatında saptanan *tet* (K) geninin jel görüntüsü 98

Şekil 4.17. GLM 159 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü 99

Şekil 4.18.*Leuco.mesenteroides* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı .105

Şekil 4.19. *S. macedonicus* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı 112

Şekil 4.20. GLM 146 ve GLM 151 izolatlarında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü 113

Şekil 4.21. GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü 113

Şekil 4.22. GLM 146 ve GLM 151 izolatlarında saptanan *erm* (B) geninin jel görüntüsü 114

Şekil 4.23. GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *erm* (B) geninin jel görüntüsü.....114

Şekil 4.24. GLM 151 izolatında saptanan *tet* (L) geninin jel görüntüsü 115

Şekil 4.25. GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *tet* (L) geninin jel görüntüsü 115

Şekil 4.26. GLM 116 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü 116

Şekil 4.27. GLM 146, GLM 151, GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü 116

Şekil 4.28. Linkomazid inaktivasyonu için yapılan Gots' testi sonuçları 121

Şekil 4.29. Klindamisine karşı inaktivasyon yoluyla direnç gözlenen izolatlara örnek.....121

Şekil 4.30. Mandıra örneklerinden izole edilen LAB' nin direnç dağılımları.....122

Şekil 4.31. Market örneklerinden izole edilen LAB' nin direnç dağılımları.....123

Şekil 4.32. Halk pazarı ve ev yapımı örneklerinden izole edilen LAB' nin direnç dağılımları 123

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Antibiyotik Grupları ve Etki Mekanizmaları 3

Çizelge 2.1. Bazı fermente ürünlerde bulunan LAB 10

Çizelge 2.2 LAB' nde rastlanan direç genleri 15

Çizelge 3.1. Fermente süt ürünleri ve alındıkları yerler 22

Çizelge 3.2. 16S rRNA genini çoğaltmak için hazırlanan PCR Karışımı 31

Çizelge 3.3. Antimikrobiyal ajanların çözücüleri ve sulandırıcıları 33

Çizelge 3.4. European Commission 2003 antibiyotik sınır değerleri 38

Çizelge 3.5. EFSA 2008 antibiyotik sınır değerleri 38

Çizelge 3.6. Antibiyotik direnç primerleri, amplikon uzunlukları ve PCR koşulları 41

Çizelge 3.7. Antibiyotik direnç genleri için kullanılan PCR karışımı 45

Çizelge 3.8. Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteriler ve taşıdıkları direnç genleri 45

Çizelge 4.1. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları 48

Çizelge 4.2. *Enterococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları 60

Çizelge 4.3. *Enterococcus* cinsleri için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi 62

Çizelge 4.4. *Enterococcus* izolatlarında saptanan direnç genleri 65

Çizelge 4.5. *Lactobacillus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları 68

Çizelge 4.6. *Lactobacillus* cinsleri için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ değerleri dirençli izolat sayısı ve yüzdesi 83

Çizelge 4.7. *Lactobacillus* izolatlarında saptanan direnç genleri 88

Çizelge 4.8. *Lactococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları 91

Çizelge 4.9. *Lactococcus* cinsleri için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ değerleri 95

Çizelge 4.10. *Lactococcus* izolatlarında saptanan direnç genleri 99

Çizelge 4.11. *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.....102

Çizelge 4.12. *Leuconostoc* cinsi için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.....104

Çizelge 4.13. *Streptococcus* cinslerine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.....108

Çizelge 4.14. *Streptococcus* cinsleri için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.....111

Çizelge 4.15. *Streptococcus* izolatlarında saptanan direnç genleri.....117

Çizelge 4.16. Linkozamid inaktivasyonu belirlenen örnekler.....119

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri gelişme ortamlarında fermentasyonun başlıca ürünü olarak laktik asit üreten, Gram pozitif bakterilerden oluşan bir gruptur (Mathur ve Singh, 2005). Düşük GC içeren taksonun tipik üyeleri Gram pozitif, katalaz negatif bakteriler, örneğin: *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsleridir (Toomey vd., 2010).

Laktik asit bakterileri, glikozu homofermentatif ve heterofermentatif olmak üzere iki şekilde katabolize eder. Bu fermentatif durum laktik asit bakterilerinin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır.

1. Homofermentatif Laktik Asit Bakterileri: Glikozu EMP (Embden Meyerhoff Parnas) yolunu kullanarak parçalamaları sonucu, % 90 laktik asit, % 10 CO_2 oluşturan bakterilerdir.

2. Heterofermentatif Laktik Asit Bakterileri: Glikozu HMP (Hekzozmonofosfat) yoluyla parçalayarak laktik asit yanında etanol, asetik asit ve CO_2 gibi yan ürünler oluştururlar. Laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan laktik asitin miktarı türlere göre degişmektedir (Eren vd., 2011).

Laktik asit bakterileri, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından uzun zaman önce GRAS (generally regarded as safe) yani "güvenli olarak kabul edilen" statüsüne alınmışlardır. Bununla birlikte son on yıl içerisinde, gıda ve yem uygulamalarında LAB kültürlerinin güvenli kullanımına ilişkin artan bir ilgi söz konusudur. Bu ilginin sebebi, laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç genleri açısından rezervuar olarak rol oynamalarıdır (Mathur ve Singh, 2005).

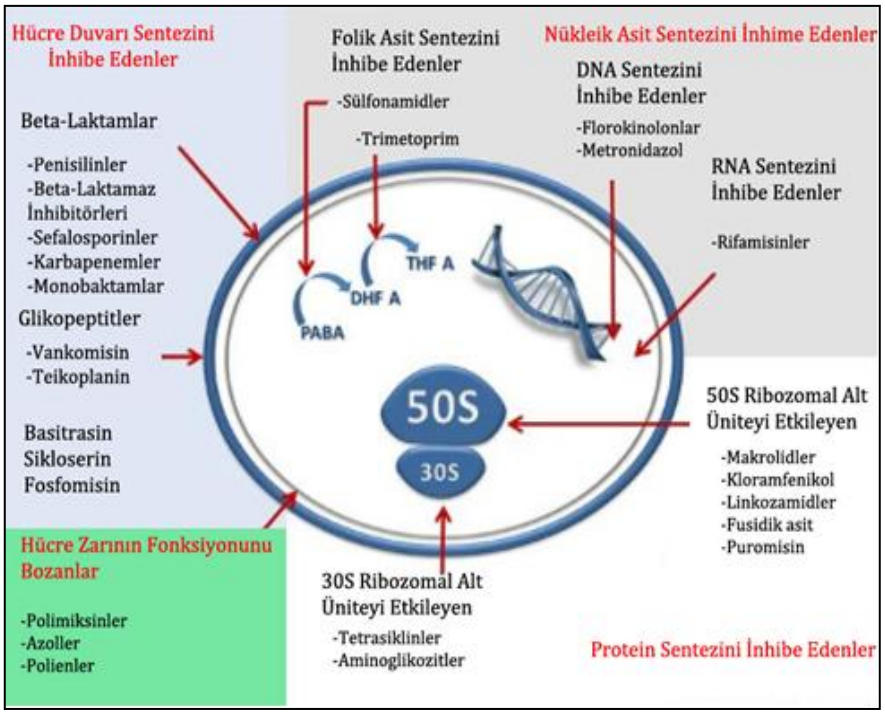
Antibiyotikler ve Etki Mekanizmaları

Antibiyotik, herhangi bir mikroorganizma tarafından, başka bir mikroorganizmayı öldürmek veya çoğalmasını durdurmak için üretilen her türlü madde olarak tanımlanır. Antibiyotik üretimi, onu üreten mikroorganizma için selektif bir avantaj sağlar. Örnek olarak, *Penicillium* tarafından üretilen antibiyotikler, doğada rekabet halinde olduğu diğer mikroorganizmaların büyümesini önleyerek *Penicillium*'a rekabette önemli bir avantaj sağlar (Anonim, 2012).

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılırlar. “Bakteriyostatikler” diye isimlendirilen grup, bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önler. (Örneğin; Tetrasiklinler, Makrolitler, Linkozamidler, Amfenikoller vs.) Bakteriyostatik etkiyi belirlemek için MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) kullanılmaktadır. “Bakterisidler” diye isimlendirilen grup ise, bakteri hücresini dolaysız olarak yok ederler. (Örneğin; Beta-Laktamlar) Bakterisid etkiyi belirlemek için MBK (Minimum Bakterisid Konsantrasyon) kullanılmaktadır (Akkan, 1997).

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre genel olarak dört grupta ele alınır. Hücre duvarı sentezini inhibe edenler, hücre zarının fonksiyonunu bozanlar, nükleik asit sentezini inhibe edenler ve protein sentezini inhibe edenler. (Şekil 1.1.)

Çalışmamızda kullanılan antibiyotikler, bu antibiyotiklerin yer aldıkları gruplar ve etki mekanizmaları Çizelge 1.1.’ de verilmiştir.



Şekil 1.1. Etki mekanizmalarına göre antibiyotikler.

Çizelge 1.1. Antibiyotik grupları ve etki mekanizmaları.

Antibiyotik	**Kimyasal Yapılarına Göre Grubu**	**Etki Mekanizması**
Ampisilin	Beta-laktam/Penem	Hücre duvarı sentezini inhibe eder.
Eritromisin	Makrolid	Protein sentezini inhibe eder.
Gentamisin	Aminoglikozit	Protein sentezini inhibe eder.
Kloramfenikol	Fenikoller	Protein sentezini inhibe eder.
Linkomisin	Linkozamid	Protein sentezini inhibe eder.
Meropenem	Beta-laktam/Karbapenem	Hücre duvarı sentezini inhibe eder.
Siprofloksasin	Kinolon	DNA sentezini inhibe ederler.
Teikoplanin	Glikopeptid	Hücre duvarı sentezini inhibe eder.
Tetrasiklin	Tetrasiklin	Protein sentezini inhibe eder.
Vankomisin	Glikopeptid	Hücre duvarı sentezini inhibe eder.

Direnç Mekanizmaları

Mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı çeşitli mekanizmalarla direnç geliştirebilirler. Antibiyotik dirençliliği, doğal (intrensek) direnç, kazanılmış direnç ve çapraz direnç şeklinde üç yolla oluşmaktadır. Doğal direnç, genellikle aynı türdeki tüm bakterilerde bulunan direnç mekanizmasıdır. Mikroorganizmaların tür özelliği olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşımamalarının veya ilacın yapısal bir özellikten dolayı hedefine ulaşmamasının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Örneğin ilacın dış membrandan geçmemesi nedeniyle Gram negatif bakteriler, vankomisine doğal olarak dirençlidir. Kazanılmış direnç durumunda ise aynı türdeki tüm bakterilerde olmayan, gen aktarımı ya da mutasyonla oluşan dirençtir. Bir bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak, eskiden duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajandan etkilenmeyip direnç kazanmış olabilir. Genetik kaynaklı direnç kromozomal (spontan oluşan mutasyonlar) veya kromozom dışı elemanlara (plazmid,

transpozon ve integron gibi genetik elemanlar) bağlı olabilir. Çapraz direnç ise, belli bir ilaca karşı dirençli olan bazı mikroorganizmaların, aynı veya benzer mekanizma ile etkili diğer ilaçlara karşı da dirençli olmaları halidir. Çapraz direnç kromozomal veya ekstrakromozomal orjinli olabilir (Yüce, 2001).

Farklı antibiyotik sınıflarına dirençlilik çeşitli şekillerde ortaya çıkmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere direnç dört yolla gelişir.

1) İlacın inaktivasyonu, beta-laktamaz enzimleriyle,

2) Antibiyotiğin hedefine bağlanamaması, PBP (Penisilin Bağlayıcı Protein)' lerde oluşan değişiklik ile,

3) Bakteriye giren veya biriken ilaç miktarının azalması (permeabilite azalması, aktif pompalama) ile,

4) Otolitik enzimlerin eksikliği veya olmayışı (tolerans) ile (Öztürk, 2002).

MLS (Makrolidler, Linkozamidler, Streptograminler) grubu antibiyotikler benzer etki mekanizması ve benzer direnç mekanizmasına sahip oldukları için aynı grupta incelenirler. Makrolidler içerisinde yer alan, lakton halkasındaki karbon sayısına göre 14 üyeli ve doğal olanlar içerisinde bulunan, eritromisin antibiyotiğine en yaygın direnç mekanızması "*erm*" genleri tarafından "eritromisin ribozom metilaz" sentezi ile olmaktadır. Bu enzim, 23s rRNA' da bulunan 2058 nolu Adenini metilleyerek antibiyotiğin bağlanmasını önler. Bu şekilde eritromisin antibiyotiğine direnç sağlanmış olur. Bu durum bazen MLS grubu antibiyotikler arasında çapraz dirence de yol açabilmektedir. Ayrıca esteraz veya fosfotransferaz gibi inaktivasyon enzimleri de dirençte rol oynamaktadır (Aydın, 2007).

Aminoglikozitlere karşı direncin (Örneğin; Gentamisin) en sık gözlenen mekanizması enzimatik direnç olup plazmid, transpozon veya kromozom üzerindeki genler tarafından kodlanan enzimler ile antibiyotik modifiye edilmektedir. Kataliz ettikleri reaksiyonlara göre üç sınıfta toplanmaktadırlar.

1) Aminoglikozit molekülündeki aminogrubunu asetile eden asetiltransferazlar (AAC).

2) Aminoglikozit molekülündeki hidroksil grubunu adenile eden nükleotidiltransferazlar (ANT veya AAD).

3) Aminoglikozit molekülündeki hidroksil grubunu fosforile eden fosfotransferazlar (APH).

Aminoglikozitler membrandan geçerken bu enzimler ile modifiye edildiğinden ribozomlara bağlanamazlar ve böylece etkisiz kalırlar (Öztürk, 2002). Kloramfenikole karşı direnç gelişimi kloramfenikolün 3- ve 1-hidroksil gruplarını asetile eden "kloramfenikol asetiltransferaz" (*cat*) enziminin varlığı sonucudur. Asetilleme sonucu modifiye edilen kloramfenikol, ribozomlara bağlanamaz ve protein sentezi engellenmemiş olur. Gram pozitif (*cat* D, *cat* P, *cat* Q) ve Gram negatif (*cat* I, II, III) bakterilerde bu enzimin sentezlenmesi genellikle plazmid bazen kromozom kontrolündedir (Öztürk, 2002).

Tetrasiklin antibiyotiği için ise direnç sağlayan en az 15 farklı gen vardır (*tet* A, *tet* B, *tet* C-Q). Bunlardan *tet* M farklı bakterilerde yaygındır. Tetrasiklinlere karşı direnç gelişimi üç mekanizma ile sağlanır.

1) Hücre içi ilaç birikimi azalması (azalmış giriş veya artmış çıkış), genelde Gram negatif bakterilerde direnç kazanılmasının en sık mekanizması olup, plazmid veya transpozon kaynaklıdır. Plazma membranında bulunan "Aktif Effluks Pompası" (bakteri hücresine giren antibiyotiğin, transport proteinlere benzer proteinlerin etkinliği ile hızla dışarı atılması) hücreden antibiyotiği dışarı atar. Tetrasiklinlerin bakteriye girişi bozulup hücre içinde ilaç birikimi azalabilir. Gram pozitif bakterilerde de bu mekanizma ile direnç kazanılabilir.

2) Hedefin korunması ve duyarlılığı azalması, Gram pozitif bakterilerde ribozomal değişiklik sonucunda antibiyotiğin hedefe bağlanması azalır.

3) Enzimatik olarak inaktivasyon, nadiren dirençten sorumlu diğer bir mekanizmadır (Öztürk, 2002).

Vankomisin direnç mekanizmasında ise, özellikle enterokoklarda vankomisin direncinin *D*-ala-*D*-ala ligaz enziminin peptidoglikan öncül molekülünün *D*-ala-*D*-ala distal ucunun yapısını değiştirip vankomisinin buraya yapışmasını engellemesi sonucu geliştiği bildirilmiştir. Bu enzimin sentezi bir grup bakteride transpozon üzerinde (*van* (A)), bir grup bakteride ise kromozomlar üzerindedir

(*van* (C), *van* (D), *van* (E) ve *van* (G)). *van* (A) tipi dirençte vankomisin ve teikoplanine karşı direnç gelişirken, *van* (B) ve *van* (C)' de teikoplanine karşı duyarlılık korunurken, vankomisine karşı direnç gelişimi söz konusudur (Öztürk, 2002).

Kinolon direnci bakterilerde bazal seviyede sentezlenen dışa geri atım pompaları ile olabilmektedir. Enerjiye bağımlı olan bu pompalar kinolonlar, beta-laktamlar, aminoglikozitler, deterjanlar, boyalar gibi birbirinden yapısal olarak çok farklı antimikrobiyalleri hücre dışına atabilmektedir. Kromozomal mutasyonlar sonucunda da ya kinolonların hedef enzimleri olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün alt birimlerinde değişiklik meydana gelmektedir. Bu tip kromozomal mutasyonlar kinolon direncinde hala en sık ve en temel mekanizmadır. (Kinolonları substrat olarak kullanan çoklu ilaç geri atım pompaları aktive olmaktadır) Ayrıca porinlerin sayısı düşürülerek hücre içine alımın azaltılması kinolon direncine katkıda bulunmaktadır (Nazik ve Öngen, 2010). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar kinolon direncinin yayılması ve artışının plazmit aracılı olabileceğini göstermiştir. Bugüne kadar plazmit aracılı kinolon direnci ile ilgili *qnr*, *aac*(6')-*Ib-cr*, *qepA* olmak üzere üç gen tanımlanmıştır (Nazik ve Öngen, 2010).

LAB' de Direnç

LAB'nde doğal ve kazanılmış dirençlilik bilinmektedir. Örneğin, *Lactobacilli, Pediococci, Leuconostoc* ve bazı diğer gram pozitif bakteriler doğal olarak vankomisine yüksek direnç göstermektedir (Hamilton-Miller ve Shah, 1998).

Laktik asit bakterilerinin antibiyotik dirençleriyle ilgili yapılan çalışmaların çoğu, gıda mikroorganizmaları arasında farklı bir yere sahip olan *Enterococcus* cinsinin üyeleri üzerine yoğunlaşmıştır (Clementi ve Aquilanti, 2011). Ayrıca düşük G+C branşına dahil pek çok tipik LAB taksonunda, (örneğin, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (*Oenococcus*), *Pediococcus* ve *Streptococcus thermophilus*) antibiyotik direnci ile ilgili özellikler belirlenmiştir. (Mathur, 2005; Ammor, 2007; Bernardeau, 2008; Delorme, 2008; Ogier, 2008). Ancak, LAB' nde antibiyotik direnci ile ilgili günümüzdeki veriler tutarsızdır ve çeşitli yöntemsel zorluklar söz konusudur. Örneğin denemelerde LAB'nin gelişimini iyi bir şekilde destekleyen ancak deney sonuçlarında karışıklık yaratmayacak besiortamlarının kullanılması gerekmektedir. Yemlerde ve

gıdalarda en yaygın şekilde bulunan/eklenen LAB türleri için mikrobiyolojik antibiyotik sınır değerlerinin dikkatli bir şekilde saptanması gerektiği belirtilmiştir (Clementi ve Aquilanti, 2011). LAB'nden oluşan geniş çaplı kültür kolleksiyonlarında, çok çeşitli antibiyotiklerle yapılan "sınır değer" taramaları gıda güvenlik kriterleri açısından önem arz etmektedir.

Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyallere duyarlılıkları kadar direnç genlerini barındırmaları ve aktarmaları da önemlidir. Bu denenen izolat ve antimikrobiyale göre değişmektedir (Ouoba vd., 2008). Fermente gıdalar tüketildiğinde, insan vücuduna oldukça fazla miktarda canlı bakteri girmektedir. Bu durumda bu bakteriler kommensal ya da patojen bakterilere taşınabilir antibiyotik direncini aktarabilirler (Hummel vd., 2007a). Bu durum antibiyotiklerin yemlerde, ziraat ve veteriner uygulamalarında yanlış ve aşırı kullanımından dolayı daha zararlı bir hale gelmiştir (Nawaz vd., 2011). Antibiyotiklere dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara olası transferini Şekil 1.2.'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Bu döngü içerisinde fermente süt ürünlerinin hayvansal ürünlerden elde edildiği ve insanlar tarafından tüketildiği göz önüne alınırsa önem arz eden bir konu olduğu daha açık ortaya çıkmaktadır.

Günümüze kadar *Lactobacillus* türlerinde pek çok AD (antibiyotik direnç) geni saptanmıştır ve doğal olarak laktobasiller tetrasiklin, eritromisin ve kloramfenikol gibi protein sentezini engelleyen antibiyotiklere duyarlıdırlar. Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnci ile ilgili yapılan son çalışmalara göre AD genlerini araştırmak için mikroarraylerin, ya da PCR temelli tekniklerin dirençli LAB suşlarını tanılamakta oldukça güçlü araçlar olduğu ortaya konmuştur (Clementi ve Aquilanti, 2011).

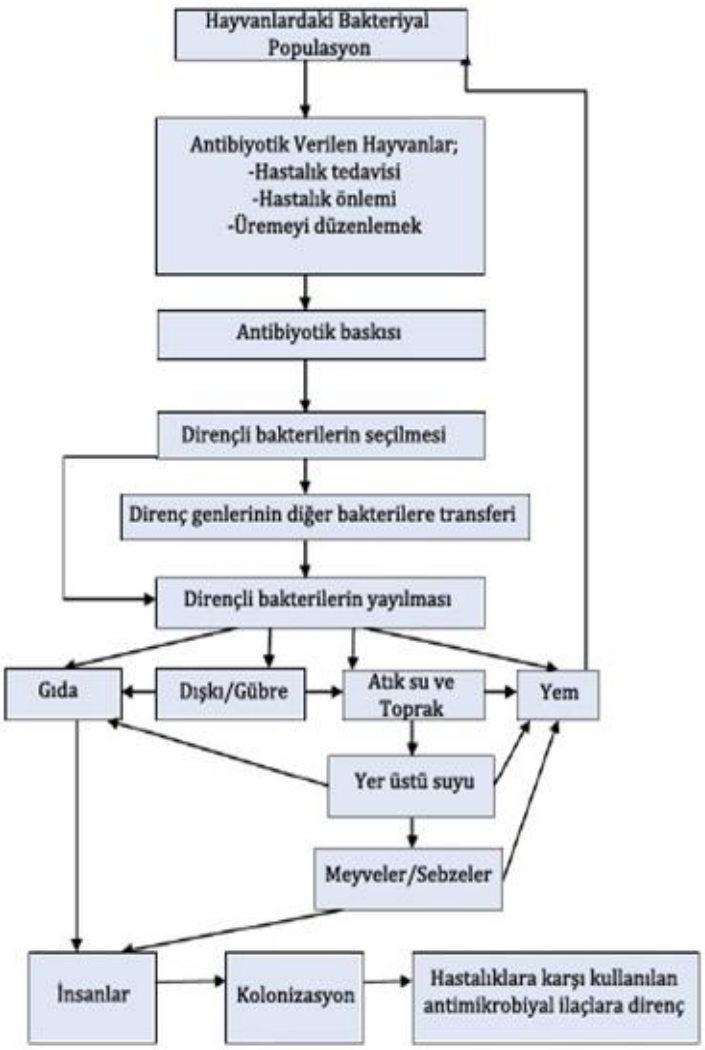
Bilimsel yayınlarda, gıda ve yem mikroorganizmalarının antibiyotik direnciyle ilgili pek çok yeni verinin ortaya çıkması için Avrupa'daki farklı kurumlar tarafından sürekli revize edilen raporların ortaya konması gerekmektedir. İnsan sağlığı ve veteriner tıp alanında kullanılan antibiyotiklere dirençli bakterilerin güvenliğini değerlendirmek için SCAN (Scientific Committe on Animal Nutrition, Hayvan Beslenme Bilim Kurulu) tarafından 2001 yılında çeşitli kriterler oluşturulmuş ve 2003 yılında revize edilmiştir. Bu kriterler 2005 ve 2007 yıllarında EFSA (European Food Safety Authority, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından düzenlenen FEEDAP (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) panelinde iki kez güncellenmiştir.

Antimikrobiyallere karşı hassas olan suşlar ile kazanılmış direnç taşıyan suşlar arasında daha güvenilir bir ayırım yapabilmek amacıyla FEEDAP teknik rehberi yayınlanmıştır. En yaygın olarak kullanılan 10 antimikrobiyal ajan için yeni mikrobiyolojik (epidemiyolojik) antibiyotik sınır değerleri belirlenmiştir. Bu değerler farklı LAB grup, cins ya da türleri temel alınarak tanımlanmış ve değerlendirmeye göre laktik asit bakterileri çeşitli kategorilere ayırılmıştır. Bu grupların çoğu vankomisine doğal dirençli olarak tanımlanmıştır ve bu yüzden doğal dirençli gruplarda vankomisin antibiyotiği için MİK değerlerinin belirlenmesi gerekmemektedir.

Diğer tüm antibiyotikler için EFSA raporunda belirtilen değerlerin üzerinde MİK değeri saptanması durumunda direncin genetik temelinin mutlaka araştırılması gerektiğini rapor etmiştir. Aynı raporda, MİK değerleri belirlenirken uluslarası standart metodların kullanılması önerilmiştir. Bu durum özellikle LAB için önemlidir, çünkü bu bakterilerin geliştirildiği geleneksel besiortamları bazen antibiyotikler ile etkileşime girerek deney sonuçlarını etkilemektedir (Clementi ve Aquilanti, 2011). EFSA 2005 yılında yayınladığı raporda doğal (kalıtsal) direnç ve kromozomal genlerdeki mutasyon sonucu oluşan direncin yatay dağılım açısından düşük bir risk oluşturduğunu ve bu tür suşların gıda tüketimi açısından kabul edilebilir olduğunu belirtmiştir. Bununla beraber sonradan eklenen genlerle oluşan kazanılmış direnç halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır (FEEDAP, European Commision, 2005). 2007 yılında yayınlanan EFSA raporunda ise transfer edilebilir antibiyotik direnç geni taşıyan suşların hayvan yemlerinde, fermente ve probiyotik gıdalarda kullanılmaması gerektiği belirtilmiştir (EFSA, 2007).

Tez projemizde günlük hayatımızda önemli miktarda tükettiğimiz fermente süt ürünlerinin gıda güvenliği açısından değerlendirilmesi söz konusudur. Çalışmamızın en önemli amaçlarından biri fermente süt ürünlerinden izole edilen farklı cinslere dahil pek çok LAB türünün, klinikte ve veteriner tıp alanında en yaygın kullanılan antibiyotikler için MİK değerlerini belirlemek ve literatürdeki çalışmalar ve gıda güvenilirliği açısından bu değerlerin referans olmasını sağlamaktır. Ayrıca izole edilmiş bu bakterilerin moleküler düzeyde tanısı yapılmış olup, hem geleneksel hem de ticari olarak satılan fermente süt ürünlerinin mikrobiyal florası saptanmıştır. Geleneksel ve ticari ürünlerden izole edilen suşların antibiyotik dirençliliği açısından karşılaştırılması, hangi gıda grubunun tüketim için daha güvenilir olabileceği hakkında da fikir vermiştir.

PCR yöntemiyle saptanan antibiyotik direnç genlerinin sekans analizleri yapılmış olup, antibiyotik direnci moleküler düzeyde de ortaya konmuştur.



Şekil 1.2. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara olası transferi (Korhonen, 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

LAB fermente gıdalar ve içkilerin üretimi ve tüketiminde uzun yıllardır güvenli bir şekilde kullanılmaktadır ve Uluslararası Süt Ürünleri Federasyonu'nun verilerine göre Avrupa'da kişi başı fermente süt ürünleri tüketimi yıllık ortalama 22 kg civarındadır (Hummel vd., 2007a).

Fermente ürünlerin tümünde bulunan laktik asit bakterileri, ürünlere kendine has aroma, koku ve yapı kazandırılmasında yardımcı olmaktadır. Bazı geleneksel fermente ürünlerde bulunan LAB Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı fermente ürünlerde bulunan LAB (Eren vd., 2011).

Ürün	**Laktik Asit Bakterisi**
Peynir	*Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus, S.cremoris, Lactobacillus helveticus, Lb. delbrueckii, Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. plantarum, Lb. rhamnosus, Lb. curvatus, Pediococcus acidilactici, P. pentosaceus, Leuconostoc dextranicum, Leuco. mesenteroides*
Yoğurt	*S. thermophillus, Lb. delbroeckii subsp. bulgaricus, Lc. lactis ssp. lactis, Enterococcus faecium, E. durans, Lb. delbrueckii ssp. lactis*
Tereyağ	*S. salivarius ssp. thermophilus, Streptococcus sp., Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus, Lb. casei ssp. casei, Lb. paracasei ssp. paracasei, E. faecium, Leuco. pseudomesenteroides (Leuco. mesenteroides ssp. dextranicum), Leuco. gelidum (Leuco. mesenteroides ssp. mesenteroides), Weissella paramesenteroides (Leuco. paramesenteroides)*
Kefir	*Lb. bulgaricus, S. lactis, Lb. cellobiosis, S. avium, S. cremoris, Lb. kefir, Lb. kefiranofaciens, Lb. kefirgranum, Lb. parakefir, Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. helveticus, Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, Lb. rhamnousus, Lb. casei, Lb. paracasei, Lb. fructivorans, Lb. hilgardi, Lb. fermentum, Lb. viridescens, Lc. lactis subsp. cremoris, S. thermophilus, Leuconostoc sp., Leuco. mesenteroides*

Çizelge 2.1**.** devamı.

Ürün	**Laktik Asit Bakterisi**
Kımız	*Lb. bulgaricus, Lb. acidophilus*
Sucuk	*Lb. plantarum, Lb. curvatus, Lb. pentosus, Lb. fermentum, Lb. brevis, P. pentosaceus, P. acidilactici, Lc. lactis subsp. lactis, Leuco. mesenteroides subsp. mesenteroides/dextranicum, Leuco. lactis, Lactobacillus spp., Lb. sakei, Lb. viridescens, Lb. agilis, Lb. casei subs. rhamnosus*
Pastırma	*Lb. pentosus, Lb. sakei*
Boza	*Leuco. paramesenteroides, Leuco. mesenteroides subsp. mesenteroides, Leuco. mesenteroides subsp. dextranicum, Leuco. oenos, Lb. coryniformis, Lb. confusus, Lb. sanfrancisco, Lb. fermentum*
Tarhana	*S.thermophilus, Lb. bulgaricus*
Şalgam	*Lb. sanfranciscensis, Lb. pontis, Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. alimentarius, Lb. fructivorans, Lb. reuteri, Lb. fermentum*
Turşu	*E. faecalis, Leuco. mesenteroides, Lb. brevis (Lb. pentoaceticus), Lb. plantarum, P. pentosaceus*

Fermente gıdalarda ve gastrointrestinal sistemde oldukça fazla miktarda bulunan LAB' leri mutasyon yoluyla farklı direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasına yardım eder. Ayrıca, LAB çevredeki diğer bakterilerden direnç kazanabilir. Bir LAB bir kez dirençli hale geldiği zaman, direncin determinantı çoğalır ve diğer bir konağa aktarılabilir. Bu yüzden, starter suşlarda, yem ve gıda katkısı olarak kullanılan bakterilerde "transfer edilebilir antibiyotik direnci"' nin işaretlerini aramak, bu suşların teknolojik ve fizyolojik özelliklerini belirlemek kadar önemlidir.

LAB ile diğer bakteriler arasındaki aktif/pasif iletişim sonucu konjigatif plazmitler ve transpozonların aktarılması ile direnç geni kazanması söz konusudur. LAB' nde plazmitler farklı büyüklüklerde, fonksiyonlarda ve dağılımlarda bulunmaktadır. Kesin olarak belirlenmiş konjigatif antibiyotik dirençlilik plazmitlerine örnek pAMβ1 ve PIP501 verilebilir ve her ikisi de aktarılabilir özelliktedir (Mathur vd., 2005).

Konjugatif transpozonlar genel olarak enterokoklar, laktokoklar ve streptokoklarda tanımlanmıştır. Konjugatif transpozonlar Gram pozitif bakterilere antibiyotik dirençliliğinin aktarılmasında büyük rol oynamaktadır. Transpozonlar *E. faecalis* (*Tn*916, *Tn*918, *Tn*920, *Tn*925, *Tn*2702), *E. faecium* (*Tn*5233), *Streptococcus pyogenes* (*Tn*3701), *Streptococcus agalactiae* (*Tn*93951) ve *Lc. lactis* (*Tn*5276, *Tn*5301) olarak keşfedilmiştir. Bu transpozonlar 16 kb ve 70 kb arasında değişkenlik göstermektedir, plazmitlere ve kromozomlara tek veya çok kopyalar halinde eklenebilirler (Mathur vd., 2005). Çiğ et, yem ve dışkıdan izole edilen *Lb. reuteri, Lactobacillus fermentum, Lb. acidophilus* ve *Lb. plantarum* suşlarında direnç plazmitleri tarafından kodlanan tetrasiklin, eritromisin, kloramfenikol ya da makrolid linkomisin streptogramin (MLS) dirençlilikleri rapor edilmiştir. Çoğu direnç plazmitinin büyüklüğü 10 kb' dan küçüktür (5,7-18kb) (Mathur ve Singh, 2005).

LAB' nin antibiyotik duyarlılıkları için dirençli ve hassas suşların belirlenmesinde kullanılan antibiyotik sınır değerlerinin açıkça tanımlanması gerekmektedir. Doğal (nonspesifik, transfer edilemeyen) ve kazanılmış direnç arasındaki ayrım da önemlidir ki bu durum farklı kaynaklardan izole edilen pek çok LAB ve bifidobacteria türlerindeki antimikrobiyal direnç örneklerinin karşılaştırılmasını gerektirir. Antibiyotik sınır değerleri bakteri suşlarındaki kazanılmış ve aktarım riski taşıyan direncin tanımlanmasında önemlidir (Mathur ve Singh, 2005; Ammor vd., 2007).

Ammor vd. (2007) literatürdeki analizleri temel alarak, farklı LAB grupları, cinsleri ve türlerinin çeşitli antibiyotikler için sınır değerlerini taramışlar ve antibiyotik direnç/duyarlılık profillerini özetlemişlerdir. Bazı özelliklerin pek çok LAB tarafından paylaşıldığı görülmektedir, çoğu LAB türü metronidazole dirençlidir ve bunların tümü sülfonamidler ve trimethoprime doğal dirençli iken, piperasilin ve piperasilin + tazobaktama genelde duyarlıdırlar. Diğer yandan farklı LAB cinsleri için belirgin farklılıklar söz konusu iken, türe özgü profiller her zaman tanımlanabilir değildir. *Lactococcus, Leuconostoc* ve *Lactobacillus* cinsleri sefoksitine oldukça dirençlidir. *Leuconostoc, Pediococcus* ve pek çok laktobasil vankomisine doğal dirençli kabul edilirken, *Lactococcus* izolatlarının çoğu vankomisine duyarlıdır.

Aslim ve Beyatlı (2004), Türkiye' de farklı köy ve kasabalardan toplanan yoğurt örneklerinden 34 adet *S. thermophilus* suşu izole etmişlerdir. İzolatların 8 antibiyotiğe (vankomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, sefalotin, ampisilin-sulbaktam, gentamisin ve penisilin G) karşı duyarlılıklarını disk difizyon methodu ile belirlemişlerdir. Birçok *S. thermophilus* suşunun gentamisin (% 79) ve penisiline karşı (% 64) dirençlilik gösterdiği belirlenirken, suşların % 88 oranında tetrasikline, % 94 oranında da kloramfenikole duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. *S. thermophilus*' un bazı suşlarında antibiyotik dirençliliği ile plazmid varlığı arasında bir bağlantı olduğu gözlenmiştir.

Coppola vd. (2005), Parmigiano Reggiano (İtalya) tipi peynirlerinden izole edilen 63 *Lb. rhamnosus* suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için 41 farklı antibiyotik kullanmışlardır. Disk difüzyon metoduyla antimikrobiyal duyarlılıklarına bakılan izolatların, inhibisyon zonları ölçülmüş ve duyarlılık/dirençlilik özellikleri tespit edilmiştir. Tüm izolatların 6 antibiyotiğe (sefiksim, vankomisin, neomisin, enoksasin, perfloksasin ve sülfamethoksazol) direnç gösterdiği bulunmuştur. DSM 20021 suşu 9 antibiyotiğe direnç gösterirken (diğer 6 antibiyotiğe ilave olarak sefaleksin, basitrasin, linkomisin) *Lactobacillus* GG suşu (ticari probiotik) 8 antibiyotiğe direnç göstermiştir. Peynirlerden izole edilen *Lb. rhamnosus* suşlarının da farklı antibiyotiklere spesifik direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile gelecekte antibiyotik dirençliliğinin probiyotik LAB' i üzerinde çok önemli bir rol oynayacağı tespit edilmiştir.

Ouoba vd. (2008), Afrika ve Avrupa kökenli çeşitli laktik asit bakterileri ve bifidobakterilerin antibiyotik dirençleri, bu direncin *in vitro* transferi ile ilgili yaptığı çalışmada, Avrupa izolatlarında yüksek oranda fenotipik aminoglikozid direnci saptanmıştır. Avrupa izolatlarında aminoglikozid direncini kodlayan *aac* (6′)-*aph* (2″) ve tetrasiklin direncini kodlayan *tet* (S) genlerine rastlanmıştır. Aynı çalışmada Afrika izolatı *Lb. reuteri* L4:12002 suşunun *erm* (B) geni taşıdığı ve bu geni *E. faecium* JH2-2 suşuna aktarabildiği belirtilerek, bu suşun probiyotik olarak güvenilir bir şekilde kullanılamayacağı bildirilmiştir.

Egervärn vd. (2009)'nin yaptığı çalışmada *Lactobacillus reuteri* ve *Lactobacillus plantarum*' türlerinin karakterizasyonu yapılmış ve tetrasiklin, eritromisin, klindamisin ve kloramfenikol antibiyotikleri için MİK değerleri belirlenmiştir. 28 *Lb. reuteri* suşunun 24'ünde *tet* (W) geni ve yüksek tetrasiklin

MİK değerleri bulunmuştur. Ayrıca altı suşun dördünde eritromisin için yüksek MİK değerleri ve *erm* (B), *erm* (C) ve *erm* (T) genleri belirlenmiştir. Bunun yanında iki *Lb. plantarum* suşunda da yüksek MİK değeri ve plazmidce kodlanan *tet* (M) geni bulunmuştur. Çalışmada real-time PCR ve southern blot analizleri ile *tet* (W) pozitif *Lb. reuteri* suşu ile *erm* (B) pozitif *Lb. reuteri* suşlarındaki direnç genlerinin plazmitlerin üzerinde taşındığı bildirilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin antibiyotik direncini belirlemek, direnç genlerinin yerleşimini araştırmak bunların potansiyel aktarımını da aydınlatmaktadır. Genlerin dizilerinin belirlenmesi sayesinde ise diğer bakteri taksonlarında bulunan genlerle benzerlikleri araştırılabilir ve bu sayede genlerin orijinleri belirlenebilir (Clementi ve Aquilanti, 2011).

Ammor vd. (2007) derlemesinde, geçmişten 2007 yılına kadar yapılmış bazı çalışmalarda LAB' nde bulunmuş direnç genleri Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir. Çizelgedeki gruplara enterokoklar ve bifidobacteria türleri dahil değildir.

Çizelge 2.2. LAB'nde rastlanan direnç genleri Ammor vd. (2007).

Tür/Suş/Numarası	Kaynak(lar)	Direnç Gen(leri)	Gen Bank No	Referans(lar)
Lactobacillus acidophilus Bir izolat Onsekiz izolat	Domuz/Evcil hayvan dışkısı İnsan/ Süt ürünleri	aaa(6′)Ie-aph(2″)Ia tet(M), erm(B)	- -	(Tenorio vd., 2001) (Cataloluk ve Gogebakan, 2004)
Lactobacillus alimentarius DG500, DG499, DG498	Fermente kurutulmuş sucuk/sosis	tet(M)	AY149587, AY149586, AY149585	(Gevers vd., 2003)
Lactobacillus animalis —	Domuz bademciği ve genzinden	erm(B)	-	(Martel vd., 2003)
Lactobacillus casei Altı izolat	İnsan/Süt ürünleri	tet(M), erm(B)	-	(Cataloluk ve Gogebakan, 2004)
Lactobacillus crispatus CHCC3692 Beş izolat	Yavru domuzun özafagusundan İnsan	erm(B) tet(M), erm(B)	AY262353 -	(Strøman vd., 2003) (Cataloluk ve Gogebakan, 2004)
Lactobacillus curvatus DG524, DG484, DG142, DG143, G048	Fermente kurutulmuş sucuk/sosis	tet(M)	AY149595, AY149580, AY149576, AY149577, AY149575	(Gevers vd., 2003)
Lactobacillus fermentum LEM89 ROT1 Yirmi izolat	Domuz dışkısı Çiğ süt İnsan	erm(B) erm(LF), vat(E-1), tet(M) tet(M), erm(B)	U48430 AJ488494 -	(Fons vd., 1997) (Gfeller vd., 2003) (Cataloluk ve Gogebakan, 2004)
Lactobacillus gasseri Kırkdokuz izolat	İnsan/ Süt ürünleri	tet(M), erm(B)	-	(Cataloluk ve Gogebakan, 2004)

Çizelge 2.2. devamı.

Tür/Suş/Numarası	Kaynak	Direnç Gen(leri)	Gen Bank No	Referans(lar)
Lactobacillus johnsonii				
-	Domuz bademciği ve genzinden	erm(B)	-	(Martel vd., 2003)
Yirmialtı izolat	İnsan	tet(M), erm(B)	-	(Cataloluk ve Gogebakan, 2004)
G41	İnsan	erm(B)	-	(Florez vd., 2006)
Lactobacillus plantarum				
5057	Wisconsin'de mısır silajı	tet(M)	AF440277	(Danielsen, 2002)
DG507	Fermente kurutulmuş sucuk/sosis	tet(M), erm(B)	AY149588	(Gevers vd., 2003)
DG533, DG522, DG520, DG515, DG512, DG509, DG013	Fermente kurutulmuş sucuk/sosis	tet(M)	AY149597, AY149594, AY149593, AY149591, AY149590, AY149589,	(Gevers vd., 2003)
caTC2R	Çiğ domuz eti	cat-TC	AY149574	(Ahn vd., 1992)
Sekiz izolat	İnsan/ Süt ürünleri	tet(M), erm(B)	-	
CCUG 43738	İnsan	tet(S)	- AM039486–AM030490	(Cataloluk ve Gogebakan, 2004)
Lactobacillus reuteri				
1044	Domuz bağırsağı	erm(B)	-	(Axelsson vd., 1988)
100-63	Kümes hayvanı	erm(T)	M64090	(Tannock vd., 1994)
G4	Kümes hayvanı	cat-TC	U75299	(Lin vd., 1996)
N16, L1	Tavuk bağırsağı	erm(B)	AF080450, AF030064	(Lin ve Chung, 1999)
-	Domuz bademciği ve genzinden	erm(B)	-	(Martel vd., 2003) (Kastner vd., 2006)
SD 2112	İnsan	tet(W), lnu(A)	-	
Lactobacillus rhamnosus Kırküç izolat	İnsan	tet(M), erm(B)	-	(Cataloluk ve Gogebakan, 2004)

Çizelge 2.2. devamı.

Tür/Suş/Numarası	Kaynak	Direnç Gen(leri)	Gen Bank No	Referans(lar)
Lactobacillus sakei DG516, DG489, DG488, DG485, DG483, DG165	Fermente kurutulmuş sucuk/sosis	tet(M)	AY149592, AY149583, AY149582, AY149581, AY149579, 8AY149578	(Gevers vd., 2003)
Lactobacillus salivarius Beş izolat -	Domuz ve evcil hayvan dışkısı Domuz bademciği ve genzinden	aaa(6′)-aph(2″) erm(B)	- -	(Tenorio vd., 2001) (Martel vd., 2003)
Lactobacillus spp. - PC121B T22-5 Dokuz izolat -	- Domuz dışkısı İnsan (Oral) İnsan(Ürogenital) -	tet(O), tet(Q) erm(T) tet(W) tet(O) tet(K), tet(M), tet(S), tet(W), tet(36)	- AF310974 - - -	(Chopra ve Roberts, 2001) (Whitehead ve Cotta, 2001) (Villedieu vd., 2003) (Villedieu vd., 2003) (Roberts, 2005)
Lactococcus lactis subsp. *lactis* AA21aTc, AA29 K214 C5	Mavi peynir Çiğ sütten yumuşak peynir Tavuk bağırsağı	tet(M) mdt(A), tet(S), cat, str erm(T)	DQ060148, DQ060147 X92946 -	(Florez, Ammor ve Mayo, yayınlanmamış) (Perreten vd., 2001) (Raha vd., 2002)
Leuconostoc citreum -	Sucuk üretim hattından	tet(S)	-	(Gevers, 2002)

Çizelge 2.2. devamı.

Tür/Suş/Numarası	Kaynak	Direnç Gen(leri)	Gen Bank No	Referans(lar)
Pediococcus acidilactici				
HM3020	Dışkı (klinik örnek)	erm(B)	-	(Tankovic vd., 1993)
AR-63	Domuz ve evcil hayvan	erm(B)	-	(Zarazaga vd., 1999)
Bir izolat	dışkısı	aaa(6′)-aph(2″)	-	(Tenorio vd., 2001)
6990	Domuz ve evcil hayvan dışkısı	erm(B)	-	(Danielsen vd., 2006)
	Geleneksel peynir			

aac, aminoglikozid asetiltransferaz; ant, aminoglikozid adeniltransferaz; aph, aminoglikozid fosfotransferaz; cat, kloramfenikol asetiltransferaz; erm, eritromisin dirençlilik geni; lnu, linkozamid dirençlilik geni; mdt, multi ilaç taşıyıcı; str, streptomisin dirençlilik geni; tet, tetrasiklin dirençlilik geni; vat, streptogramin A asetiltransferaz.

Clementi ve Aquilanti (2011), laktokokların antibiyotik direnç/duyarlılık profillerini araştırmışlar ve bazı suşların *tet* (M) ve *erm* (T) genleri taşıdığı, ancak çiğ sütten yapılan peynirden izole edilen K214 suşunun en azından 3 farklı plazmid yerleşimli kloramfenikol, tetrasiklin (*tet* (S)) ve streptomisin direnç geni taşıdığı belirtilmiştir. *tet* (S) geninin varlığı *Leuconostoc citreum* için de bildirilmiştir, *erm* (B) geni *Pediococcus acidilactici*' nin üç suşunda tespit edilirken, yine aynı bakterinin bir izolatında *aac* (6′)-*aph* (2′′) geni saptanmıştır.

Pan vd. (2011), 11 tane Çin fermente gıdasından, klinik açıdan önemli yedi antibiyotiğe (kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin, siprofloksasin, ampisilin, klindamisin ve eritromisin) karşı direnç araştırmak için LAB izolasyonu yapmışlardır. Antibiyotiklere dirençli olarak bulunan LAB yaygın olarak, geleneksel Çin fermente gıdalarında ve sıklıkla çiğ materyalden imal edilmiş gıdalarda tespit edilmiştir. Direnç etkisi fermente sebzelere oranla, fermente sucuklarda/sosislerde daha fazla bulunmuştur. 202 antibiyotiğe dirençli LAB izolatı içinde 14' nün 7 antibiyotiğe karşı MİK' leri araştırılmıştır. Birden çok direnç gözlenen bu 14 suşta PCR yöntemi ile direnç genleri aranmıştır. *tet* (M) ve *erm* (B) genlerinin her ikiside plazmidik ya da kromozomalken, *aph* (A3) geni sadece plazmidik, *mef* (A) geni ise sadece kromozomal olarak bulunmuştur. Bunun dışında *gyr* (A), *bla* (Z) ve cat_{pIP501} genleri bulunamamıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, LAB antibiyotik dirençliliğinin gıdalara ve çevreye yayılmasında büyük rol oynamaktadır.

Nawaz vd. (2011), Çin Xi'da fermente gıdalardan izole ettikleri LAB' nde fenotipik ve moleküler analizlerle antibiyotik dirençlilik analizi yapmışlardır. İzole edilen LAB suşlarının cinsleri yapılan 16S rRNA gen analizi sonucu *Lactobacillus* (n = 73) ve *Streptococcus thermophilus* (n = 11) olarak belirlenmiştir. Bütün suşlar ampisilin, basitrasin ve sefsulodine duyarlı ve nalidiksik asit, kanamisin ve vankomisine (*L. bulgaricus, L. acidophilus* ve *S. thermophilus* dışındakiler) doğal dirençli bulunmuştur. Bazı suşların penisillin (n = 2), eritromisin (n = 9), klindamisin (n = 5) ve tetrasikline (n = 14) dirençli oldukları görülmüştür. *erm* (B) gen varlığı *L. fermentum, L. vaginalis, L. plantarum, L. salivarius, L. acidophilus, L. animalis* ve *S. thermophilus* suşlarının her birinde gözlenmiştir. *tet* geni geleneksel gıdalardaki 12 laktobasil suşunda bulunmuş olup, ilk kez *L. brevis* ve *L. kefiri*' de *tet* (S) geni tanılamışlardır. *L. fermentum* NWL24 ve *L. salivarius* NWL33' deki *erm* (B) geninin ve *L. plantarum* NWL22 ve *L. brevis* NWL59' daki *tet* (M) geninin filtre

yöntemi ile başarılı bir şekilde *Enterococcus faecalis* 181' e transfer edildiğini bildirmişlerdir.

Adimpong vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, daha önceden Afrika'daki üç farklı fermente gıda ürününden izole edilen 33 LAB suşu $(GTG)_5$ esaslı rep-PCR yöntemi ve 16S rRNA gen sekansı ile karakterize edilmiştir. Daha sonra yapılan spesifik PCR teknikleri ile yakın akrabalık ayrımları belirlenmiştir. Sonraki aşamada bu izolatların broth dilisyon yöntemi ile antibiyotik dirençlilik profilleri çıkartılmıştır. Moleküler biyoloji metodları ve fenotipik testlerle (katalaz testi, glukozdan CO_2 üretimi, koloni ve hücre morfolojisi) *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus ghanensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Weissella confusa* suşları tanılanmıştır. Bu bakterilerin ampisilin, kloramfenikol, klindamisin ve eritromisine duyarlı fakat vankomisin, kanamisin ve streptomisine dirençli oldukları belirlenmiştir. Tetrasiklin ve gentamisin antibiyotiklerinde değişken duyarlılık profilleri gözlenmiştir. *Lb. plantarum, Lb. salivarius, W. confusa* (SK9-5 suşu hariç) ve *Lb. fermentum* suşları tetrasikline duyarlıyken, *Pediococcus* ve *Lb. ghanensis* suşları dirençli bulunmuştur. Gentamisin için *Leuco. pseudomesenteroides*, *Lb. ghanensis* ve *P. acidilactici* suşları 64 mg/L MİK değerindeyken bazı *W. confusa* ve *Lb. plantarum* suşları sırası ile 16 mg/L ve 32 mg/L MİK değerine sahip oldukları belirtilmiştir.

Thumu ve Halami (2012), farklı gıda örneklerinden eritromisine dirençli LAB'lerini seçici besiyeri kullanarak izole etmişlerdir. *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus lactis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Leuconostoc mesenteroides* türleri olarak tanılanan 60 izolatın %88' in de *erm* (B) geni tespit etmişlerdir. Effluks geni *msr* (A) *E. faecium*, *E. durans*, *E. lactis*, *E. casseliflavus*, *P. pentosaceus* ve *L. fermentum* izolatlarında tanılanmıştır, ayrıca *msr* (A) geni için yapılan sekans analizi sonucunda *msr* (C) geniyle homolojisi ortaya çıkmıştır. *Lactobacillus* türlerinde tetrasiklin direnci *tet* (M), *tet* (W), *tet* (O), *tet* (K) ve *tet* (L) genlerinin biri ya da bunların kombinasyonu ile oluşmakta olduğu belirlenmiştir. *tet* (K) ve *tet* (L) tetrasiklin effluks geni olarak *P. pentosaceus* ve *Enterococcus* türlerinde bulunmuştur.

Zhou vd. (2012) tarafından Çin'de farklı coğrafyalardan alınan yoğurtlardan, ampisilin, penisilin G, roksitromisin, kloramfenikol, tetrasiklin, klortetrasiklin, linkomisin, kanamisin, streptomisin, neomisin ve gentamisine duyarlı 43 LAB izole edilmiştir. 43 izolatın RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimofik DNA) analizi ile tür tanısı yapılmıştır (18 *Lactobacillus bulgaricus* ve 25 *Streptococcus thermophilus*). Antibiyotik dirençliliği için agar dilüsyon yöntemi kullanılmış olup, test edilen bakterilerin arasında dirençlilik dağılımı, 35 suşta ampisilin, kloramfenikol, klortetrasiklin, tetrasiklin, linkomisin, streptomisin, neomisin ve gentamisin olarak bulunmuştur. Test edilen bütün *S. thermophilus* suşlarının penisilin G ve roksitromisine duyarlı olduğu bulunmuştur. Buna karşın *Lb. bulgaricus* suşlarının penisilin G ve roksitromisine sırasıyla % 23,5 ve % 64,7 oranında dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bütün *S. thermophilus* ve *Lb. bulgaricus* suşları kanamisine dirençli bulunmuştur. PCR yöntemi ile aranan direnç genleri sonucunda, 1 *Lb. bulgaricus* ve 2 *S. thermophilus* izolatında *tet* (M), 2 *Lb. bulgaricus* ve 2 *S. thermophilus* izolatında *ant* (6), 5 *Lb. bulgaricus* ve 2 *S. thermophilus* izolatında *aph* (3′)-IIIa genleri bulunmuştur. *Lb. bulgaricus* ve *S. thermophilus* suşlarında ilk kez *aph* (3′)-IIIa ve *ant* (6) genleri tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma Örnekleri

Laktik asit bakterilerini izole etmek amacıyla Aydın Merkez'de yer alan mandıralardan, marketlerden ve halk pazarlarından/ev yapımı yoğurt çeşitleri (kaymaklı, kaymaksız, süzme ve meyveli), kefir, lor çeşitleri (tulum ve kaşar), çökelek çeşitleri (karacaotlu ve normal), beyaz peynir, tulum peyniri çeşitleri (İzmir, Erzincan, Bergama, Ödemiş), ve koyun peyniri çeşitleri (Ezine, Edirne, normal) olmak üzere toplam 48 farklı marka ve örnek materyal olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Örnekler 4-6 saat içerisinde Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarına getirilerek bakteri izolasyonu işlemlerine başlanmıştır.

Çizelge 3.1. Fermente süt ürünleri ve alındıkları yerler.

Sıra	Materyal	Alındığı Yer
1.	Beyaz Peynir	Marka 1 Tam Yağlı Beyaz Peynir (Kutu)
2.	Beyaz Peynir	Marka 2 (Kutu)
3.	Beyaz Peynir	Marka 3 Tam Yağlı Beyaz Peynir (Kutu)
4.	Beyaz Peynir	Marka 4 Tam Yağlı Beyaz Peynir (Kutu)
5.	Beyaz Peynir	Mandıra 1
6.	Beyaz Peynir	Mandıra 2
7.	Beyaz Peynir	Mandıra 3
8.	Beyaz Peynir	Mandıra 4
9.	Beyaz Peynir	Mandıra 5
10.	Çökelek	Mandıra 5
11.	Çökelek (Karacaotlu)	Mandıra 4
12.	Kefir	Marka 5
13.	Kefir	Marka 6
14.	Kefir	Marka 7
15.	Kefir	Ev Yapımı
16.	Koyun Peyniri	Mandıra 5
17.	Koyun Peyniri (Edirne)	Mandıra 3
18.	Koyun Peyniri (Ezine)	Marka 8 (Paket)

Çizelge 3.1. Devamı

Sıra	Materyal	Alındığı Yer
19.	Koyun Peyniri (Ezine)	Marka 9 (Paket)
20.	Koyun Peyniri (Köy)	Mandıra 6 (Market)
21.	Koyun Peyniri (Tulum)	Mandıra 4
22.	Lor	Marka 10
23.	Lor	Marka 11
24.	Lor	Mandıra 3
25.	Lor	Mandıra 4
26.	Lor (Tulum)	Mandıra 3
27.	Lor (Tulum)	Marka 12
28.	Tulum Peyniri	Mandıra 4
29.	Tulum Peyniri	Mandıra 5
30.	Tulum Peyniri (Bergama)	Mandıra 5
31.	Tulum Peyniri (Erzincan)	Marka 13 (Paket)
32.	Tulum Peyniri (İzmir)	Marka 14 (Paket)
33.	Tulum Peyniri (İzmir)	Marka 1 (Paket)
34.	Tulum Peyniri (İzmir)	Mandıra 2
35.	Tulum Peyniri (İzmir)	Mandıra 3
36.	Tulum Peyniri (Ödemiş)	Mandıra 3
37.	Yoğurt	Mandıra 2
38.	Yoğurt	Mandıra 4
39.	Yoğurt	Marka 1 Doğal Yoğurt (Kap)
40.	Yoğurt	Marka 10 Kaymaksız Yoğurt (Kap)
41.	Yoğurt	Marka 15 Doğal Yoğurt (Kap)
42.	Yoğurt (Meyveli)	Marka 2 Tropik Meyveli
43.	Yoğurt (Süzme)	Aydın Merkez Halk Pazarı
44.	Yoğurt (Süzme)	Ev yapımı, Aydın Merkez Halk Pazarı
45.	Yoğurt (Süzme)	Ev yapımı, Aydın Merkez Halk Pazarı
46.	Yoğurt (Süzme)	Ev yapımı, Aydın Merkez Halk Pazarı
47.	Yoğurt (Süzme)	Ev yapımı, Aydın Merkez Halk Pazarı
48.	Yoğurt (Yarım Yağlı Süzme)	Mandıra 6

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Besiyerleri

MRS Broth (Merck)

Kazein pepton 10,0 g/L, Et özütü 10,0 g/L, Maya özütü 4,0 g/L, D (+) glukoz 20,0 g/L, Di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/L, Tween 80 1,0 g/L, Di-amonuyum hidrojen sitrat 2,0 g/L, Sodyum asetat 5,0 g/L, Magnezyum sülfat 0,2 g/L, Manganez sülfat 0,4 g/L

52,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür. 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanır. Stok kültürlerin aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

MRS Agar (Merck)

Kazein pepton 10,0 g/L, Et özütü 10,0 g/L, Maya özütü 4,0 g/L, D (+) glukoz 20,0 g/L, Di-potasyum hidrojen fosfat 2,0 g/L, Tween 80 1,0 g/L, Di-amonuyum hidrojen sitrat 2,0 g/L, Sodyum asetat 5,0 g/L, Magnezyum sülfat 0,2 g/L, Manganez sülfat 0,04 g/L, Agar-agar 14,0 g/L

66,2 g ortam 1 litre distile suda çözülür. 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanır. 45 ºC'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. 50 mg/L siklohegzimit içerecek şekilde hazırlanan MRS Agar plakları ilk izolasyonda kullanılmıştır. Siklohegzimit içermeyen MRS Agar plakları ise saflaştırma ve çalışmanın ilerleyen safhalarında stok kültürlerin aktifleştirilmesinde kullanılmıştır.

LSM Broth

%90 Iso-Sensitest^{TM} Broth (Oxoid) + %10 MRS Broth (Merck) (Klare vd.,2005).

Iso-Sensitest^{TM} Broth (Oxoid) 21,06 g, MRS Broth (Merck) 5,22 g tartılır ve 1 litreye tamamlanır. Belirtilen oranlarda hazırlanan modifiye besiyeri, 121ºC' de 15 dakika otoklavlanır. Agar dilüsyon yönteminde başlangıç kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

LSM Agar

%90 Iso-Sensitest^{TM} Broth (Oxoid) + %10 MRS Broth (Merck) + Toplam hacmin % 1,5' u kadar Agar (Fluka) (Klare vd.,2005).

Iso-Sensitest^{TM} Broth (Oxoid) 21,06 g, MRS Broth (Merck) 5,22 g ve 15 g Agar (Fluka) tartılır ve 1 litreye tamamlanır. Belirtilen oranlarda hazırlanan modifiye besiyeri, 121 ºC'de 15 dakika otoklavlanır. 45 ºC'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülür. Agar dilisyon yönteminde antibiyotikli besiyerlerinin hazırlanmasında ve Got's inaktivasyon testinde kullanılmıştır.

Çözeltiler

% 0,1' lik Peptonlu Su Çözeltisi

0,1 g Pepton (Lab M) 100 mL distile suda çözdürülür. Sterilizasyon için 121 ºC' de 15 dakika otoklavlanır. İzolasyon aşamasında seyreltme sıvısı olarak kullanılmıştır.

% 0,9' luk Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (FTS)

0,9 g NaCI (Riedel-de Haën)100 mL distile su içerisinde çözülür. Sterilizasyon için 121 ºC' de 15 dakika otoklavlanır. Agar Dilüsyon Yönteminde inokülumları standardize etmek için kullanılmıştır.

Siklohegzimit Çözeltisi (50mg/mL), (Sigma)

0,5 g/L olarak hazırlanan steril stok çözeltiden 40 mL alınarak, 360 mL' lik MRS Agar içeren steril besiyerlerine eklenmiştir. Sonuçta final konsantrasyon 50 mg/L olmuştur.

% 3' lük Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Çözeltisi

3 mL H_2O_2 100 mL balon jojeye konduktan sonra distite su ile 100 mL tamamlanır. Katalaz testi için kullanılmıştır.

% 20'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), (Sigma)

20 g SDS (Sigma) tartılarak 100 mL steril distile suda çözdürülür. DNA izolasyonunda lizis işlemi için kullanılmıştır.

Proteinaz K (20 mg/ml), (Sigma)

20 mg Proteinaz K tartılarak 1 mL steril distile suda çözdürülür. DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Sodyum Asetat (3 M pH 5.5)

Toz haldeki Sodyum Asetattan (Sigma) 3 M' lık çözelti hazırlanır ve pH glasiyel asetik asit ile 5.5' e ayarlanır. DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Lizis Tamponu (pH 8.0)

Tris-HCl (Riedel-de Haën), (50 mM); 0,79 g, EDTA (Sigma) (20 mM);0,74 g, Glukoz (Sigma); 0,99 g.

Önce Tris-HCl sonra EDTA çözülür ve üzerine glukoz ilave edilir. Son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözülür. 0,1 M NaOH ile pH 8.0'e ayarlanır. DNA izolasyonunda bakteri hücrelerini parçalamak amacıyla kullanılmıştır.

5X TBE Tamponu

Tris-baz (Sigma); 54 g/L, Borik asit (Riedel-de Haën) 27,5 g/L, EDTA.2H_2O; (Sigma) 3,72 g/L.

Tampon içeriğindeki maddeler tartıldıktan sonra, distile su ile hacim 1 litreye tamamlanır, pH 8.13-8.30'a ayarlanır. 5 kat seyreltilerek agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforezde tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

% 1'lik ve % 1,5' luk Agaroz Jel (Sigma)

1 g / 1,5 g agaroz üzerine 100 mL 1X TBE tamponu eklenir ve mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale getirilir. Soğutulduktan sonra 5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) eklenerek elektroforez tankına

dökülür. Genomik DNA'ları ve PCR ürünlerini elektroforezde görüntülemek için kullanılmıştır.

6X Yükleme Tamponu

% 0,015 Bromfenol Mavisi, % 0,015 Xylene Cyanol FF, % 30 Gliserol.

0,015 g Bromfenol Mavisi ve 0,015 g Xylene Cyanol FF tartılarak üzerine 30 mL Gliserol eklenir. Steril distile su ile 100 mL' ye tamamlanır. Elektroforezde, DNA ve PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesinde kullanılmıştır.

Skim Milk Çözeltisi (Fluka)

20 g Skim milk, 100 mL distile suda çözüldükten sonra, 118 ºC'de 10 dakika otoklavlanır. İzolat stoklarının -20 ve -80 ºC'de muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.

Gram'ın Kristal Viyole Boyası

Kristal viyole; 2,0 g, Alkol (%95'lik); 20 mL, Amonyum oksalat; 0,80 g, Distile su; 80 mL.

Kristal viyole alkolde; Amonyum oksalat distile suda çözülür ve iki çözelti karıştırılır. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer vd., 1984).

İyot Çözeltisi

İyot; 1,0 g, Potasyum iodine; 2,0 g, Distile su; 300 mL.

Potasyum iodine ve iyot porselen kapta dövülerek karıştırılır. Üzerine distile su eklenerek karışıtırılır. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer vd., 1984).

Gram Safranin Boyası

Safranin; 0,25 g, Etanol (%95'lik); 10 mL, Distile su; 100 mL.

0,25 g safranin, etanolde çözülür, üzerine distile su eklenir. Filtre kağıtından süzülür. Gram boyamada kullanılmıştır (Tamer vd., 1984).

3.2. Yöntem

3.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu

Alınan örnekler aseptik koşullarda 25 g olacak şekilde tartılıp, 225 mL % 0,1' lik steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilmiştir. Sıvı halde olan kefir örneklerinden ise steril pipet yardımıyla 25 mL alınarak yine 225 mL % 0,1' lik steril peptonlu su çözeltisinde homojenize edilmiştir. Her örnek % 0,1' lik steril peptonlu su içeren tüplerde 1/10 olacak şekilde ardışık olarak seyreltilmiştir. Her bir seyreltmeden 0.1 mL alınarak 50 mg/L siklohegzimit içeren MRS agar petrilerine yayma ekim yapılmıştır. 35 ^{o}C'de anaerob koşullarda (Anaerocult A Gas Generating System Sigma) 48 saat inkübe edilen kültürlerden koloniler seçilerek saflaştırılmıştır (Azadnia ve Nazer, 2009).

3.2.1.1. Morfolojik Özellikler

Gram Boyama

İzolatların, Gram özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, Gram boyamaları yapılmıştır. Bunun için, ilk izolasyon evresinde saflaştırılan kültürlerden (24 saatlikten az) lam üzerine, distile su ile yayılarak, preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar, havada kurutularak, ateşte fikse edildikten sonra, Gram'ın kristal viyole boyası ile 1 dakika boyanmış ve distile su ile yıkanmıştır. Havada kurutulduktan sonra, iyot çözeltisi ile 1 dakika muamele edilen preparatlar, distile su ile yıkanıp, tekrar havada kurutulmuştur. Daha sonra alkol (% 95) ile 15 saniye muamele edilip en son Gram'ın safranin boyası ile 30 saniye boyanmıştır. Distile su ile yıkandıktan sonra havada kurutulan preparatlar mikroskopta (Olympus CX21FS1, Japan), 100x'lik immersiyon objektifinde incelenmiştir. Laktik Asit Bakterileri Gram pozitif özellik taşıdığı için Gram Pozitif olan izolatlar seçilmiştir.

3.2.1.2. Biyokimyasal Özellikler

Katalaz Testi

İzolatların katalaz enzimine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla ilk izolasyon esnasında saflaştırılan izolatlar temiz bir lam üzerine alınıp % 3'lük H_2O_2 çözeltisi damlatılmıştır. Gaz kabarcıklarının oluşumu katalaz testi

açısından pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Tamer vd., 1984). Laktik Asit Bakterileri Katalaz negatif olduklarından katalaz negatif olan izolatlar seçilmiştir.

İlk etapta Gram pozitif ve katalaz negatif olduğu belirlenen koloniler laktik asit bakterileri olarak saflaştırılmıştır ve stok kültürleri ADÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuarında skim milk içinde -20 °C'de muhafaza edilmektedir.

3.2.2. Laktik Asit Bakterilerinden Genomik DNA İzolasyonu

Laktik asit bakterilerinin genomik DNA'ları Ronimus vd. (1997)'nın fenol-kloroform yöntemi (modifiye edilerek) ve InstaGene Matrix DNA izolasyon kiti (Bio-rad) ile izole edilmiştir.

Fenol-kloroform yönteminde, öncelikle izolatların, MRS agar ortamında anaerobik koşullarda 48 saatlik kültürleri hazırlanmıştır. Bu kültürlerden, steril plastik öze yardımıyla birkaç koloni alınarak, içinde 500 µL lizis tamponu bulunan eppendorf tüplerinde süspanse edilmiştir. 10 saniye vorteks yapılan örnekler, 13.000 rpm' de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmış ve tüplerdeki pellet üzerine 75 µL lizozim (20 mg/ml) ve 425 µL lizis tamponu eklenmiştir. Tüpler alt-üst edilerek karıştırılmış ve 37 ºC'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. 25 µL SDS (%20'lik) eklenerek 37 ºC'de 30 dakika daha inkübe edilmiştir. Daha sonra 10 µL Proteinaz K ile muamele edilen örnekler, 50 ºC'de 1 saat bekletilmiştir. Tüplere (v/v) olacak şekilde fenol: kloroform: izoamil alkol (Riedel-de Haën) karışımından eklenmiş ve 13 000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üstteki berrak faz toplanarak 1/10 (v/v) oranında Na-asetat (3 M, pH 5.5) eklenmiş ve tüpler alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Tekrar eşit hacimde (v/v) olacak şekilde isopropanol eklenerek -20 ºC' de 30 dakika bekletilen tüpler 13 000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılarak pelletin üzerine 500 µL etil alkol (%70) eklenmiştir. 15 000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenen örneklerden süpernatant tekrar atılmış ve tüpler 50 ºC lik etüvde tutularak alkol uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 100 µL steril distile su eklenmiş ve bir gece 37 ºC'de DNA'nın çözünmesi için inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA'lar kullanılana kadar -20 ºC'de muhafaza edilmiştir. Genomik DNA'yı görüntülemek amacıyla örneklerin % 1'lik agarozda elektroforezi

yapılmıştır (Thermo EC330). Elektoroforez sonunda, DNA bantlarını görüntülemek için (UVP LM-20E) cihazı kullanılmıştır.

InstaGene Matrix DNA izolasyon kiti (Bio-rad) ile, içinde 1 mL steril su bulunan eppendorf tüplerine izolatlardan birer koloni alınarak süspansiyon yapılmıştır. 10000 - 12000 rpm' de 1 dakika santrifüjlenen örneklerden süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 200 µl InstaGene Matrix eklendikten sonra 56 ºC'de 15-30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra yüksek devirde 10 saniye vortekslenen örnekler, 100 ºC'de 8 dakika inkübe edilmiştir. Tekrar yüksek devirde 10 saniye vortekslenen örnekler 10.000-12.000 rpm de 2-3 dakika santrifüjlenmiştir. İzole edilen DNA'lar kullanılana kadar -20 ºC'de muhafaza edilmiştir. Kullanılmadan önce her seferinde yüksek devirde 10 saniye vortekslenip, 10000 - 12000 rpm de 2-3 dakika santrifüjlenmiştir. İşlem sonucunda DNA kaynağı olarak üstteki berrak faz kullanılmıştır.

İzole edilen DNA' lar 16S rRNA analizlerinde ve antibiyotik direnç genlerinin taranmasında kullanılmıştır.

3.2.3. Toplam Genomik DNA' nın Kantitatif ve Kalitatif Tayini

İzole edilen DNA' ların kantitatif tayini ADÜ Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarında Nano Spektrofotometre (Thermo NanoDrop *2000/2000c*) ile yapılmıştır. Cihazın çalışma prensibine göre, 1µL DNA ile absorbanslar ölçülmüştür. 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri ile aşağıdaki formül kullanılarak DNA' ların konsantrasyonları hesaplanmıştır.

$$\mathbf{C_{DNA} = OD_{260\ nm} \times SK \times 50}$$

OD: Optik Dansite (260 nm'de okunan absorbans değeri)

SK: Sulandırma katsayısı

50: 260 nm'de 1 optik dansitenin içerdiği DNA miktarı

İzole edilen DNA'ların son konsantrasyonları 50 µL'de 20 ng olacak şekilde standart hale getirilmiştir.

A260 ve A280 nm'de ölçülen absorbans değerlerinden yararlanılarak DNA örneklerinin kalitatif tayini yapılmıştır. A260/A280 oranı 1,8 ile 2 arasında olan DNA' lar kullanılabilir olarak kabul edilmiştir (Turner vd., 2004).

3.2.4. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rDNA Yöntemi İle Tanılanması

LAB' nin genomik DNA'ları izole edildikten sonra 16S rDNA geni 20F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') ve 1390R (5'- GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3') primerleri kullanılarak yaklaşık 1300 baz çiftlik bölge PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonu karışımı Çizelge 3.2.' deki gibi hazırlanmıştır.

16S rRNA geni için kullanılan PCR koşulları 94 ºC'de 5 dakikalık ön denaturasyon, 94 ºC'de 30 sn denaturasyon, 55 ºC'de 30 sn bağlanma ve 72 ºC'de 1dakika 30 sn uzamadan oluşan 35 döngülük amplifikasyon ve 72 ºC'de 15 dakikalık final uzamadan oluşacak şekilde programlanmıştır (Bioer Life Express TC-96 / G/ H (b) Thermal Cycler).

Çizelge 3.2. 16S rRNA genini çoğaltmak için hazırlanan PCR karışımı.

Reaktifler (Konsantrasyon)	**Hacim**
PCR buffer (10x, +KCI, -MgCI2)	5 µL
MgCI2 (25 mM)	4 µL
dNTP(10 mM)	1 µL
Primer F (20 pMol)	1 µL
Primer R (20 pMol)	1 µL
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,4 µL
Steril distile su	36,1 µL
DNA (20ng/µL)	1,5 µL
TOPLAM:	**50 µL**

PCR ürünlerinden 5 µL alınarak üzerine 2 µL 6X yükleme tamponu eklenmiş ve örnekler, %5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) içeren, % 1,5' luk agoraz jelde, 80 voltta, 45 dakika yürütülmüştür. Baz büyüklüğü tespiti için, 1 kb'lık marker (Fermentas GeneRuler^{TM}) kullanılmıştır. Dizi analizi için Macrogen Firmasına (Kore) gönderilen örneklerin sekans sonuçları gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide

BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homolojiler belirlenmiştir.

3.2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Antimikrobiyal özellikli ilaçlara karşı duyarlılık, birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerde, genellikle ilaçların inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemlerin başında katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri, disk difüzyon yöntemi, gradiyent difüzyon (E-test) yöntemi ve antimikrobiyal maddeleri inaktive eden enzimlerin saptanması (Gots' Testi) yöntemi gelebilir (Gülay, 2002).

İzole edilen LAB suşlarında antibiyotik direncini belirlemek üzere tetrasiklin, vankomisin, kloramfenikol, gentamisin, siprofloksasin, eritromisin, ampisilin, meropenem, teikoplanin ve linkomisin antibiyotikleri kullanılmıştır. Bunun için agar dilüsyon yöntemi tercih edilmiştir.

3.2.5.1. Agar Dilüsyon Yöntemi

Stok Solüsyonların Hazırlanması

Antimikrobiyal ajanlar etkinliğini (potensi) sertifikalandırmış firmalardan temin edilmiştir. Hazırlanacak antibiyotiğin etkinliği % 100' den az ise başlangıç tartımında bu fark gözönüne alınarak, stok antibiyotik solüsyonları 100 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır ve çalışma süresince -20º C' de saklanmıştır (Tetrasiklin her seferinde anlık hazırlanmıştır).

Antimikrobiyal ajanların çözücüleri ve sulandırıcıları CLSI (Vol. 27 No:2 p 33-34) tarafından önerilen şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Antimikrobiyal ajanların çözücüleri ve sulandırıcıları.

Antimikrobiyal Ajan	Çözücü	Sulandırıcı
Ampisilin	Fosfat Tamponu, pH:8.0,0.1 mol/L	Fosfat Tamponu, pH: 6.0, 0.1 mol/L
Eritromisin	%95 Ethanol	Su
Gentamisin	Su	Su
Kloramfenikol	%95 Ethanol	Su
Linkomisin	Su	Su
Meropenem	Su	Su
Siprofloksasin	Süspansiyon halde	Su
Teikoplanin	Su	Su
Tetrasiklin	Su / DMSO	Su
Vankomisin	Su	Su

Antimikrobiyal Ajanların Konsantrasyon ve Dilüsyon Hesapları

Antibiyotik konsantrasyonları 0-128 µg/mL aralığında (sadece Siprofloksasin 0-64 µg/mL aralığında) olacak şekilde hazırlanmıştır.

128µg/mL' lık en yoğun seyreltme stoğunu hazırlamak için;

V x **C** x **F** = **W**

V: İlk seyreltme tüpündeki sulandırıcının hacmi

C: İstenilen final konsantrasyon (128 µg/mL, Siprofloksasin için 64 µg/mL)

F: Herbir petri için kullanılacak agarın final hacmi

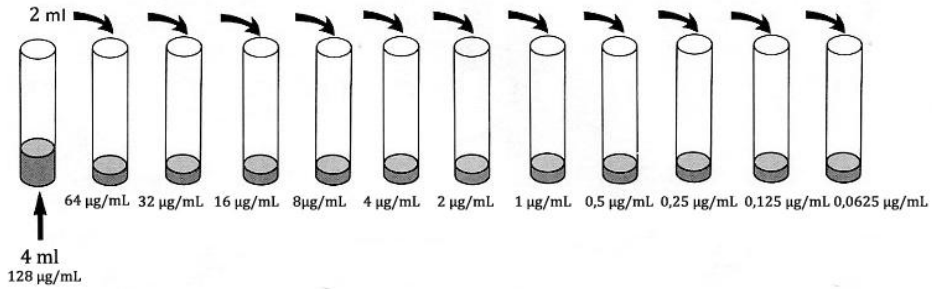
W: Hacim başına düşen antibiyotik miktarı

Örnek olarak;

4 mL **x** 128 µg/mL **x** 20 mL = 10240 µg/mL

Stoklarımız 100 mg/mL olduğu için, ilk seyreltme tüpü olan ve içinde 4 mL steril distile su bulunan tüpten 102,40 µL suyu uzaklaştırdıktan sonra 102,40 µL antibiyotik stoğundan (100 mg/mL' lik) eklenmiştir.

Dilüsyonlar; her bir antibiyotik için, 1 adet 4 mL steril distile su içeren tüp ve 11 adet 2 mL steril distile su içeren tüp serileri önceden hazırlanmıştır. Yukarıdaki örnekteki gibi her bir antibiyotik için hazırlanan 4 mL' lik 128 µg/mL konsantrasyona sahip tüplerden 2' şer mL alınıp Şekil 3.1.' de gösterildiği gibi 128 µg/mL' den 0,0625 µg/mL' ye kadar seyreltmeler yapılmıştır. Siprofloksasin, konsantrasyonu 128 µg/mL' den az olan bir çözelti halinde temin edildiğinden dolayı, seyreltmesi 64 µg/mL' den 0,0625 µg/mL' ye kadar yapılmıştır.



Şekil 3.1. Seyreltme serileri.

Antibiyotikli Besiyerlerinin Hazırlanması

Çalışmamızda LAB için antibiyotik MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu) değerlerini saptamakta kullanılan ve literatürde tavsiye edilen (Klare vd., 2005). LSM besi yeri kullanılmıştır. Daha önceden üzerlerine antibiyotik isimlerinin ve konsantrasyonlarının yazıldığı boş steril petrilere, hazırlanan antibiyotik seyreltmelerinden 1'er mL dağıtılmıştır.

LSM besiyeri 'Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler' başlığı altında belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri, 19 mL' ye ayarlanmış ve otoklavda 121 ºC' de 15 dakika steril edilmiş dispanser yardımıyla antibiyotik seyreltmeleri bulunan petrilere dökülmüştür (Şekil 3.2.).

Şekil 3.2. Antibiyotikli besiyerlerinin hazırlanışı.

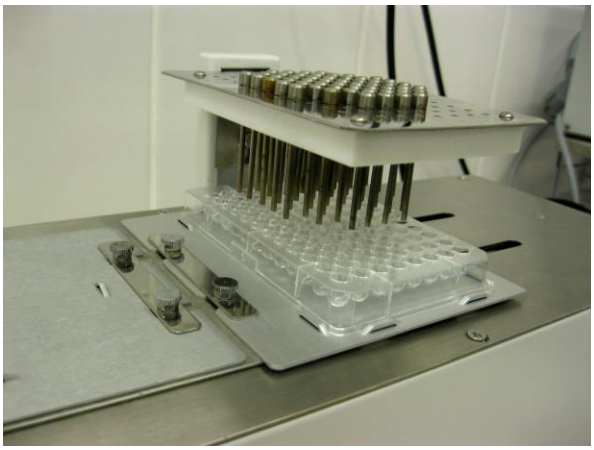
Hazırlanan antibiyotikli besiyerlerinin uzun süre saklanmadan kullanılması gerekmektedir. Özellikle Tetrasiklin içeren besi yerleri hazırlanır hazırlanmaz kullanılması tercih edilmelidir. Saklama işlemi ise karanlıkta ve 2-8 ºC' de 4 günü geçmeyecek şekilde yapılmalıdır.

Multipoint İnokülatör Kullanımı İçin Yapılan Ön Hazırlıklar

Başlangıç kültürleri hazırlanırken, MRS Agarda aktifleştirilmiş olan izolatlardan tek koloni alınıp, steril eppendorf içerisindeki 1 mL LSM Broth ortamına ekim yapılmıştır. Eppendorflar, 35 ºC' de gecelik inkübasyona bırakılmıştır.

İnokülum süspansiyon konsantrasyonunu hazırlanırken, antibiyotikli besi yerlerine, her örnekten 1-2 x 10^4 CFU/mL değerinde bakteri olacak şekilde ekim yapılacağı göz önüne alınmalıdır.

Bizim kullandığımız multipoint inokülatörün inokülatör başlıkları 2 µL' lik damlacıklar halinde ekim yapmaktadır (Şekil 3.3.). Final konsantrasyon olarak 1-2 x 10^4 CFU/mL değerini elde edebilmek için, gecelik inkübasyon sonucunda kültürlerin yaklaşık olarak 1-2 x 10^9 CFU/mL değerinde olduğu kabul edilir. Bu doğrultuda gecelik kültürlerden 100 kat seyreltme yapılıp bu değer 1-2 x 10^7 CFU/mL değerine çekilmiştir.



Şekil 3.3. Multipoint inokülatörün inokülatör başlıkları.

İnokülatör başlıklarının her seferinde 2 µL' lik damlacık alıp ekim yapacağı ve bu işi birçok kez gerçekleştireceği hesaplanmıştır. Bu yüzden, multipoint inokülatöre yerleştirilecek olan ve içinde inokulum bulunan plate içerisine, hazırlanan 1-2 x 10^7 CFU/mL değerindeki bakteri süspansiyonlarından 200 µL yükleme yapılmıştır. Bu işlem sonucunda 10^7 CFU/mL değer, 2 x 10^6 CFU/mL değerine inmiştir. İnokülatör başlıklarının antibiyotikli besiyerlerine 2 µL' lik ekim yapması sonucunda, inokulum için final değer 2 x 10^4 CFU/mL olarak elde edilmiştir.

Multipoint İnokülatörün Kullanımı

ADÜ Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan otomatik Multipoint İnokülatör Şekil 3.4.'de gösterilmiştir.

Şekil 3.4. Otomatik multipoint inokülatör.

Ekim işlemlerine başlamadan önce kontaminasyonu engellemek için inokülatör başlıkları 121 ºC' de 15 dakika otoklavlanmıştır. Ekim esnasında da kontaminasyonu engellemek için inokülatör başlıkları özellikle farklı antibiyotikli besiyerine geçildiğinde % 70' lik Etil alkole batırılıp, ateşte yakıldıktan sonra soğutulup işleme devam edilmiştir.

Hazırlanan antibiyotikli petrilere, en küçük dilüsyondan büyük dilüsyona doğru ekim yapılmıştır. Buna göre ilk olarak kontrol petrisine (içinde antibiyotik bulunmayan LSM Agar), en son da en yüksek konsantrasyona sahip petriye her örnekten 2 x 10^4 CFU/mL olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekimlerden sonra petriler sarsılmadan kapakları üstte olacak şekilde kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra anaerobik koşullarda (Anaerocult A Gas Generating System Sigma) 35 ºC' de 48 saat inkübasyona bırakılmışlardır.

3.2.5.2. MİK Sonuçlarının Yorumlanması

16S rRNA analizine göre tanıları yapılan LAB izolatlarının MİK değerlerine göre antibiyotik dirençlilikleri yorumlanırken ağırlıklı olarak, European Commission 2003 ve EFSA 2008 raporlarında yer verilen antibiyotik sınır değerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.).

Lactococcus, Leuconostoc ve *Streptococcus* türlerinin siprofloksasin antibiyotiği için MİK değerleri Hummel vd. (2007)' ye göre, *Lactobacillus* türleri içinde Danielsen ve Wind (2003)' e göre yorumlanmıştır.

Meropenem ve teikoplanin antibiyotikleri için ise ≥8 µg/ml olan MİK değerlerinde bakteri "orta düzeyde dirençli", 32 µg/ml'nin üzerindeki değerlerde ise bakteri antibiyotiğe "klinik olarak dirençli" kabul edilmiştir (Walsh, 2003; Daimmo vd., 2007).

Çizelge 3.4. European Commission 2003 antibiyotik sınır değerleri (≥).

Antibiyotik	*Enterococcus faecium*	*Enterococcus faecalis*	*Pediococcus*	*Lactobacillus*
Ampisilin	8	8	2	2**
Streptomisin	1024	1024	32	16
Kanamisin/Neomisin	1024	1024	32	32
Gentamisin	500	500	4	1
Kloramfenikol	16	16	16	16
Tetrasiklin	16	16	16	16
Eritromisin	4	4	4	4
Kinupristin/Dalfopristin	4	R	4	4
Vankomisin	8	8	R	4**
Trimetoprim	8	8	16	32
Sipro/Enrofloksasin	4	2	16	4**
Linezolid	4	4	4	4
Rifampin	4	4	8	32

** *Bazı türleri doğal dirençli.*

Çizelge 3.5. EFSA 2008 antibiyotik sınır değerleri (>).

	Ampisilin	Vankomisin	Gentamisin	Kanamisin	Streptomisin	Eritromisin	Klindamisin	Quinupristin + dalfopristin	Tetrasiklin	Kloramfenikol
Lactobacillus obligate homofermentative	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
Lactobacillus helveticus	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
Lactobacillus acidophilus group	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
Lactobacillus delbrueckii	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
Lactobacillus obligate heterofermentative	2	n.r.	16	16	64	1	1	4	8	4
Lactobacillus reuteri	2	n.r.	8	16	64	1	1	4	16	4
Lactobacillus fermentum	1	n.r.	16	32	64	1	1	4	8	4
Lactobacillus facultative heterofermentative*	4	n.r.	16	64	64	1	1	4	8	4
Lactobacillus plantarum	2	n.r.	16	64	n.r.	1	1	4	32	8
Lactobacillus rhamnosus	4	n.r.	16	64	32	1	1	4	8	4
Lactobacillus paracasei	2	n.r.	32	64	n.r.	1	1	4	4	4
Bifidobacterium	2	2	64	n.r.	128	0.5	0.25	1	8	4
Enterococcus	4	4	32	512	128	4	4	4	2	8
Pediococcus	4	n.r.	16	64	64	1	1	4	8	4
Leuconostoc	2	n.r.	16	16	64	1	1	4	8	4
Lactococcus lactis	2	4	32	64	64	2	4	4	4	8
Streptococcus thermophilus	2	4	32	64	64	2	2	4	4	4
Bacillus spp	n.r.	4	4	8	8	4	4	4	8	8
Propionibacterium	2	4	64	64	64	0.5	0.25	0.5	2	2
Diğer Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	0.5	2	2

* *Lactobacillus salivarius dahil.*

n.r.: Doğal dirençli.

3.2.5.3. Gots' Testi

Gots' testi, penisilinaz etkisini göstermek için Joseph S. Gots tarafından bulunan bir yöntemdir. Temel prensibi, antibiyotik varlığında çoğalmayan bir bakterinin bu antibiyotiği inaktive eden bir bakteri varlığında çoğalabilmesidir. Ortamdaki antibiyotik, inaktive edici enzim taşıyan bakteri tarafından etkisizleştirildiğinde indikatör bakteri çoğalabilir hale gelir (Bozdoğan, 2011).

Ampisilin, linkomisin, meropenem ve siprofloksasin antibiyotiklerine "inaktivasyon yoluyla direnç" varlığının belirlenmesi için Gots' testi kullanılmıştır. Bu dört antibiyotik için MİK değerleri 1 µg/mL ve üzerinde olan izolatlar seçilmiştir. Gots testinde indikatör mikroorganizma olarak *Micrococcus luteus* ATCC 9341 ve *E. coli* DH10B kullanılmıştır.

Siprofloksasine inaktivasyon yoluyla direnci belirlemek amacıyla indikatör bakteri olarak *E. coli* DH10B kullanılmıştır. LSM Agar petrileri üzerine, *E. coli* DH10B' den hazırlanan 0,5 MacFarland yoğunluğundaki süspansiyon steril eküvyon ile yayılmıştır (Şekil 3.5.). Kurumaya bırakıldıktan sonra bu petrilerin tam ortasına siprofloksasin (Oxoid 5 µg) diski yerleştirilmiştir. Ampisilin (Oxoid 10 µg), klindamisin (Oxoid 2 µg) ve meropenem (Oxoid 10 µg) antibiyotikleri için indikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* ATCC 9341 kullanılmıştır. Test edilecek LAB suşlarından steril öze ile birkaç koloni alınarak, petrinin ortasına konan antibiyotik diskinden başlayıp, petrinin kenarına doğru düz bir çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. Bir petriye dört farklı LAB izolatı ekilmiştir. Plaklar anaerobik koşullarda (Anaerocult A Gas Generating System Sigma) 35 ºC' de 48 saat inkübe edildikten sonra inaktivasyon varlığı araştırılmıştır.

Şekil 3.5. İndikatör bakteri süspansiyonlarının steril eküvyon ile yayılması.

3.2.6. Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin Genotipik Olarak Belirlenmesi

Çalışmamızda izole edilen Laktik Asit bakterilerinde, MİK değerlerine bakılmaksızın antibiyotik direnç genlerinin varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır. PCR için kullanılan antibiyotik direnç primerleri, amplikon uzunlukları ve PCR koşulları Çizelge 3.6.' da verilmiştir. Vankomisine doğal dirençli kabul edilen LAB izolatlarında vankomisin direnci araştırılmamıştır.

Çizelge 3.6. Antibiyotik direnç primerleri, amplikon uzunlukları ve PCR koşulları.

Direnç Geni / Referans	**Primer (5′-3′)**	**Amplikon (bp)**	**Reaksiyon Koşulu**
Eritromisin			
erm (A) (**Sutcliff vd., 1996**)	**ermA1**:TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA **ermA2:**CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 30 saniye 52 ºC'de 45 saniye 72 ºC'de 2 dakika 30 Döngü 72 ºC'de 5 dakika
erm (B) (**Sutcliff vd., 1996**)	**ermB1:** GAAAAGGTACTCAACCAAATA **ermB2:** AGTAACCGTACTTAAATTGTTTAC	639	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 30 saniye 52 ºC'de 45 saniye 72 ºC'de 2 dakika 30 Döngü 72 ºC'de 5 dakika
erm (C) **(Sutcliff vd., 1996)**	**ermC1:** TCAAAACATAATATAGATAAA **ermC2:** GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	642	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 30 saniye 52 ºC'de 45 saniye 72 ºC'de 2 dakika 30 Döngü 72 ºC'de 5 dakika

Çizelge 3.6. devamı.

Direnç Geni / Referans	Primer (5′-3′)	Amplikon (bp)	Reaksiyon Koşulu
Gentamisin			
aac(6′) *aph*(2″) **(Rojo-Bezares vd., 2006)**	**aac(6′) aph(2″) F:** CCAAGAGCAATAAGGGCATA **aac(6′) aph(2″) R:** CACTATCATAACCACTACCG	220	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 30 saniye 60 ºC'de 45 saniye 72 ºC'de 2 dakika 30 Döngü 72 ºC'de 5 dakika
Kloramfenikol			
cat **(Çataloluk ve Gogebakan, 2004)**	**cat-TC F:** CATATCAAATGAACTTTAATA **cat-TC R:** CGTTTTGTGAAGTAGTACACT	718	94 ºC'de 5 dakika 94 ºC'de 1 dakika 52 ºC'de 1 dakika 72 ºC'de 2 dakika 30 Döngü 72 ºC'de 7 dakika
Tetrasiklin			
tet (K) **(Klare vd., 2007)**	**tetKI:** CAATACCTACGATATCTA **tetKII:** TTGAGCTGTCTTGGTTCA	352	95 ºC'de 1 dakika 94 ºC'de 30 saniye 50 ºC'de 30 saniye 72 ºC'de 30 saniye 30 Döngü 72 ºC'de 4 dakika

Çizelge 3.6. devamı.

tet (L) **(Werner vd., 2003)**	**tetLI:** TGGTCCTATCTTCTACTCATTC **tetLII:** TTCCGATTTCGGCAGTAC	385	94 ºC'de 5 dakika 94 ºC'de 30 saniye 54 ºC'de 30 saniye 72 ºC'de 1 dakika } 35 Döngü 72 ºC'de 5 dakika
tet (M) **(Werner vd., 2003)**	**tetMI:** GGTGAACATCATAGACACGC **tetMII:** CTTGTTCGAGTTCCAATGC	401	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 45 saniye 52 ºC'de 45 saniye 72 ºC'de 45 saniye } 25 Döngü 72 ºC'de 7 dakika
tet (S) **(Gevers vd., 2003)**	**tetS-FW:** ATCAAGATATTAAGGAC **tetS-RV:** TTCTCTATGTGGTAATC	573	94 ºC'de 5 dakika 94 ºC'de 1 dakika 55 ºC'de 1 dakika 72 ºC'de 2 dakika } 30 Döngü 72 ºC'de 10 dakika
tet (Q) **(Aminov vd., 2001)**	**tetQ-FW:** AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG **tetQ-RV:** CGGAGTGTCAATGATATTGCA	169	94 ºC'de 5 dakika 94 ºC'de 30 saniye 63 ºC'de 30 saniye 72 ºC'de 30 saniye } 25 Döngü 72 ºC'de 7 dakika

Çizelge 3.6. devamı.

Vankomisin			
van (A) **(Klein vd., 2000)**	**vanA-36F:** TTGCTCAGAGGAGCATGACG **vanA-992R:** TCGGGAAGTGCAATACCTGC	957	94 ºC'de 3 dakika 94 ºC'de 30 saniye 65 ºC'de 2 dakika 72 ºC'de 2 dakika (40 Döngü) 72 ºC'de 6 dakika
van (B) **(Klein vd., 2000)**	**vanB-23F:** TTATCTTCGGCGGTTGCTCG **vanB-1016R:** GCCAATGTAATCAGGCTGTC	994	94 ºC'de 3 dakika 94 ºC'de 30 saniye 62 ºC'de 2 dakika 72 ºC'de 2 dakika (40 Döngü) 72 ºC'de 6 dakika
van (C) **(Liu vd., 2009)**	**vanC-F:** CAGTGTCACTAACCTCAGCAGCCG **vanC-R:** TAGGATAACCCGACTTCCGCCA	934	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 30 saniye 64 ºC'de 45 saniye 72 ºC'de 1,5 dakika (30 Döngü) 72 ºC'de 5 dakika
van (X)	**vanXSACF:** CACTTCCCGAGCTCATTGACCGCTTG ATCG **vanXKPNR:** CCGAAAGAGGTACCTTATATAGTTTGTCCG	~740-750	95 ºC'de 5 dakika 95 ºC'de 30 saniye 60 ºC'de 30 saniye 72 ºC'de 1 dakika (30 Döngü) 72 ºC'de 10 dakika

Antibiyotik direnç genlerini aramada kullanılan PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir. PCR reaksiyonları 0.2 mL'lik tüplerde hazırlanarak her bir direnç geni için belirtilen PCR koşulları için Thermal dönüştürücü (Bioer Life Express TC-96 / G/ H (b)) programlanmıştır. Her reaksiyon için bir adet negatif kontrol, bir adet pozitif kontrol tüpü hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteriler ve taşıdıkları direnç genleri Çizelge 3.8.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Antibiyotik direnç genleri için kullanılan PCR karışımı.

Reaktifler (Konsantrasyon)	**Hacim**
PCR buffer (10x, +KCI, -MgCI2)	2,5 µL
MgCI2 (25 mM)	2 µL
dNTP(10 mM)	0,5 µL
Primer F (20 pMol)	0,5 µL
Primer R (20 pMol)	0,5 µL
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,2 µL
Steril distile su	17,8µL
DNA (20ng/µL)	1 µL
TOPLAM:	**25 µL**

Çizelge 3.8. Pozitif kontrol olarak kullanılan bakteriler ve taşıdıkları direnç genleri.

Bakteri	**Taşıdığı Direnç Geni**
E.coli DH10B + (pAT392)	*aac(6') aph(2'')*
S.aureus BC 68	*erm* (A)
E.faecium+ (*Tn*917)	*erm* (B)
S.aureus MRSA T 27	*erm* (C)
E.faecalis JH2-2+ (*Tn*916)	*tet* (M)
E.faecalis C125	*van* (A), *van* (X)
E.gallinarum 6222	*van* (C)

PCR ürünlerinden, 5µL alınarak üzerine 2µL 6X yükleme tamponu eklenmiş ve örnekler, %5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Inc.) içeren, % 1,5'luk agoroz jelde, 75 voltta, 45 – 60 dakika yürütülmüştür. Baz büyüklüğü

tespiti için, 1 kb'lık ve 100 bp' lık markerlar (Fermentas GeneRuler^{TM}) kullanılmıştır.

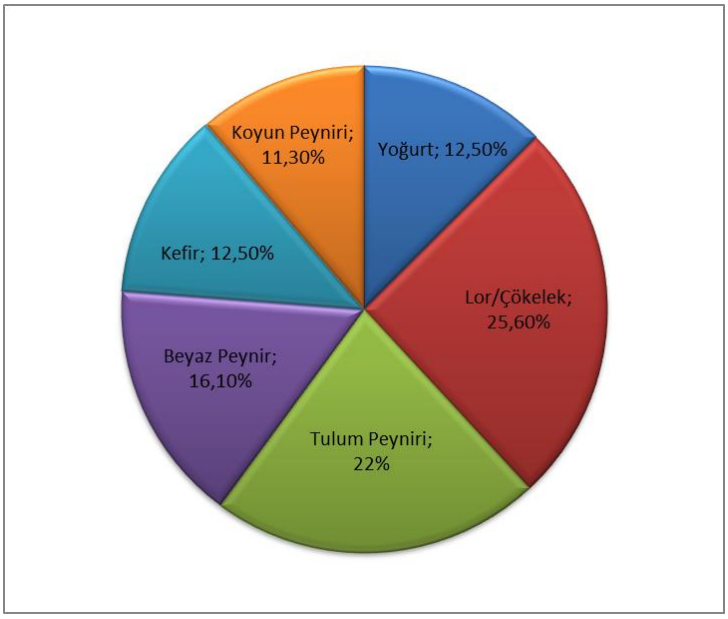
Dizi analizi için Macrogen Firmasına (Kore) gönderilen örneklerin sekans sonuçları gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homolojiler belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. LAB İzolasyonu Sonuçları

Araştırma kapsamında 48 farklı marka ve örnek materyalden Gram pozitif, katalaz negatif özellikte seçilen 168 adet LAB suşu izole edilmiştir. İzolatlar % 20'lik skim milk içeren cryo tüpler içerisinde ADÜ Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda -20 ºC'de muhafaza edilmektedir.

İzolatların elde edildiği kaynaklar Şekil 4.1.' de yüzde değer olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.1. İzolatların elde edildiği kaynaklar.

4.2. Laktik Asit Bakterilerinin Tanılanması

4.2.1. Laktik Asit Bakterilerinin Fenotipik Özellikleri

Çalışmada izole edilen LAB'ne ait koloniler mat veya parlak sarı, beyaz ya da krem renkli olup,1-5 mm çaplı ve uçları pürüzsüz ya da yıldız şeklindedir.

Gram boyama sonucu, Laktik Asit Bakterileri Gram pozitif özellik taşıdığı için Gram pozitif olan izolatlar seçilmiştir. İzolatların hücre morfolojisi uzun, kısa ya da kıvrık çubuk, kok ya da streptokok şeklindedir. İzolatların tümü katalaz negatif özelliktedir.

4.2.2. Laktik Asit Bakterilerinin 16S rRNA Analiziyle Tanılanması

İzolatların 16S rRNA'yı kodlayan gen bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Macrogen Firmasına (Kore) gönderilen örneklerin sekans sonuçları Bioedit programı yardımıyla okunmuştur. Diziler gen bankası (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinde yer alan Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) programı kullanılarak karşılaştırılmış ve homolojileri belirlenmiştir. Karşılaştırma sonucunda, izolatlar ile veritabanında bulunan diğer türler arasındaki homolojiler yüzde olarak Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Ayrıca izolatların türlere göre yüzde dağılımıda Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. LAB izolatlarının 16S rRNA analiz sonuçları.

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
1.	GLM 8	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain CH3	728	100%
2.	GLM 9	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038	1057	99%
3.	GLM 13	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	1100	99%
4.	GLM 14	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	1127	99%
5.	GLM 17b	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	921	99%
6.	GLM 18a	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	921	99%
7.	GLM 18b	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	921	99%
8.	GLM 24	*Lactobacillus casei* strain IMAUFB059	919	100%
9.	GLM 34	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	923	100%
10.	GLM 35	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL92	931	99%
11.	GLM 37	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain: NBRC 13953	1030	99%
12.	GLM 42	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain: NBRC 13953	922	99%
13.	GLM 43	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038	970	99%
14.	GLM 44a	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL37	969	99%
15.	GLM 44b	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038	648	99%
16.	GLM 49	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	965	99%
17.	GLM 52	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	956	99%
18.	GLM 53	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	1074	99%
19.	GLM 54	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	915	97%
20.	GLM 55	*Lactobacillus casei* strain NM68-3	462	99%
21.	GLM 56	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain E94	1038	99%
22.	GLM 58	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1042	99%
23.	GLM 59	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1062	99%
24.	GLM 60	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis strain* M-T-MRS_25	1089	99%

Çizelge 4.1. devamı.

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
25.	GLM 61	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis bv. diacetylactis*	998	99%
26.	GLM 62	*Lactobacillus acidophilus* strain IMAUFB058	1031	99%
27.	GLM 63	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain NM178-1	1027	99%
28.	GLM 64	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain NM178-1	962	99%
29.	GLM 65	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain NM178-1	1088	99%
30.	GLM 66	*Lactobacillus acidophilus* strain IMAUFB058	1004	99%
31.	GLM 67	*Lactobacillus acidophilus* strain IMAUFB058	1113	99%
32.	GLM 68	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	951	99%
33.	GLM 69	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis bv. diacetylactis*	996	99%
34.	GLM 70	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	991	99%
35.	GLM 71	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	935	99%
36.	GLM 72	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1094	99%
37.	GLM 73	*Leuconostoc mesenteroides* strain 32MgMLAF	1128	99%
38.	GLM 75	*Leuconostoc mesenteroides* strain CR1_1417	1153	99%
39.	GLM 76	*Lactobacillus kefiri* strain NWL78	1191	100%
40.	GLM 77	*Lactobacillus kefiri* strain NWL78	1030	100%
41.	GLM 78	*Leuconostoc mesenteroides* strain 32MgMLAF	1193	99%
42.	GLM 79	*Lactobacillus kefiri* strain NM180-3	1018	99%
43.	GLM 80	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	976	100%
44.	GLM 81	*Streptococcus lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1088	99%
45.	GLM 83	*Lactobacillus curvatus* strain: Ni998	1103	100%
46.	GLM 84	*Lactobacillus curvatus* strain X7-1b	1081	99%
47.	GLM 85	*Leuconostoc mesenteroides* strain 32MgMLAF	722	100%
48.	GLM 86	*Lactobacillus casei* strain IMAUFB059	976	99%

.

Çizelge 4.1. devamı

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
49.	GLM 87	*Leuconostoc mesenteroides* strain THK-D433	666	99%
50.	GLM 88	*Lactobacillus otakiensis* strain: YIT 11505	915	99%
51.	GLM 89	*Enterococcus durans* strain Qmac	807	98%
52.	GLM 90	*Lactobacillus casei* W56	982	99%
53.	GLM 91	*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis strain: NBRC 102622*	842	99%
54.	GLM 92	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	1078	99%
55.	GLM 93	*Lactobacillus rhamnosus* strain LCG SHARDINGER	1106	99%
56.	GLM 94	*Enterococcus hirae* strain L2	1121	99%
57.	GLM 95	*Lactobacillus paracasei* strain ATCC 25302	976	100%
58.	GLM 96	*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*	925	100%
59.	GLM 99	*Lactobacillus curvatus* strain: Ni998	885	99%
60.	GLM 100	*Lactobacillus kefiri* strain NWL78	816	100%
61.	GLM 101	*Lactobacillus uvarum* culture-collection IMAU:80777	939	99%
62.	GLM 102	*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* strain G18-4	1047	100%
63.	GLM 103	*Lactobacillus plantarum* strain AY01	971	99%
64.	GLM 104	*Lactobacillus plantarum* strain AY01	985	99%
65.	GLM 105	*Lactobacillus kefiri* strain: NBRC 15888	960	98%
66.	GLM 106	*Lactobacillus diolivorans* strain NM194-2	1051	99%
67.	GLM 107	*Lactobacillus alimentarius* strain: NBRC 106464	1162	99%
68.	GLM 108	*Lactobacillus alimentarius* strain NWL30	1151	99%
69.	GLM 109	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain S55-1	1144	99%
70.	GLM 110	*Lactobacillus kefiri* strain: NBRC 15888	910	100%
71.	GLM 111	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1118	100%

Çizelge 4.1. devamı.

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
72.	GLM 112	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1166	99%
73.	GLM 113	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1119	99%
74.	GLM 114	*Lactobacillus casei* strain WX214	1093	99%
75.	GLM 115	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1152	99%
76.	GLM 116	*Streptococcus lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1036	100%
77.	GLM 117	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1147	99%
78.	GLM 118	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	1073	99%
79.	GLM 119	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1095	99%
80.	GLM 120	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain KLDS 1.0631	852	97%
81.	GLM 121	*Pediococcus parvulus* strain: Ni555	719	97%
82.	GLM 122	*Lactobacillus casei* strain IMAUFB059	1031	98%
83.	GLM 123	*Lactobacillus kefiri* strain NM180-3	1116	99%
84.	GLM 124	*Pediococcus parvulus* strain: Ni555	1206	100%
85.	GLM 125	*Lactobacillus kefiri* strain NM180-3	1130	99%
86.	GLM 129	*Enterococcus gallinarum* strain IMAUFB099	1163	99%
87.	GLM 130	*Enterococcus faecium* strain JZ1-4	1167	99%
88.	GLM 131	*Enterococcus faecalis* strain DSPV 008SA	1201	99%
89.	GLM 132	*Enterococcus faecalis* strain OS13	1080	99%
90.	GLM 133	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1017	99%
91.	GLM 133a	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1084	99%
92.	GLM 134	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1135	99%
93.	GLM 135	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	782	99%
94.	GLM 136	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	809	98%
95.	GLM 137	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain: I042513	743	98%

Çizelge 4.1. devamı.

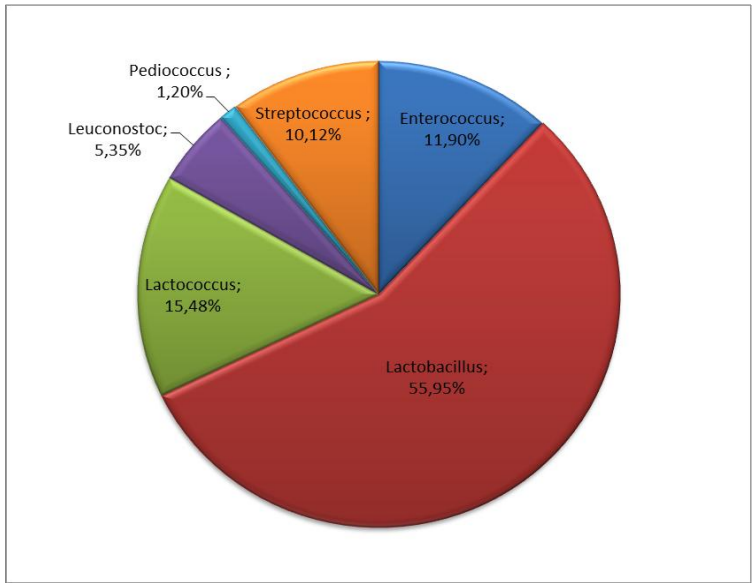
Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
96.	GLM 140	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain 47MoQuesillo	1054	100%
97.	GLM 141	*Leuconostoc mesenteroides* strain 32MgMLAF	1120	100%
98.	GLM 143	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	869	99%
99.	GLM 144	*Enterococcus faecium* strain LET 301	911	99%
100.	GLM 145	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	929	100%
101.	GLM 146	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	750	100%
102.	GLM 147	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	623	99%
103.	GLM 148	*Streptococcus lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1014	100%
104.	GLM 150	*Streptococcus lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1123	99%
105.	GLM 151	*Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198	1030	100%
106.	GLM 152	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain MNC38	710	99%
107.	GLM 154	*Lactobacillus curvatus* strain: Ni794	911	98%
108.	GLM 155	*Streptococcus lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1056	99%
109.	GLM 156	*Streptococcus lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	992	98%
110.	GLM 157	*Enterococcus gallinarum* strain IMAUFB099	1039	100%
111.	GLM 158	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	723	98%
112.	GLM 159	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	972	98%
113.	GLM 160	*Enterococcus faecium* strain LET 301	977	99%
114.	GLM 161	*Enterococcus faecium* strain LET 301	1074	99%
115.	GLM 162	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	943	100%
116.	GLM 164	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	1138	99%
117.	GLM 165	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	1101	99%
118.	GLM 166	*Lactobacillus helveticus* strain K1/R0052	1060	99%

Çizelge 4.1. devamı.

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
119.	GLM 167	*Lactobacillus fermentum* strain Chyla6	1102	99%
120.	GLM 168	*Enterococcus faecium* DO	936	99%
121.	GLM 169	*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* strain: Ni1467	978	99%
122.	GLM 170	*Lactobacillus casei* W56	849	98%
123.	GLM 172	*Lactobacillus brevis* strain T9	732	99%
124.	GLM 173	*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* strain G18-4	796	99%
125.	GLM 174	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain E94	1021	100%
126.	GLM 175	*Enterococcus faecium* strain MDF1104	723	99%
127.	GLM 176	*Enterococcus faecium* strain MDF1104	702	99%
128.	GLM 177	*Lactobacillus paracasei* strain: T2-2	771	99%
129.	GLM 178	*Enterococcus durans* strain Qmac	1066	98%
130.	GLM 179	*Enterococcus faecium* DO	944	99%
131.	GLM 180	*Lactobacillus gasseri* strain LBB 218	902	99%
132.	GLM 181	*Enterococcus faecalis* strain YZ65	1081	99%
133.	GLM 182	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	880	99%
134.	GLM 183	*Enterococcus faecalis* strain OS13	1084	99%
135.	GLM 184	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	943	98%
136.	GLM 185	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	969	99%
137.	GLM 186	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	1080	99%
138.	GLM 187	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	832	99%
139.	GLM 188	*Lactobacillus helveticus* strain K1/R0052	991	99%
140.	GLM 189	*Lactobacillus casei* strain IMAUFB059	781	100%
141.	GLM 190	*Lactobacillus fermentum* strain ZN7b-2	669	100%
142.	GLM 191	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ND02*	991	99%

Çizelge 4.1. devamı.

Sıra No	İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Karşılaştırılan baz sayısı	(%) Benzerlik
143.	GLM 192	*Enterococcus durans* strain Qmac	762	98%
144.	GLM 193	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	685	99%
145.	GLM 194	*Lactobacillus fermentum* strain 104MgMLAF	889	99%
146.	GLM 195	*Enterococcus faecalis* strain OS13	1131	99%
147.	GLM 197	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	1120	99%
148.	GLM 198	*Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198	1171	99%
149.	GLM 199	*Lactobacillus delbrueckii* strain: JCM 1014	861	100%
150.	GLM 201	*Lactobacillus coryniformis* strain: CB5	1099	99%
151.	GLM 202	*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* strain: Ni1467	1171	99%
152.	GLM 203	*Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* strain: Ni1467	982	99%
153.	GLM 204	*Lactobacillus curvatus* strain: Ni998	916	99%
154.	GLM 205	*Enterococcus faecium* strain LET 301	977	99%
155.	GLM 206	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	1074	99%
156.	GLM 207	*Streptococcus macedonicus* strain WX301	657	99%
157.	GLM 208	*Lactobacillus plantarum* strain AY01	1108	99%
158.	GLM 209	*Lactobacillus plantarum* strain AY01	1055	99%
159.	GLM 210	*Lactobacillus casei* strain lm45	696	99%
160.	GLM 212	*Lactobacillus casei* strain IMAUFB059	1048	99%
161.	GLM 213	*Lactobacillus casei* strain Ycu1	989	99%
162.	GLM 215	*Lactobacillus casei* strain IMAUFB059	1141	99%
163.	GLM 216	*Lactobacillus fermentum* strain LAB-10	1117	99%
164.	GLM 217	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	905	100%
165.	GLM 218	*Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198	1138	99%
166.	GLM 219	*Lactobacillus fermentum* strain NS9	1133	99%
167.	GLM 220	*Lactobacillus rhamnosus* strain CNCM I-4036	1143	100%
168.	GLM 221	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	1150	99%



Şekil 4.2. İzolatların türlere göre yüzde dağılımı.

LAB'nin izolasyon verilerine bakıldığında en büyük izolat yüzdesi (% 25,6) lor/çökelek örneklerinden elde edilirken, bunu sırasıyla tulum peyniri (% 22), beyaz peynir (% 16,10), yoğurt (% 12,5), kefir (% 12,5) ve koyun peyniri (% 11,3) örnekleri izlemiştir.

İzolatların 16S rRNA sekans analiz sonuçlarına göre, % 55,95'i *Lactobacillus*, % 15,48'i *Lactococcus*, % 11,90'ı *Enterococcus* cinsine dahil bulunmuştur. *Streptococcus* (% 10,12), *Leuconostoc* (% 5,35) ve *Pediococcus* (% 1,20) cinsi üyelerine ise daha az rastlanmıştır.

En fazla LAB çeşitliliği tulum peyniri ve lor/çökelek örneklerinde gözlenmiş olup, yoğurt örneklerinden ise sadece *Lactobacillus* cinsine ait türler izole edilmiştir. Beyaz peynir ve kefir örneklerinin floralarında *Lactococcus* cinsi yaygın iken (sırasıyla % 37,03 ve % 42,85), tulum peyniri, lor/çökelek ve koyun peyniri örneklerinin floralarında ise *Lactobacillus* cinsi (sırasıyla % 62,16, % 65,11 ve %78,94) baskındır.

Azadnia ve Khan (2009), İrandaki farklı bölgelerden içilebilen yoğurt örnekleri toplayıp bu örneklerden morfolojik, kültürel, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanarak LAB izolasyonu yapmışlardır. 18 içilebilen yoğurt örneğinden toplamda 673 LAB izolasyonu yapılmışlardır ve bunların 117' sini (% 17.38) kok, 556 tanesi ise (% 82.62) basil olarak belirlemişlerdir. Ayrıca yaptıkları biyokimyasal testler sonucunda 52 izolat (% 44.44) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 65 izolat (% 55.56) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, 85 izolat (% 15.3) *Lactobacillus helveticus*, 124 izolat (% 22.3) *Lactobacillus plantarum*, 117 izolat (% 21) *Lactobacillus brevis*, 86 izolat (% 15.5) *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ve 144 izolat (% 25.9) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* olarak tanılanmıştır. Araştırmacılar, sırasıyla *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*' un en baskın türler olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma LAB' nin içilebilir yoğurtlarda starter kültür ve koruyucu olarak kullanımı adına örnek olmuştur. Bununla birlikte bu bakterilerin genetik yapılarıda dikkate alınarak uygun starter kültürler dizayn edilip kullanılabilirliği belirtilmiştir.

LAB' nin fermente ürünlere tat, koku ve geleneksellik katması üzerine yapılan çalışmalara bir örnek olarak da, Navidghasemizad vd. (2009) yapmış oldukları çalışma verilebilir. Koyun sütünden elde edilen Lighvan peynirinden izole edilen

laktik asit bakterilerine dahil 413 adet izolattan 87'si *Enterococcus faecium*, 68'i *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, 55'i *Enterococcus feacalis* ve 48 tanesi *Lactobacillus plantarum* olarak tanılamıştır. Özellikle olgunlaştırılmış peynirlerde *E. faecium, Lc. lactis* ve *Lb. plantarum'*un baskın olarak bulunduğu belirtilmiştir.

LAB' nin gıdalarda starter kültür olarak kullanımlarına ilişkin ülkemizde yapılan güncel çalışmalara örnek olarak, Kök Taş vd. (2011)' nin araştırması gösterilebilir. Kefir tanelerinin farklı oranlarda mikroflora içerdikleri belirtilmiştir. Çalışmada üç farklı üniversitede üretilen kefir tanelerinin mikrofloralarını PCR yöntemi ile belirlemek amaçlanmıştır. Buna göre yapılan çalışmalar sonucunda kefir tanelerinde; *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus helveticus, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum* ve (bir maya olan) *Kluyveromyces marxianus kefir* türleri tanılanmıştır. Sonuç olarak geleneksel kefir üretiminde kullanılan kefir tanelerinin doğal starter kültür olarak LAB içerdiği ve özellikle *Lactobacillus* spp. barındırdığı belirtilmiştir. Ayrıca *B. bifidum* bakterisinin kefir tanelerindeki varlığı da ilk kez belirlenmiştir.

4.3. Farklı Cinslere Dahil Laktik Asit Bakterisi İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Antibiyotik Dirençlilikleri

Tez çalışması kapsamında LAB izolasyonu ve tanısı yapıldıktan sonra fenotipik antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre tüm LAB izolatlarında en yüksek direnç linkomisin (% 25,59) antibiyotiğine karşı bulunmuştur. Bu değeri sırasıyla tetrasiklin (% 19,04), meropenem (% 16,66), ampisilin (% 16,16), gentamisin (% 7,14), eritromisin (% 5,35), siprofloksasin (% 5,35), kloramfenikol (% 4,16) ve vankomisin (% 3,06) antibiyotikleri izlemektedir. Teikoplanin antibiyotiğine direnç gözlenmemiştir. Çalışamamızda izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direnç durumları denenen antibiyotik ve LAB cinsi/türüne göre büyük oranda değişkenlik göstermektedir.

Tatlı (2009) tarafından yapılan çalışmada, LAB izolasyonu için geleneksel olarak üretilen çeşitli süt ürünleri piyasadan temin edilmiştir. Analize alınan 15 beyaz peynir örneğinden, 23 LAB izole edilmiş ve bu suşların % 53'ü vankomisine, 21'i gentamisine % 31'i siprofloksasine, % 12'si eritromisine, % 3'ü kloramfenikole ve % 3'ü rifampisine dirençli, % 28'i ise test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. 20 yoğurt örneğinden 23 LAB

izole edilmiştir, suşların % 52'si vankomisine, % 22'si siprofloksasine, % 22'si gentamisine, % 4'ü eritromisine ve tetrasikline dirençli olarak bulunmuştur ve bu suşların % 30'unun tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları belirlenmiştir. 10 tulum peyniri örneğinden ise, 18 LAB izole edilmiştir suşlardan % 58'i vankomisine, % 37'si siprofloksasine, % 26'sı gentamisine, % 11'i eritromisine ve % 5'i tetrasikline dirençli olarak bulunurken, %28 'i tüm antibiyotiklere duyarlılık göstermiştir. 3 çökelek örneğinden izole edilen 5 LAB'a ait suşlardan % 80'i vankomisine, % 40'ı gentamisine ve siprofloksasine, % 20'si ise eritromisine dirençli olarak bulunmuştur. Araştırmada 1 kefir örneğinden izole edilen 2 LAB suşlarının her ikisi de vankomisine dirençli bulunurken, suşlardan biri gentamisine, diğeri eritromisine dirençli olarak bulunmuştur. Analize alınan bir kaymak örneğinden tek bir laktik asit bakterisi izole edilmiştir ve test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlılık gösterdiği bulunmuştur. Tez çalışmamızda izole edilen LAB türlerinin pek çoğunun vankomisine doğal dirençli olduğu düşünülürek, izolatlarımızdaki gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol direncinin bahsedilen çalışma ile benzerlik taşıdığı söylenebilir.

Liu vd. (2009), günümüzde ticari olarak gıda ve ilaçlarda katkı maddesi şeklinde kullanılan LAB' ni tanılamışlardır ve izole edilen suşların probiyotik özelliklerinin ve fermantasyonda kullanılabilirliğinin analizini yapmışlardır. Antibiyotik dirençliliği disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile 41 izolatta taramışlardır. Dirençli suşlar seçilerek direnç geni varlığı PCR yöntemiyle incelenmiştir. Bütün izolatlar kloramfenikol, tetrasiklin, ampisilin, amoksisilin-klavulanat asit, sefalotin ve imipeneme duyarlı bulunmuştur. Ayrıca izolatlar vankomisin, rifampisin, streptomisin, basitrasin ve eritromisine dirençli bulunmasına rağmen bu antibiyotiklere direnç, olması gerekenden daha düşük bulunmuştur. Buna karşın bazı suşlar siprofloksasin, amikasin, gentamisin ve trimetoprim sülfametaksazole dirençli çıkmıştır. *Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum, Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* suşlarında *msr* (C), *van* (X), ve *dfr* (A) genleri bulunmuştur.

Pan vd. (2011), 11 tane Çin fermente gıdasından, klinik açıdan önemli yedi antibiyotiğe (kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklin, siprofloksasin, ampisilin, klindamisin ve eritromisin) karşı direnç araştırmak için LAB izolasyonu yapmışlardır. Antibiyotiklere dirençli olarak bulunan LAB yaygın olarak, geleneksel Çin fermente gıdalarda ve sıklıkla çiğ materyalden imal edilmiş

gıdalarda tespit edilmiştir. Direnç etkisi fermente sebzelere oranla, fermente sucuklarda/sosislerde daha fazla bulunmuştur.

Nawaz vd. (2011), Çin Xi'da fermente gıdalardan izole ettikleri LAB' nde fenotipik ve moleküler analizlerle antibiyotik dirençlilik analizi yapmışlardır. İzole edilen LAB suşlarında (84) yapılan 16S rRNA gen analizi sonucu suşlar *Lactobacillus* (n = 73) ve *Streptococcus thermophilus* (n = 11) olarak belirlenmiştir. Bütün suşlar ampisilin, basitrasin ve sefsulodine duyarlı ve nalidiksik asit, kanamisin ve vankomisine (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus* ve *S. thermophilus* dışındakiler) doğal dirençli bulunmuştur. Bazı suşların penisillin (n = 2), eritromisin (n = 9), klindamisin (n = 5) ve tetrasikline (n = 14) dirençli oldukları görülmüştür.

4.3.1. *Enterococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları

Çalışmada izole edilen *Enterococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri, European Commission 2003, EFSA 2008 raporları ve D'aımmo, (2007) ve Walsh (2003) ' de belirtilen antibiyotik sınır değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca her antibiyotik için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ (µg/mL) değerleri belirlenip Çizelge 4.3.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. *Enterococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Enterococcus*			**4**	**4**	**32**	**8**	**4[1]**	**8[4], 32[5]**	**4[2], 2[3]**	**8[4], 32[5]**	**2**	**4**
Lor,Market	GLM 89	*E. durans* strain Qmac	2	≤0,0625	2	2	≤0,0625	0,125	2	≤0,0625	2	0,25
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 178	*E. durans* strain Qmac	1	0,125	4	8	0,5	8	0,5	0,125	0,25	0,5
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 192	*E. durans* strain Qmac	2	0,125	8	8	1	16	0,5	≤0,0625	0,5	0,5
Beyaz Pey., Market	GLM 131	*E. faecalis* strain DSPV 008SA	2	0,25	32	4	32	2	0,5	≤0,0625	0,5	0,5
Beyaz Pey., Market	GLM 132	*E. faecalis* strain OS13	4	1	≥128	8	64	4	2	≤0,0625	0,5	2
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 183	*E. faecalis* strain OS13	4	1	64	4	16	8	2	≤0,0625	32	1
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 195	*E. faecalis* strain OS13	4	1	64	8	32	4	4	≤0,0625	1	1
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 181	*E. faecalis* strain YZ65	2	0,5	32	4	≥128	2	2	≤0,0625	0,5	1
Tulum Pey.,Market	GLM 168	*E. faecium* DO	0,5	4	16	4	2	1	2	0,125	0,125	1
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 179	*E. faecium* DO	2	0,125	8	8	0,5	8	0,5	≤0,0625	0,5	0,5
Beyaz Pey., Market	GLM 130	*E. faecium* strain JZ1-4	4	4	16	4	64	8	0,5	0,125	0,5	0,5
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 144	*E. faecium* strain LET 301	1	1	16	4	16	1	2	≤0,0625	0,25	1
Tulum Pey.,Market	GLM 160	*E. faecium* strain LET 301	2	2	8	8	0,5	8	4	≤0,0625	0,125	0,5

Çizelge 4.2. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Enterococcus*			**4**	**4**	**32**	**8**	**4[1]**	**8[4], 32[5]**	**4[2], 2[3]**	**8[4], 32[5]**	**2**	**4**
Tulum Pey.,Market	GLM 161	*E. faecium* strain LET 301	2	2	32	4	0,5	8	4	0,125	0,25	0,5
Koyun Pey., Market	GLM 205	*E. faecium* strain LET 301	4	2	32	4	0,5	16	4	0,25	0,25	1
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 175	*E. faecium* strain MDF1104	1	2	8	4	2	0,5	1	0,125	0,25	0,5
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 176	*E. faecium* strain MDF1104	1	2	8	4	32	2	2	0,25	1	0,5
Beyaz Pey., Market	GLM 129	*E. gallinarum* strain IMAUFB099	4	0,25	8	4	≤0,0625	2	2	0,125	0,25	8
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 157	*E. gallinarum* strain IMAUFB099	4	0,5	8	4	32	2	2	≤0,0625	0,5	8
Lor, Market	GLM 94	*E. hirae* strain L2	0,5	32	16	8	64	1	1	0,25	0,5	0,125

Antibiyotik sınır değerleri µg/mL cinsindendir. E: Enterococcus. [1]EFSA, (2008), Klindamisin. [2] European Commission, (2003), E. faecium.(Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [3] European Commission, (2003), E. faecalis.(Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [4]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Orta derecede dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [5]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003) Dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil değil).

Çizelge 4.3. *Enterococcus* cinsleri için MİK $_{50}$ / MİK $_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.

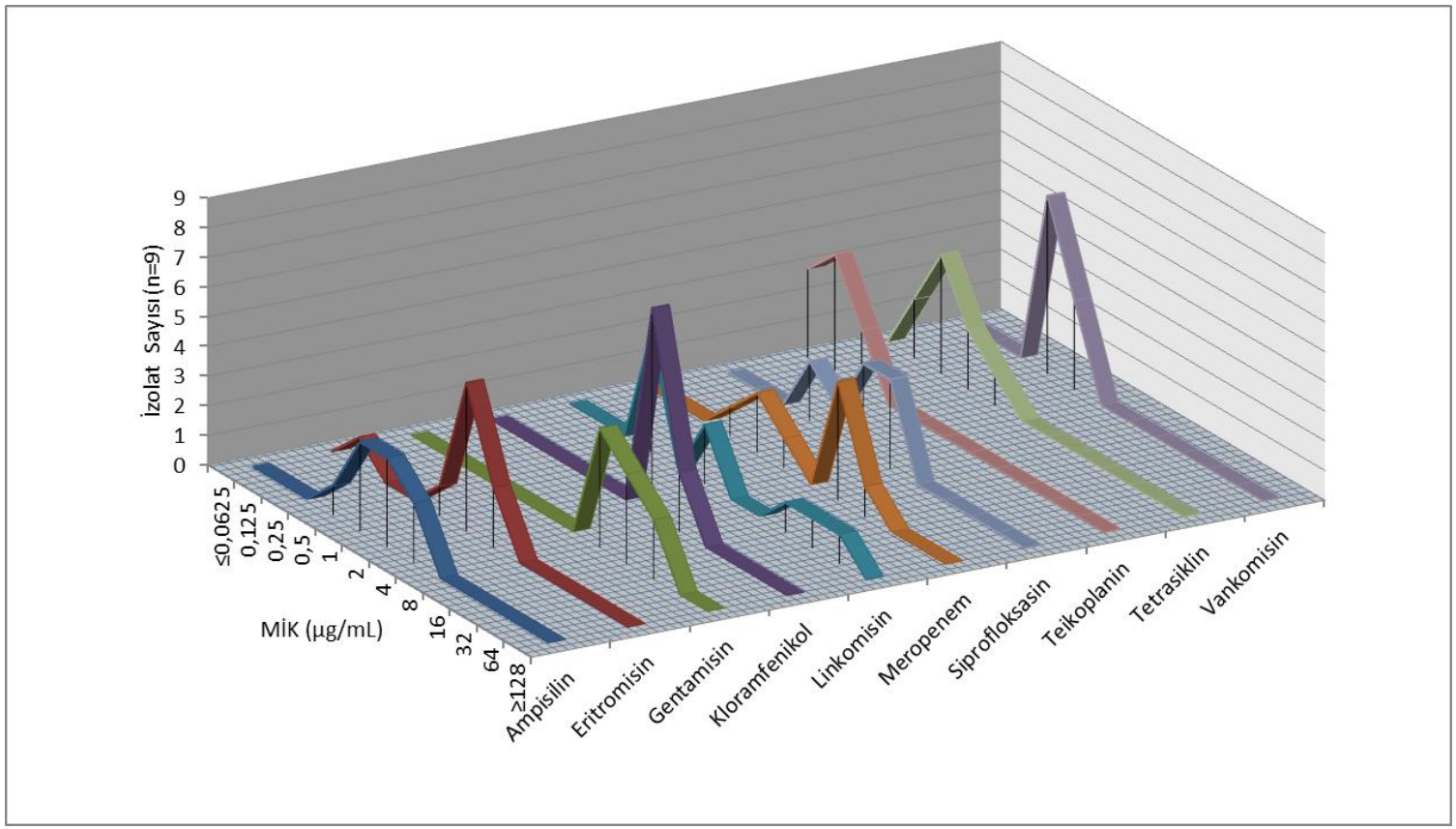
***Enterococcus* cinsleri için MİK $_{50}$/MİK $_{90}$**				**Dirençli İzolat Sayısı ve Yüzdesi***
Antibiyotikler	**MİK Aralığı (µg/mL)**	**MİK$_{50}$ (µg/mL)**	**MİK$_{90}$ (µg/mL)**	
Ampisilin	0,5 - 4	2	4	20 / 0 / %0
Eritromisin	≤0,0625 - 32	1	4	20 / 1 / %5
Gentamisin	2 - 128	16	64	20 / 3 / %15
Kloramfenikol	2 - 8	4	8	20 / 0 / %0
Linkomisin	≤0,0625 - ≥128	16	64	20 / 10 / %50
Meropenem	0,125 - 16	2	8	20 / 8 / %40
Siprofloksasin	0,5 - 4	2	4	20 / 8 / %40
Teikoplanin	≤0,0625 - 0,25	≤0,0625	0,25	20 / 0 / %0
Tetrasiklin	0,125 - 32	0,5	1	20 / 10 / %5
Vankomisin	0,125 - 8	0,5	2	20 / 2 / %10

**Toplam örnek sayısı / dirençli örnek sayısı / yüzde değeri (%)*

Bakterilerdeki doğal ve kazanılmış direnç arasındaki ayrımı belirlemek, kazanılmış direnç aktarılabilir olduğu için önemlidir. MİK değerlerinin ve dağılımlarının analizi bu iki direnç mekanizmasının ayırt edilmesine yardım eder. Bir antibiyotik için eğer ki direnç mekanizması yoksa tek bir bakteri türünde MİK değerlerinin dağılımı istatistiki olarak normal (unimodal) bir grafik vermelidir. Kazanılmış direncin söz konusu olduğu durumlarda elde edilen grafik bimodal tarzda olacaktır.

Tez çalışmamızda izole edilen LAB'nde kazanılmış direnç varlığını belirlemek üzere tek bir türden oluşan bazı izolatların MİK dağılımları grafiklendirilmiştir. Çoğu tür izolat sayısı az olduğu için bu açıdan değerlendirilmemiştir.

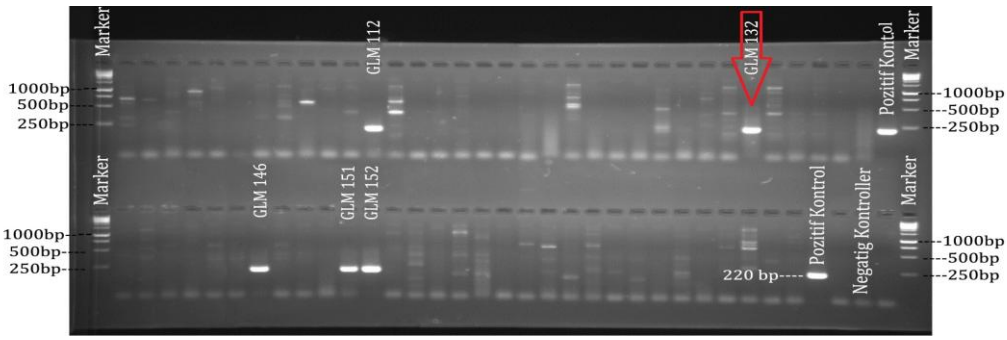
E. faecium suşlarının MİK dağılım grafiğine bakıldığında eritromisin, linkomisin, siprofloksasin ve meropenem antibiyotikleri için kazanılmış direnç olası görülmektedir. Diğer antibiyotiklerin MİK değerleri ise grafikte de görüldüğü gibi unimodal bir dağılım göstermektedirler (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *E. faecium* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı.

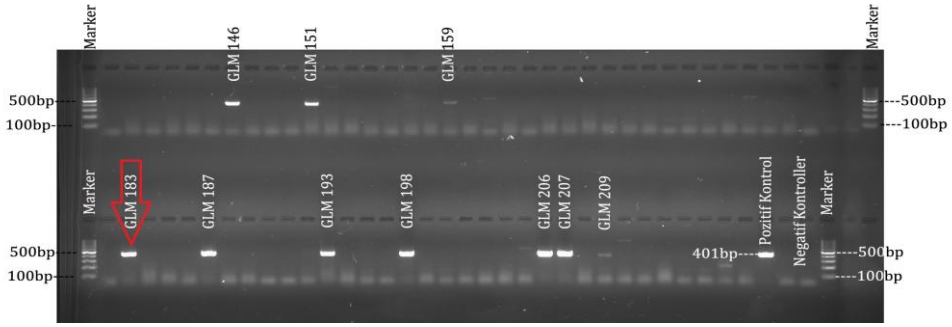
4.3.2. *Enterococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları

aac (6′) *aph* (2″) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 20 adet *Enterococcus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 132) *aac* (6′) *aph* (2″) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.4.). *aac* (6′) *aph* (2″) fragmanı yaklaşık 220 bp uzunluğundadır. *aac* (6′) *aph* (2″) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. coli* DH10B (pAT392) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.4.' te verilmiştir.



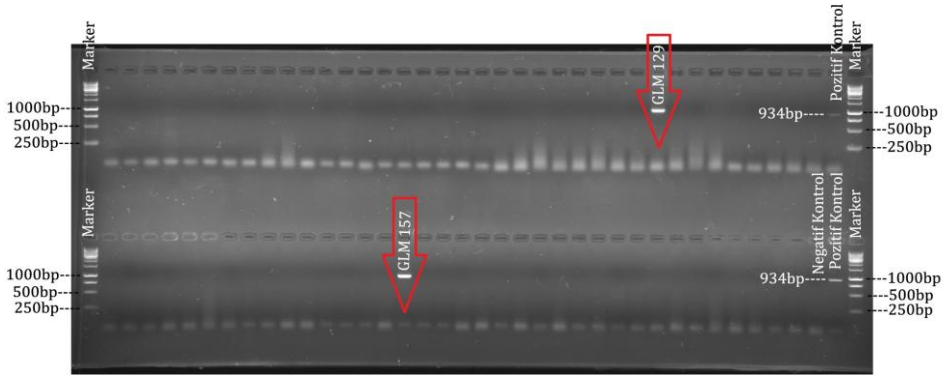
Şekil 4.4. GLM 132 izolatında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü.

tet (M) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 20 adet *Enterococcus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 183) *tet* (M) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.4.). *tet* (M) fragmanı yaklaşık 401 bp uzunluğundadır. *tet* (M) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. faecalis* JH2-2+(*Tn*916) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.5.'te verilmiştir. Elde ettiğimiz *tet* (M) amplikonunun sekans sonucu veritabanlarındaki *tet* (M) gen dizileri ile % 99 oranında homoloji göstermektedir.



Şekil 4.5. GLM 183 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü.

E. gallinarum ve *E. casseliflavus* türlerine özgü olan *van* (C) geni (Leclercq vd., 1992), *van* (C) primerleri kullanılarak 20 adet *Enterococcus* cinsi izolat taranmıştır. *E. gallinarum* olan 2 izolatta (GLM 129 ve GLM 157) *van* (C) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.4.). *van* (C) fragmanı yaklaşık 934 bp uzunluğundadır. *van* (C) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. gallinarum* 6222 suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.6. 'de verilmiştir. Elde ettiğimiz *van* (C) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *van* (C) gen dizileri ile % 100 oranlarında homoloji göstermektedir.



Şekil 4.6. GLM 129 ve GLM 157 izolatlarında saptanan *van* (C) geninin jel görüntüsü.

Çizelge 4.4. *Enterococcus* izolatlarında saptanan direnç genleri.

İzolat No	**16S rRNA Sonucu**	***aac* (6′) *aph* (2′′)**	***tet* (M)**	***van* (C)**
GLM 132	*E. faecalis* strain OS13	+		
GLM 183	*E. faecalis* strain OS13		+	
GLM 129	*E. gallinarum* strain IMAUFB099			+
GLM 157	*E. gallinarum* strain IMAUFB099			+

Enterococcus cinsi 20 izolatta *cat*, *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *tet* (K), *tet* (L), *tet* (S), *tet* (Q), *van* (A), *van* (B) ve *van* (X) bölgeleri taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir.

Enterokoklar, diğer LAB gibi geleneksel fermente gıdalarda büyük öneme sahip olmalarına rağmen, yıllardır daha çok "fırsatçı patojen" özellikleriyle anılırlar (Clementi ve Aquilanti, 2011). Gıdalardaki LAB ve kazanılmış antibiyotik direnciyle ilgili sistematik çalışmalar oldukça azdır. Fırsatçı patojen enterokoklar üzerine pek çok veri bulunurken, laktokok ve laktobasiller ile ilgili raporlar nispeten sınırlıdır.

Çalışmamızda izole edilen enterokokların tümünün kloramfenikol, teikoplanin ve ampisiline duyarlı olduğu bulunmuştur. En yüksek antibiyotik dirençlilikleri ise linkomisin (% 50), siprofloksasin (% 40), meropenem (% 40) ve gentamisin (% 15), olarak belirlenmiştir. Bunları sırasıyla vankomisin (% 10), eritromisin (% 5) ve tetrasiklin (% 5) direnci izlemektedir. Vankomisine dirençli iki enterokok suşunda *van* (C) geni saptanırken, gentamisin ve tetrasikline dirençli bulunan GLM 132 ve GLM 183 izolatlarında sırasıyla *aac* (6′) *aph* (2″) ve *tet* (M) genleri bulunmuştur.

Gıda orjinli enterokok suşlarıyla (özellikle *E. faecium* ve *E. faecalis*) yapılan çalışmalarda, çiğ et, fermente süt ve et örneklerindeki enterokokların fenotipk antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır (Klein vd., 1998; Quednau vd., 1998; Knudtson ve Hartman, 1993; Robrido vd., 2000; Davies ve Roberts, 1999; Teuber ve Perreten, 2000; Franz vd., 2001; Batish ve Ranganathan, 1986; Giraffa, 2002). Araştırıcıların bulgularına göre gıdalardaki enterokoklar çoğunlukla ampisilin ve vankomisine duyarlı da olsalar, yüksek oranda çoklu antibiyotik direncine rastlanmaktadır. Bizim çalışmamızda da 4 *E. faecalis*, 4 *E. faecium*, 1 *E. gallinarium* ve 1 *E. hirae* suşunda çoklu antibiyotik direnci saptanmıştır. Başka bir çalışmada, Portekiz'deki süt ve peynir örneklerinden izole edilen enterokoklar gentamisin direnci açısından araştırılmıştır (Lopes vd., 2003). Enterokoklar, genelde düşük düzeyde gentamisine doğal dirençli olarak düşünülse de, pek çok süt ürünü izolatında yüksek oranda gentamisin direnci saptanmıştır. Donabedian vd. (2003), hayvan, insan ve gıda kökenli enterokok izolatlarında gentamisin direncinin moleküler mekanzimasını değerlendirmiştir. Coğrafik olarak farklı alanlardaki insan, gıda ve çiftlik hayvanlarının gentamisin direnci benzerlikler taşımaktadır ve enteroklardaki gentamisin direncinin gıdalar yoluyla hayvanlardan insanlara geçtiğine dair kanıtlar vardır.

Huys vd. (2004), Avrupa'daki peynirlerden izole edilen enterokoklarda tetasiklin direncinin *tet (*M) geniyle bağlantılı olduğunu ve izolatların aynı zamanda *Tn*916-*Tn*1545 ailesine dahil konjugatif transpozon içerdiğini belirtmişlerdir.

Çıtak vd. (2004) ,Türk beyaz peynirlerindeki *Enterococcus* türlerinin streptomisin, eritromisin ve oksasiline dirençli olduğunu, vankomisin direncinin *E. faecalis* suşlarında % 96,8, *E. faecium* suşlarında ise % 76 oranında saptandığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda araştırmacılar, peynirlerin üretimi ve işlenmesi sırasında sanitizasyon koşullarının zayıf olduğunu ve bu durumun tüketiciler açısından önemli bir sağlık riski oluşturduğuna dikkat çekmişlerdir.

Frazzon vd. (2010), Brezilya'nın güneyindeki gıda örneklerinden *Enterococcus* izolasyonu yapmışlar ve antibiyotik dirençliliklerini araştırmışlardır. Suşların tümü vankomisine duyarlı bulunurken, yüksek oranda tetrasiklin ve eritromisin direnci bildirmişlerdir. En sık rastlanan genotip ise *tet* (L) geni ile birlikte ya da tek başına *tet* (M) geni olarak bulunmuştur.

4.3.3. *Lactobacillus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları

Çalışmada izole edilen *Lactobacillus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri EFSA 2008 raporu, Walsh (2003), D'aımmo, (2007), Danielsen ve Wind (2003)' de belirtilen antibiyotik sınır değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca her antibiyotik için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ (µg/mL) değerleri belirlenip Çizelge 4.6.' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. *Lactobacillus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Homofermentatif			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**2**
Tulum Pey., Market	GLM 166	*Lb. helveticus* strain K1/R0052	0,5	≤0,0625	4	2	2	0,25	32	0,125	1	0,5
Tulum Pey., Mandıra	GLM 188	*Lb. helveticus* strain K1/R0052	≤0,0625	≤0,0625	4	2	0,125	0,25	16	0,125	1	0,5
Kefir, Market	GLM 62	*Lb. acidophilus* strain IMAUFB058	2	≤0,0625	4	2	0,5	0,25	32	0,125	1	0,25
Kefir, Market	GLM 66	*Lb. acidophilus* strain IMAUFB058	2	≤0,0625	2	2	1	0,5	16	≤0,0625	1	0,25
Kefir, Market	GLM 67	*Lb. acidophilus* strain IMAUFB058	2	≤0,0625	2	2	1	0,5	16	0,125	1	0,25
Tulum Pey., Mandıra	GLM 199	*Lb. delbrueckii* strain: JCM 1014	1	≤0,0625	4	2	1	≤0,0625	1	≤0,0625	2	0,25
Yoğurt, Mandıra	GLM 9	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038	0,25	≤0,0625	1	2	≤0,0625	0,125	16	≤0,0625	0,125	0,5
Yoğurt, Mandıra	GLM 43	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038	0,25	≤0,0625	0,5	2	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	0,5	0,5

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Homofermentatif			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**2**
Yoğurt, Market	GLM 44b	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038	0,25	≤0,0625	4	2	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	0,5	0,25
Lor, Market	GLM 92	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	2	≤0,0625	8	8	0,5	0,25	8	0,125	2	0,25
Tulum Pey., Mandıra	GLM 185	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	2	1	64	4	16	≤0,0625	2	0,125	32	0,25
Tulum Pey., Mandıra	GLM 186	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	4	≤0,0625	4	2	2	≤0,0625	4	0,125	1	0,25
Koyun Pey., Mandıra	GLM 221	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	2	≤0,0625	4	2	≤0,0625	0,25	8	0,125	2	0,5
Tulum Pey., Mandıra	GLM 191	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02	0,125	≤0,0625	2	2	2	≤0,0625	4	0,125	2	0,25
Yoğurt, Mandıra	GLM 8	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain CH3	0,25	≤0,0625	1	2	≤0,0625	0,25	16	≤0,0625	0,125	0,25

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Homofermentatif			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**2**
Yoğurt, Market	GLM 44a	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL37	0,25	≤0,0625	2	2	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	0,5	0,25
Yoğurt, Mandıra	GLM 13	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,125	≤0,0625	4	2	≤0,0625	≤0,0625	16	≤0,0625	4	0,25
Yoğurt, Mandıra	GLM 14	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	≤0,0625	≤0,0625	2	1	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	1	0,25
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 34	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,25	≤0,0625	1	2	≤0,0625	≤0,0625	16	≤0,0625	0,5	0,5
Yoğurt, Market	GLM 49	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,25	1	0,25	4	32	≤0,0625	0,25	0,5	16	1

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Homofermentatif			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**2**
Yoğurt, Market	GLM 52	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,125	≤0,0625	0,5	1	≤0,0625	≤0,0625	4	≤0,0625	0,25	0,25
Yoğurt, Market	GLM 53	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	0,5	0,125
Lor, Mandıra	GLM 118	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	1	≤0,0625	1	4	2	0,125	2	≤0,0625	0,125	0,25
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 17b	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,125	≤0,0625	1	2	≤0,0625	≤0,0625	16	≤0,0625	1	0,5
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 18a	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,125	≤0,0625	0,5	1	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	0,5	0,5

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Homofermentatif			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**2**
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 18b	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,125	≤0,0625	0,5	1	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	1	0,5
Yoğurt, Market	GLM 54	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL80	0,125	≤0,0625	1	1	≤0,0625	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 35	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain NWL92	0,25	≤0,0625	1	2	≤0,0625	≤0,0625	16	≤0,0625	1	0,5
Lor, Mandıra	GLM 109	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain S55-1	2	≤0,0625	1	2	0,5	0,125	0,5	≤0,0625	1	0,25
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 37	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain: NBRC 13953	0,25	≤0,0625	0,5	2	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	0,25	0,5

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Homofermentatif			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**2**
Yoğurt, Halk Pazarı/Ev yapımı	GLM 42	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain: NBRC 13953	0,25	≤0,0625	1	2	≤0,0625	≤0,0625	8	≤0,0625	0,125	0,5
Lor, Market	GLM 91	*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* strain: NBRC 102622	0,25	≤0,0625	4	2	1	≤0,0625	4	≤0,0625	2	0,125
Lor, Mandıra	GLM 96	*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*	1	≤0,0625	2	2	2	0,125	4	0,125	2	0,25
Tulum Pey., Mandıra	GLM 180	*Lb. gasseri* strain LBB 218	1	≤0,0625	16	4	2	1	64	0,25	2	1
Lor, Mandıra	GLM 101	*Lb. uvarum* culture-collection IMAU:80777	2	≤0,0625	0,125	2	≤0,0625	0,5	0,5	4	0,5	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Heterofermentatif			**2**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Tulum Pey., Market	GLM 172	*Lb. brevis* strain T9	8	0,5	4	4	8	0,5	32	≥128	16	≥128
Koyun Pey., Market	GLM 201	*Lb. coryniformis* strain: CB5	1	0,125	1	≤0,0625	1	≤0,0625	4	≤0,0625	16	0,25
Çökelek, Mandıra	GLM 102	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens* strain G18-4	1	0,5	4	4	1	2	4	≥128	32	≥128
Tulum Pey., Mandıra	GLM 173	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens* strain G18-4	1	0,25	2	4	0,25	1	2	≥128	4	≥128
Tulum Pey., Market	GLM 169	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens* strain: Ni1467	2	0,25	1	4	0,25	1	8	≥128	8	≥128
Koyun Pey., Market	GLM 202	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens* strain: Ni1467	1	0,125	1	0,5	1	0,125	4	0,25	16	≤0,0625

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Heterofermentatif			**2**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Koyun Pey., Market	GLM 203	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens* strain: Ni1467	2	0,125	2	4	0,5	2	8	≥128	32	≥128
Lor, Market	GLM 84	*Lb. curvatus* strain X7-1b	1	≤0,0625	1	2	≤0,0625	0,5	2	32	1	≥128
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 154	*Lb. curvatus* strain: Ni794	4	≤0,0625	4	4	0,5	2	8	≥128	2	≥128
Lor, Market	GLM 83	*Lb. curvatus* strain: Ni998	0,5	≤0,0625	0,25	1	≤0,0625	≤0,0625	0,5	64	0,5	≥128
Lor, Mandıra	GLM 99	*Lb. curvatus* strain: Ni998	0,5	≤0,0625	0,125	2	1	≤0,0625	2	≥128	32	≥128
Koyun Pey., Market	GLM 204	*Lb. curvatus* strain: Ni998	2	0,125	16	4	0,125	2	4	≥128	1	≥128
Kefir, Ev yapımı	GLM 79	*Lb. kefiri* strain NM180-3	1	≤0,0625	≤0,0625	1	≤0,0625	≤0,0625	2	64	16	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Zorunlu Heterofermentatif			**2**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Çökelek, Mandıra	GLM 123	*Lb. kefiri* strain NM180-3	1	≤0,0625	≤0,0625	2	2	≤0,0625	8	≥128	32	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 125	*Lb. kefiri* strain NM180-3	1	≤0,0625	0,125	2	2	0,125	8	≥128	32	≥128
Kefir, Ev yapımı	GLM 76	*Lb. kefiri* strain NWL78	1	≥128	0,5	4	≥128	≤0,0625	8	8	16	1
Kefir, Ev yapımı	GLM 77	*Lb. kefiri* strain NWL78	0,5	≤0,0625	≤0,0625	2	≤0,0625	≤0,0625	16	≥128	32	≥128
Lor, Mandıra	GLM 100	*Lb. kefiri* strain NWL78	1	≤0,0625	0,25	2	1	≤0,0625	4	≥128	32	≥128
Lor, Mandıra	GLM 110	*Lb. kefiri* strain: NBRC 15888	2	≤0,0625	0,125	2	2	≤0,0625	16	≥128	32	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 105	*Lb. kefiri* strain: NBRC 15888	0,5	≤0,0625	0,125	1	0,125	≤0,0625	1	64	16	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus fermentum*			**1**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Tulum Pey., Mandıra	GLM 194	*Lb. fermentum* strain 104MgMLAF	1	≤0,0625	4	4	≤0,0625	0,125	8	≥128	16	≥128
Tulum Pey., Market	GLM 167	*Lb. fermentum* strain Chyla6	1	0,25	4	2	0,125	0,125	4	≥128	4	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 216	*Lb. fermentum* strain LAB-10	1	0,125	2	8	≤0,0625	0,125	4	≥128	16	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 219	*Lb. fermentum* strain NS9	1	≤0,0625	8	4	≤0,0625	0,25	16	≥128	16	≥128
Tulum Pey., Mandıra	GLM 190	*Lb. fermentum* strain ZN7b-2	1	≤0,0625	8	4	0,125	0,125	8	≥128	16	≥128
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Fakültatif Heterofermentatif			**4**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Çökelek, Mandıra	GLM 108	*Lb. alimentarius* strain NWL30	4	≤0,0625	1	2	2	1	4	64	1	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 107	*Lb. alimentarius* strain: NBRC 106464	4	≤0,0625	2	4	2	1	16	≥128	8	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Fakültatif Heterofermentatif			**4**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Yoğurt, Halk Pazarı/ Ev yapımı	GLM 24	*Lb. casei* strain IMAUFB059	8	≤0,0625	4	2	0,25	8	0,25	≥128	1	≥128
Lor, Market	GLM 86	*Lb. casei* strain IMAUFB059	4	0,125	0,5	4	≤0,0625	8	2	≥128	2	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 122	*Lb. casei* strain IMAUFB059	2	≤0,0625	0,25	1	≤0,0625	≤0,0625	0,25	16	0,25	≥128
Tulum Pey.,Mandıra	GLM 189	*Lb. casei* strain IMAUFB059	8	≤0,0625	8	4	1	8	2	≥128	1	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 212	*Lb. casei* strain IMAUFB059	0,5	0,5	0,5	8	2	0,5	0,25	≥128	0,125	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 215	*Lb. casei* strain IMAUFB059	1	≤0,0625	2	2	0,125	2	1	≥128	0,5	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 210	*Lb. casei* strain lm45	8	≤0,0625	4	8	0,25	8	1	≥128	1	≥128
Yoğurt (Meyveli), Market	GLM 55	*Lb. casei* strain NM68-3	8	≤0,0625	8	4	1	8	2	≥128	0,5	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus* Fakültatif Heterofermentatif			**4**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Lor, Mandıra	GLM 114	*Lb. casei* strain WX214	8	≤0,0625	2	4	2	4	1	≥128	1	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 213	*Lb. casei* strain Ycu1	1	≤0,0625	2	2	0,125	2	1	≥128	0,5	≥128
Tulum Pey., Market	GLM 170	*Lb. casei* W56	4	0,25	4	4	2	2	2	≥128	1	≥128
Lor, Market	GLM 90	*Lb. casei* W56	2	≤0,0625	4	4	2	4	1	≥128	1	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 106	*Lb. diolivorans* strain NM194-2	0,5	≤0,0625	0,25	1	≤0,0625	≤0,0625	1	32	1	0,5
Lor, Market	GLM 88	*Lb. otakiensis* strain: YIT 11505	4	≤0,0625	0,125	2	≤0,0625	0,25	8	≥128	16	≥128
EFSA, (2008) / *Lactobacillus plantarum*			**2**	**1**	**16**	**8**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**32**	**D.D.**
Çökelek, Mandıra	GLM 103	*Lb. plantarum* strain AY01	16	≤0,0625	0,25	4	8	0,5	16	64	16	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 104	*Lb. plantarum* strain AY01	0,5	≤0,0625	≤0,0625	1	≤0,0625	≤0,0625	1	1	2	≥128

80

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus plantarum*			**2**	**1**	**16**	**8**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**32**	**D.D.**
Koyun Pey., Mandıra	GLM 208	*Lb. plantarum* strain AY01	4	0,125	4	8	8	≤0,0625	8	≥128	32	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 209	*Lb. plantarum* strain AY01	2	≤0,0625	1	8	8	0,125	8	≥128	32	≥128
EFSA, (2008) / *Lactobacillus rhamnosus*			**4**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Tulum Pey., Market	GLM 164	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	8	0,125	8	4	1	8	2	≥128	1	≥128
Tulum Pey., Market	GLM 165	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	4	0,125	4	4	2	8	1	≥128	1	≥128
Tulum Pey., Mandıra	GLM 182	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	4	0,25	8	4	2	8	1	≥128	1	≥128
Tulum Pey., Mandıra	GLM 184	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	4	≤0,0625	4	8	2	16	1	≥128	2	≥128
Tulum Pey., Mandıra	GLM 197	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	2	≤0,0625	4	4	2	8	1	≥128	1	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus rhamnosus*			**4**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Koyun Pey., Mandıra	GLM 220	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	4	≤0,0625	8	8	1	16	1	≥128	1	≥128
Tulum Pey., Market	GLM 162	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	4	0,125	4	4	1	8	2	≥128	1	≥128
Koyun Pey., Mandıra	GLM 217	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	2	≤0,0625	4	8	1	16	1	≥128	1	≥128
Lor, Market	GLM 93	*Lb. rhamnosus* strain LCG SHARDINGER	2	≤0,0625	0,5	2	≤0,0625	0,5	0,5	≥128	1	≥128
EFSA, (2008) / *Lactobacillus paracasei*			**2**	**1**	**32**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**4**	**D.D.**
Lor, Market	GLM 95	*Lb. paracasei* strain ATCC 25302	2	≤0,0625	0,25	1	≤0,0625	1	0,5	32	0,5	≥128
Tulum Pey., Mandıra	GLM 177	*Lb. paracasei* strain: T2-2	4	0,25	8	4	2	2	2	≥128	1	≥128
Yoğurt (Meyveli), Market	GLM 56	*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strain E94	8	≤0,0625	16	4	0,5	8	4	≥128	1	≥128

Çizelge 4.5. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactobacillus paracasei*			**2**	**1**	**32**	**4**	**1[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**D.D.**	**4**	**D.D.**
Tulum Pey., Mandıra	GLM 174	*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strain E94	2	≤0,0625	4	2	≤0,0625	1	0,5	≥128	0,25	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 120	*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strain KLDS 1.0631	4	≤0,0625	4	4	1	1	1	≥128	1	≥128

Antibiyotik sınır değerleri µg/mL cinsindendir. Lb: Lactobacillus. D.D.: Doğal Dirençli. [1]EFSA, (2008), Klindamisin. [2]Danielsen ve Wind (2003). [3]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Orta derecede dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [4]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003) Dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil değil).

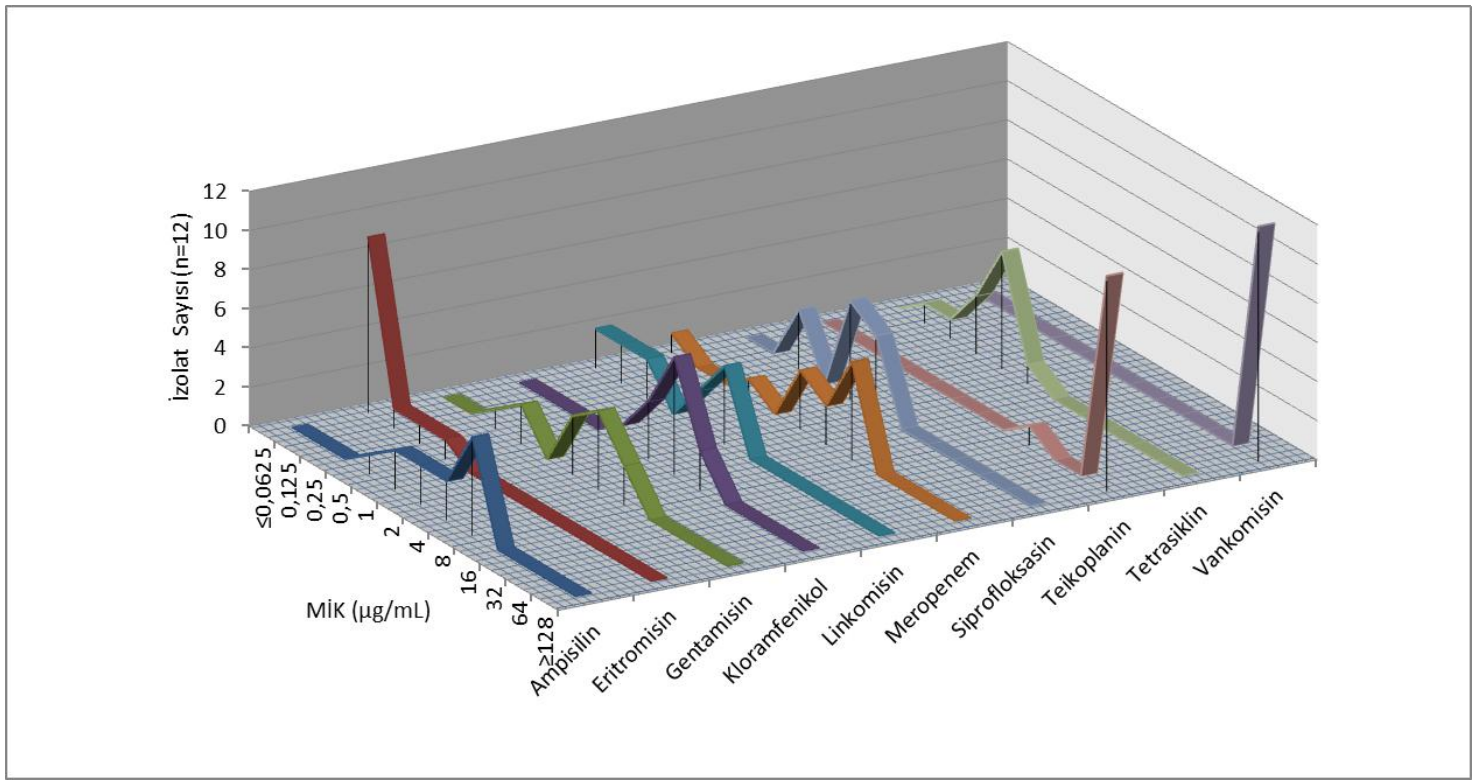
Çizelge 4.6. *Lactobacillus* cinsleri için MİK $_{50}$ / MİK $_{90}$ değerleri dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.

***Lactobacillus* cinsleri için MİK $_{50}$/MİK $_{90}$**				**Dirençli İzolat Sayısı ve Yüzdesi***
Antibiyotikler	**MİK Aralığı (µg/mL)**	**MİK$_{50}$ (µg/mL)**	**MİK$_{90}$ (µg/mL)**	
Ampisilin	≤0,0625 - 16	1	4	94 / 23 / %24,46
Eritromisin	≤0,0625 - 128	≤0,0625	0,25	94 / 1 / %1,06
Gentamisin	≤0,0625 - 64	2	8	94 / 1 / %1,06
Kloramfenikol	≤0,0625 - 8	2	4	94 / 7 / %7,44
Linkomisin	≤0,0625 - ≥128	0,5	2	94 / 28 / %29,78
Meropenem	≤0,0625 - 16	0,125	8	94 / 14 / %14,89
Siprofloksasin	≤0,0625 - 64	4	16	94 / 1 / %1,06
Teikoplanin	≤0,0625 - ≥128	64	≥128	78 / 0 / %0 + 16 D.D.
Tetrasiklin	0,125 - 32	1	32	94 / 22 / %23,40
Vankomisin	≤0,0625 - ≥128	≥128	≥128	35 / 1 / %2,85 + 59 D.D.

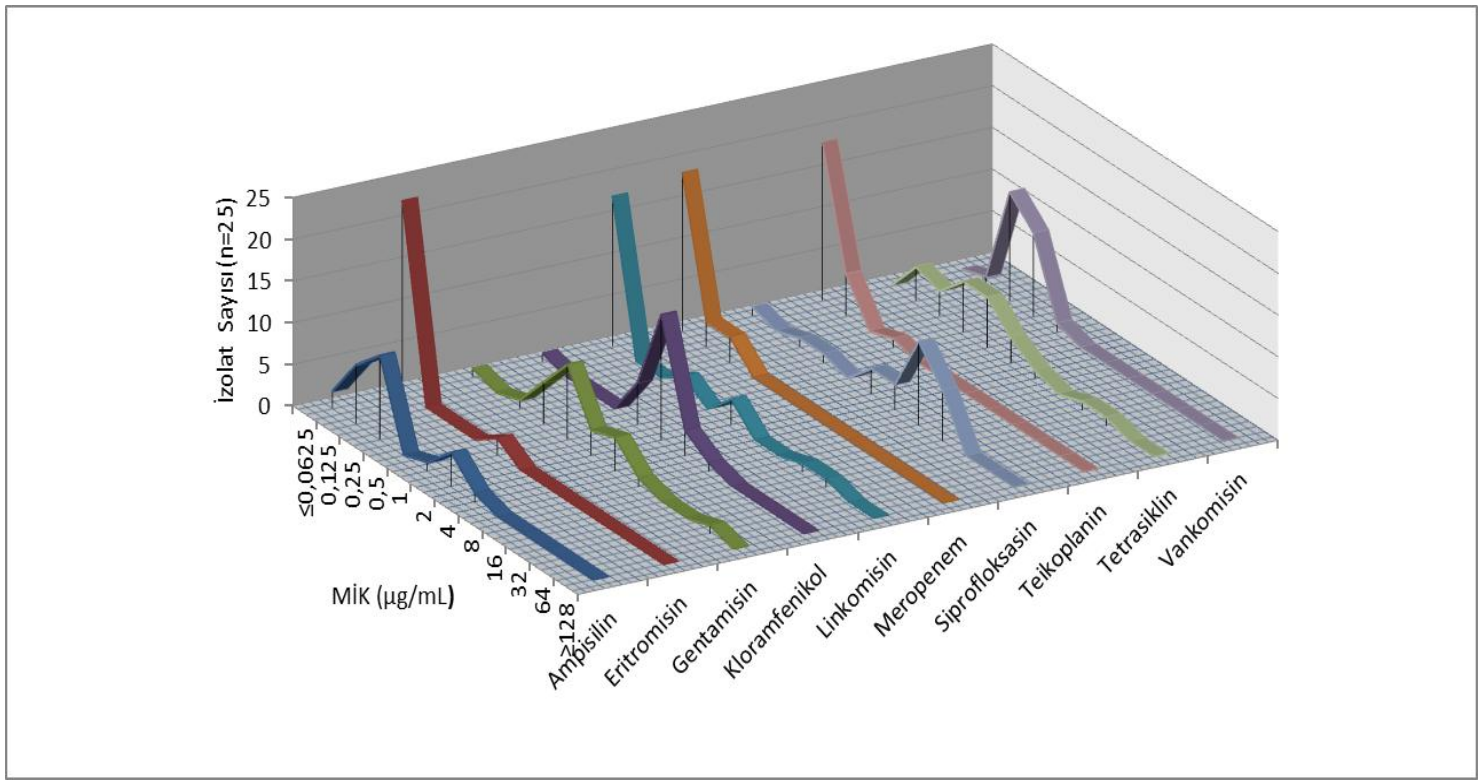
**Toplam örnek sayısı / dirençli örnek sayısı / yüzde değeri (%)*

Lb. casei grubunda denenen antibiyotikler için kazanılmış direnç varlığı gözlenmemektedir. (Şekil 4.7.)

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* izolatlarında vankomisin, teikoplanin, siprofloksasin, meropenem, kloramfenikol antibiyotikleri için kazanılmış direnç varlığı görülmemektedir. Ampisilin, eritromisin, gentamisin, linkomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerindeki dağılım ise kazanılmış direnç varlığına işaret etmektedir. (Şekil 4.8.)



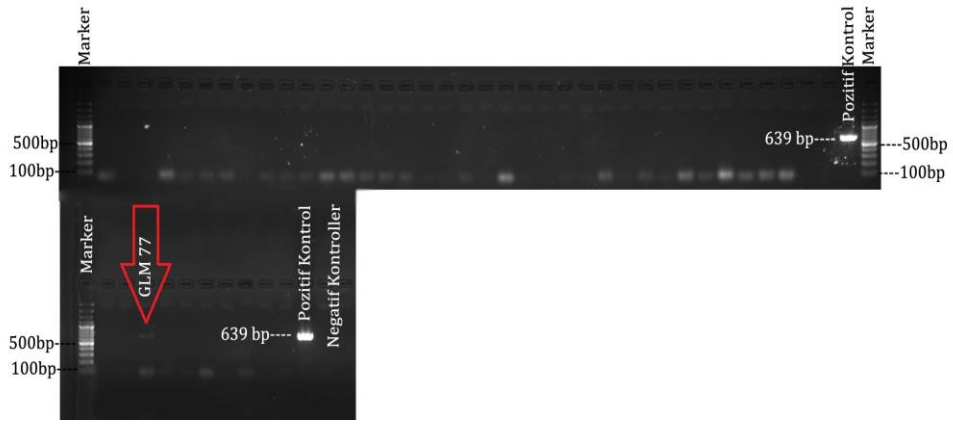
Şekil 4.7. *Lb. casei* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı.



Şekil 4.8. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı.

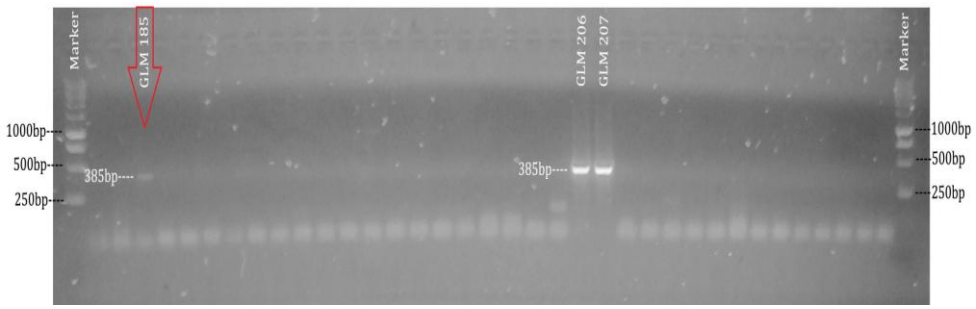
4.3.4. *Lactobacillus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları

erm (B) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 94 adet *Lactobacillus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 77) *erm* (B) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.7.). *erm* (B) fragmanı yaklaşık 639 bp uzunluğundadır. *erm* (B) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. faecium*+(*Tn*917) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.9.'da verilmiştir.



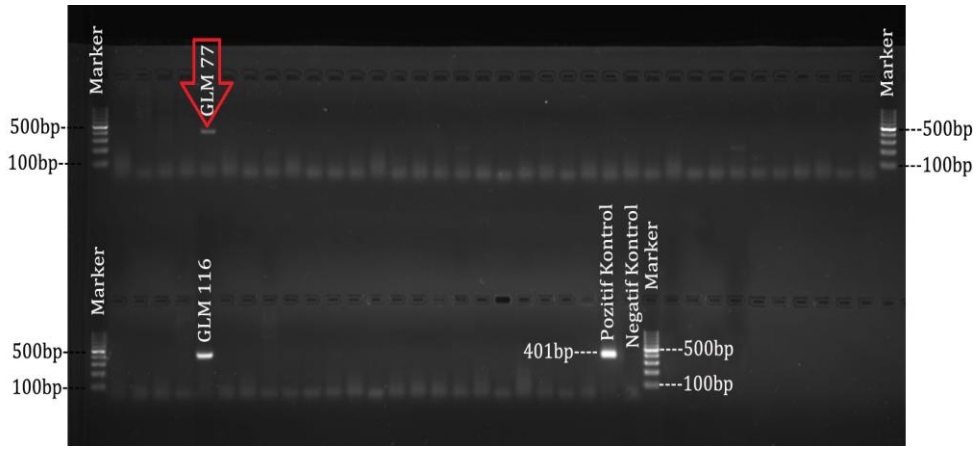
Şekil 4.9. GLM 77 izolatında saptanan *erm* (B) geninin jel görüntüsü.

tet (L) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 94 adet *Lactobacillus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 185) *tet* (L) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.7.). *tet* (L) fragmanı yaklaşık 385 bp uzunluğundadır. *tet* (L) geni taramalarında pozitif kontrol olarak kullanılabilecek suş temin edilemediğinden dolayı taramalar pozitif kontrolsüz yapılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.10. 'da verilmiştir.

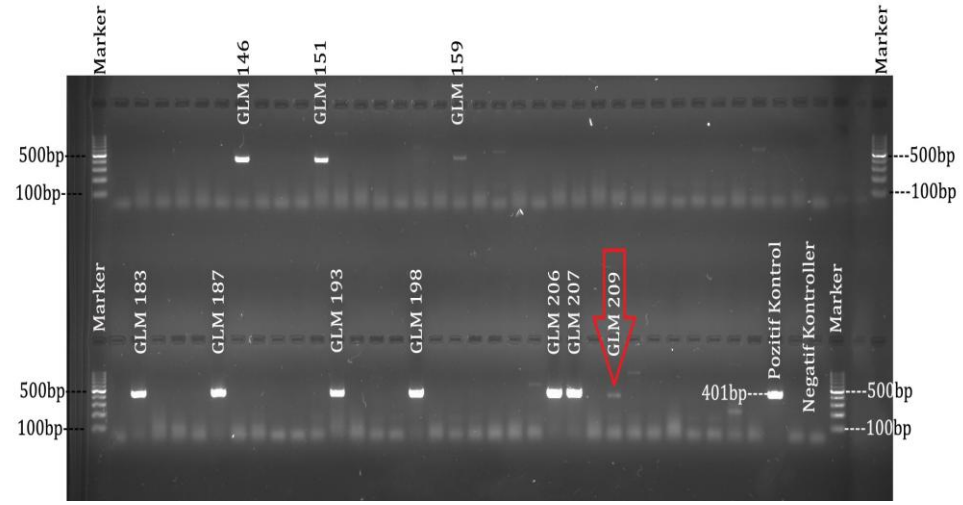


Şekil 4.10. GLM 185 izolatında saptanan *tet* (L) geninin jel görüntüsü.

tet (M) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 94 adet *Lactobacillus* cinsi izolatın iki tanesinde (GLM 77 ve GLM 209) *tet* (M) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.7.). *tet* (M) fragmanı yaklaşık 401 bp uzunluğundadır. *tet* (M) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. faecalis* JH2-2+(*Tn*916) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.11.'de ve Şekil 4.12. 'de verilmiştir. Elde ettiğimiz *tet* (M) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *tet* (M) gen dizileri ile % 100 oranlarında homoloji göstermektedir.



Şekil 4.11. GLM 77 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü.



Şekil 4.12. GLM 209 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü.

Çizelge 4.7. *Lactobacillus* izolatlarında saptanan direnç genleri.

İzolat No	**16S rRNA Sonucu**	***erm* (B)**	***tet* (L)**	***tet* (M)**
GLM 185	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ND02		+	
GLM 77	*Lb. kefiri* strain NWL78	+		+
GLM 209	*Lb. plantarum* strain AY01			+

Lactobacillus cinsi 94 izolatta *aac* (6′) *aph* (2″), *cat*, *erm* (A), *erm* (C), *tet* (K), *tet* (S), *tet* (Q), , *van* (C) ve *van* (X) bölgeleri taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir. Vankomisine doğal dirençli kabul edilen LAB izolatlarında *van* (A), *van* (B) genleri araştırılmamıştır.

Tez çalışmamızda *Lactobacillus* cinsine dahil olan izolatlarda antibiyotik direnci, izolatın türüne/fermentatif durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Tüm laktobasiller açısından en yüksek direnç sırasıyla linkomisin (% 29,78), ampisilin (% 24,46), tetrasiklin (% 23,40) ve meropenem (% 14,89) antibiyotiklerine karşı gözlenmiştir. Eritromisin (% 1,06), gentamisin (% 1,06) ve siprofloksasin (% 1,06) dirençliliği ise oldukça düşük bir yüzdeye sahiptir. Laktobasillerin çoğu vankomisine doğal dirençli olduğu için vankomisin direnci de düşük seviyededir (% 2,85). *Lactobacillus, Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinslerine özgü vankomisin direnci bunların peptidoglikan yapısında *D*-Ala-*D*-Ala peptidi yerine *D*-Ala-D-Laktat bulunmasından dolayıdır (Klein vd., 2000). Bu tür direnç pekçok LAB türünde (intrinsic) içseldir, çünkü antibiyotiğin hedefinden yoksundurlar ve enterokokkal türlerde olduğu gibi plazmidce kodlanan aktarılabilir dirençle karşılaştırılabilir değildirler (DeLisle ve Perl, 2003).

Hücre duvarı sentez inhibitörleri açısından laktobasiller genelde penisilinlere ve Beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmakla beraber, oksasilin ve sefalosporinlere daha dirençlidirler (Danielson ve Wind, 2003; Coppola vd., 2005). Hücre duvarı geçirimsizliği, bu cinsin türlerinde sitokrom ilişkili elektron taşıma sistemi olmadığı için direncin ana mekanizması gibi görünmektedir (Condon, 1983). Bununla birlikte çoklu ilaç taşıyıcılar, hasarlı hücre duvarı

otolitik sistemleri gibi özgül olmayan mekanizmaların birlikteliği, suşlar arasında farklılıklara neden olabilir (Kim vd., 1982; Putman vd., 2001). *Lactobacillus* türlerinin çoğu vankomisin gibi teikoplanine de doğal dirençlidir (Coppola vd., 2005; Katla vd., 2001).

Laktobasiller genelde kloramfenikol, eritromisin, klindamisin ve tetrasiklin gibi protein sentezi inhibitörlerine duyarlı iken neomisin, kanamisin, streptomisin ve gentamisin gibi aminoglikozidlere daha dirençlidirler. Bununla birlikte, bu ajanlara dirençli suşlar da tanımlanmıştır. Bizim çalışmamızda genel olarak bakıldığında *Lactobacillus* türlerinde eritromisin (%1,06), gentamisin (%1,06) ve kloramfenikol direnci (%7,44) düşüktür. Tetrasiklin direncine diğer gruplarda neredeyse hiç rastlanmazken, zorunlu heterofermantatif grupta yer alan türlerde bu oran (% 72)'dir.

Laktobasillerde en sık rastlanan direnç genleri; kloramfenikol direnci sağlayan *cat* (*L. reuteri* ve *L. plantarum*'da); pekçok türde bulunan farklı eritromisin direnç genleri (*erm*) ve bir seri tetrasiklin direnç genleri *tet* (K, M, O, Q, S, W, 36)'dir. *Lactobacillus johnsonii* G41 suşunda *erm* (B) geninin genetik organizasyonuna bakıldığında *E. faecalis*'deki plazmidce kodlanan *erm* (B) lokusundan kromozoma yerleşmiş gibi görünmektedir (Ammor vd., 2007). Çalışmamızda laktobasiller içinde sadece 3 suşta antibiyotik direnç geni bulunmuştur. Bu suşlar *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* GLM 185 (*tet* (L)); *Lb. kefiri* GLM 77 (*erm* (B) ve *tet* (M)); *Lb. plantarum* GLM 209 (*tet* (M)) izolatlarıdır. Araştırmacılar, *tet* (M) ve *erm* (B) geninin *Tn*916-*Tn*1545 ailesine dahil olan konjugatif transpozonlarda lokalize olduğunu belirtmektedirler (Clementi ve Aquilanti, 2011). Bu transpozon oldukça geniş bir konukçu aralığına sahiptir ve *E. faecalis* gibi Gram pozitif bakterilerde bulunur (Mathur ve Singh, 2005). Hem *tet* (M) hem de *erm* (B) geni taşıyan GLM 77 suşu horizontal gen aktarımı ile bu direnci almış olabilir. Mesela domuz dışkısından izole edilen *Lb. fermentum* izolatı 5,7 kb büyüklüğünde bir plazmit taşımaktadır ve yüksek orandaki eritromisin direnci taşıdığı *erm* geni ile sağlanmaktadır. Tanılanan bu genin % 98,2 oranında enterokokkal konjugatif transpozon olan *Tn*1545 olduğu belirlenmiştir. Raporlara göre transpozonların ve plazmitlerin her ikisi de enterokoklarda daha yaygın şekilde transfer edilebilir genetik elementlerdir. Bu direnç genlerine örnek olarak eritromisin, vankomisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve gentamisinde gösterilebilir (Mathur vd., 2005).

Çataloluk ve Gogebakan (2004) raporuna göre Türkiye' den izole edilen insan ve gıda orjinli laktobasillerin çoğunluğunda (% 61,96) *tet* (M) ve *erm* (B) genleri yaygın bulunmuştur. Dirençli suşlar *Lb. acidophilus, Lb. crispatus, Lb. gasseri* ve *Lb. plantarum* olarak belirtilmiştir.

tet (M) geni tetrasiklin direncinde ribozomal korumadan sorumlu ve laktobasillerde yaygın iken, *tet* (L) geni efflux pompası ile ilgilidir. *tet* (L) geni plazmidce (pLS55) kodlanır ve şimdiye kadar bir *L. sakeii* suşunda (Ammor vd., 2008) ve ayrı bir çalışmada *L. salivarius, L. fermentum* ve *L. plantarum* suşlarında saptanmıştır (Thumu ve Halami, 2012). Şu anki bilgilerimize göre araştırmamızda ilk defa bir *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşunda *tet* (L) genine rastlanmıştır. Çalışmamızda saptanan direnç genleri laktobasiller için verilen genel şemaya uymakla birlikte, fenotipik direncin görüldüğü ve PCR ile gen bulunamayan izolatlarda, bizim aradıklarımızdan farklı genetik belirleyicilerin sorumlu olabileceği söylenebilir.

4.3.5. *Lactococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları

Çalışmada izole edilen *Lactococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri, EFSA 2008 raporu, Hummel vd., (2007b), D'aımmo, (2007), Walsh (2003), Danielsen ve Wind (2003)' de belirtilen antibiyotik sınır değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca her antibiyotik için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ (μg/mL) değerleri belirlenip Çizelge 4.9.' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. *Lactococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactococcus lactis*			**2**	**2**	**32**	**8**	**4[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Kefir, Market	GLM 61	*Lc. lactis* subsp. *lactis bv. diacetylactis*	0,5	≤0,0625	2	1	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	0,125	0,25
Kefir, Market	GLM 69	*Lc. lactis* subsp. *lactis bv. diacetylactis*	0,5	≤0,0625	0,25	2	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	≤0,0625	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 140	*Lc. lactis* subsp. *lactis strain* 47MoQuesillo	1	≤0,0625	2	4	1	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 152	*Lc. lactis* subsp. *lactis strain* MNC38	1	0,125	≥128	4	1	≤0,0625	4	≤0,0625	0,25	0,25
Kefir, Market	GLM 58	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	2	1	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	0,125	0,25
Kefir, Market	GLM 59	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	0,5	1	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	0,25	0,25
Kefir, Market	GLM 60	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	≤0,0625	4	4	2	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25

Çizelge 4.8. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactococcus lactis*			**2**	**2**	**32**	**8**	**4[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Kefir, Market	GLM 68	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	0,25	2	≤0,0625	≤0,0625	1	≤0,0625	≤0,0625	0,125
Kefir, Market	GLM 70	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	0,125	2	2	0,125	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Kefir, Market	GLM 71	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	2	1	≤0,0625	≤0,0625	1	≤0,0625	0,5	0,25
Kefir, Market	GLM 72	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	4	0,125	2	4	0,125	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Lor, Market	GLM 80	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	≤0,0625	0,5	1	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	0,25	0,25
Lor, Mandıra	GLM 111	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	≤0,0625	1	4	2	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Lor, Mandıra	GLM 112	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	≤0,0625	32	4	2	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25

Çizelge 4.8. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactococcus lactis*			**2**	**2**	**32**	**8**	**4[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Lor, Mandıra	GLM 113	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,25	≤0,0625	0,5	4	1	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Lor, Mandıra	GLM 115	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	≤0,0625	1	4	2	≤0,0625	4	≤0,0625	0,25	0,25
Lor, Mandıra	GLM 117	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	≤0,0625	0,5	2	0,5	≤0,0625	2	≤0,0625	0,125	0,125
Lor, Mandıra	GLM 119	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,25	≤0,0625	≤0,0625	1	2	≤0,0625	1	≤0,0625	0,125	0,125
Beyaz Pey., Market	GLM 133	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	1	2	0,25	≤0,0625	2	≤0,0625	0,5	0,5
Beyaz Pey., Market	GLM 134	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	0,5	2	0,25	≤0,0625	0,5	≤0,0625	0,125	0,25
Beyaz Pey., Market	GLM 135	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	1	4	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	0,25	0,25

Çizelge 4.8. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Lactococcus lactis*			**2**	**2**	**32**	**8**	**4[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Beyaz Pey., Market	GLM 136	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	1	2	0,125	≤0,0625	0,5	≤0,0625	0,125	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 158	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	2	≤0,0625	1	2	0,5	≤0,0625	1	≤0,0625	0,125	0,125
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 159	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	1	0,125	1	4	2	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,25
Beyaz Pey., Market	GLM 133a	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	0,5	≤0,0625	2	2	0,125	≤0,0625	0,5	≤0,0625	0,5	0,125
Beyaz Pey., Market	GLM 137	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain: I042513	0,25	≤0,0625	1	2	0,25	≤0,0625	1	≤0,0625	0,25	0,25

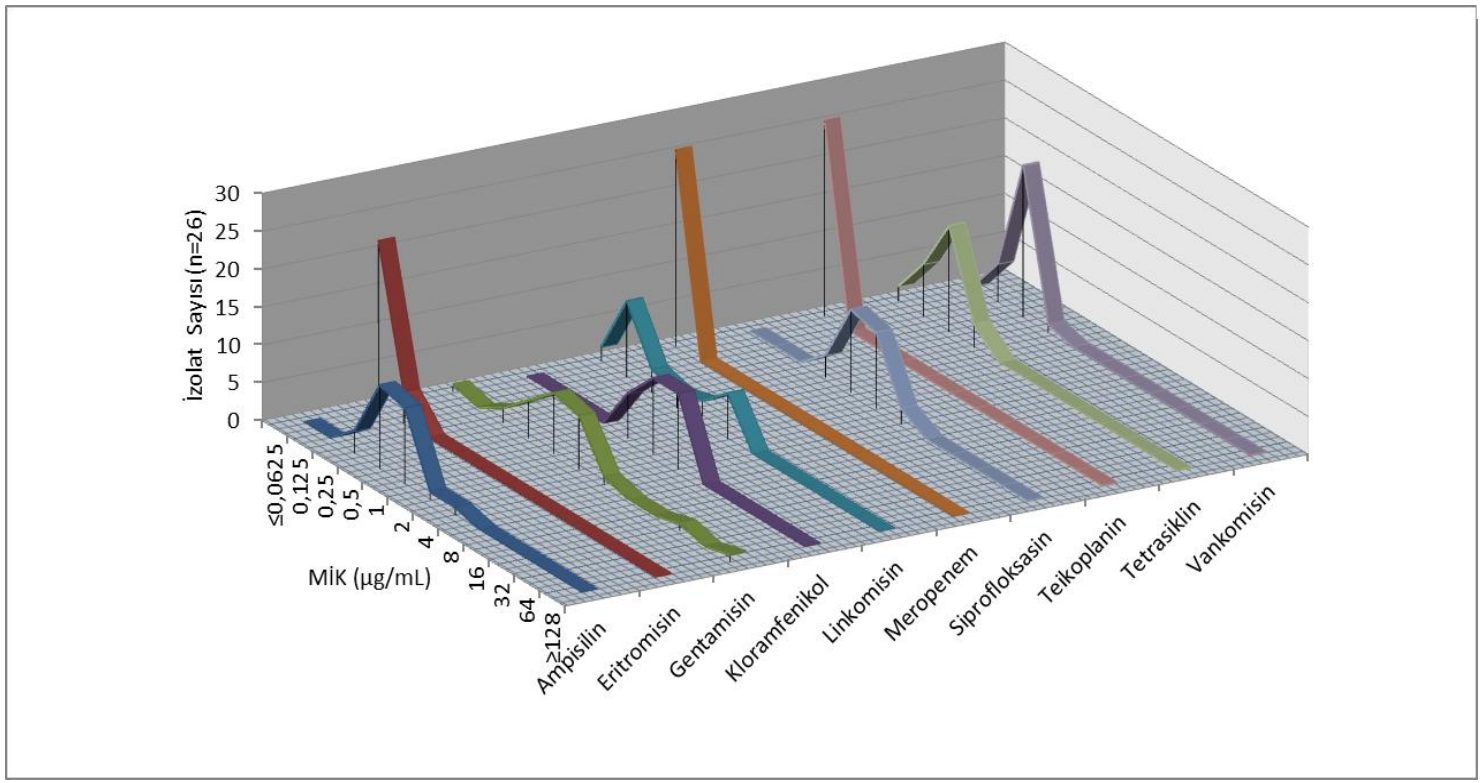
Antibiyotik sınır değerleri µg/mL cinsindendir. Lc: Lactococcus. [1]EFSA, (2008), Klindamisin. [2]Danielsen ve Wind (2003) ve Hummel vd., (2007b). [3]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Orta derecede dirençli(Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [4]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil değil).

Çizelge 4.9. *Lactococcus* cinsleri için MİK $_{50}$ / MİK $_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.

***Lactococcus* cinsleri için MİK $_{50}$/MİK $_{90}$**				**Dirençli İzolat Sayısı ve Yüzdesi***
Antibiyotikler	**MİK Aralığı (µg/mL)**	**MİK$_{50}$ (µg/mL)**	**MİK$_{90}$ (µg/mL)**	
Ampisilin	0,25 - 4	0,5	1	26 / 1 / %3,84
Eritromisin	≤0,0625 - 0,125	≤0,0625	0,125	26 / 0 / %0
Gentamisin	≤0,0625 - 128	1	2	26 / 1 / %3,84
Kloramfenikol	1 - 4	2	4	26 / 0 / %0
Linkomisin	≤0,0625 - 2	0,25	2	26 / 0 / %0
Meropenem	≤0,0625 - ≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	26 / 0 / %0
Siprofloksasin	0,5 - 4	1	2	26 / 0 / %0
Teikoplanin	≤0,0625 - ≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	26 / 0 / %0
Tetrasiklin	≤0,0625 - 0,5	0,25	0,25	26 / 0 / %0
Vankomisin	0,125 - 0,5	0,25	0,25	26 / 0 / %0

**Toplam örnek sayısı / dirençli örnek sayısı / yüzde değeri (%)*

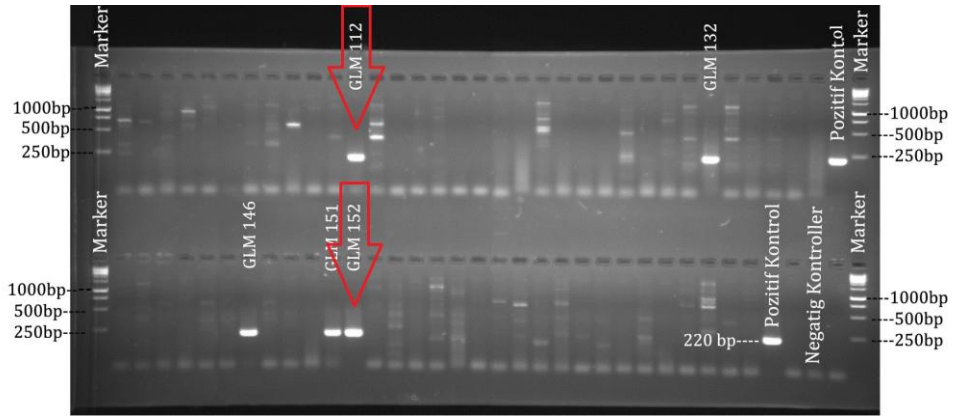
Lc. lactis subsp. *lactis* suşlarında kazanılmış ampisilin, gentamisin ve linkomisin direnci görülmektedir. Vankomisin, tetrasiklin, teikoplanin, siprofloksasin, meropenem, kloramfenikol ve eritromisin MİK değerleri ise unimodal bir dağılım göstermektedirler (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı.

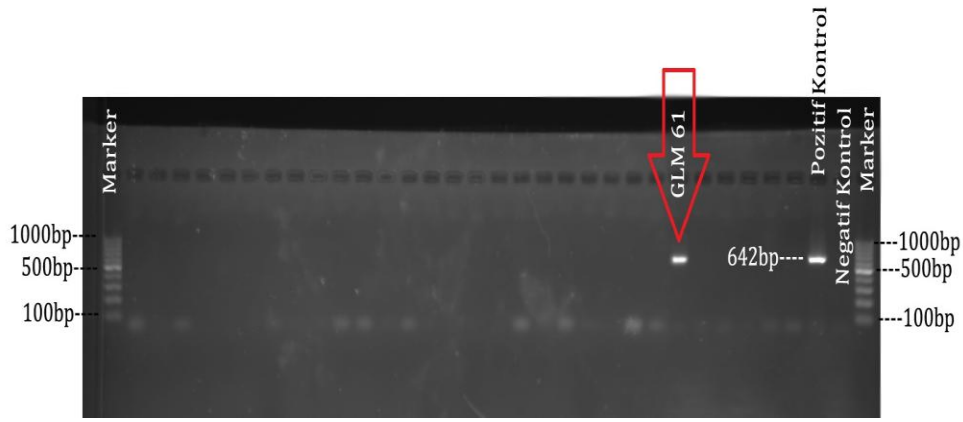
4.3.6. *Lactococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları

aac (6′) *aph* (2″) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 26 adet *Lactococcus* cinsi izolatın iki tanesinde (GLM 112 ve GLM 152) *aac* (6′) *aph* (2″) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.10.). *aac* (6′) *aph* (2″) fragmanı yaklaşık 220 bp uzunluğundadır. *aac* (6′) *aph* (2″) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. coli* DH10B (pAT392) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.14.' da verilmiştir. Elde ettiğimiz *aac* (6′) *aph* (2″) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *aac* (6′) *aph* (2″) gen dizileri ile % 99 (GLM 112) ve % 97 (GLM 152) oranlarında homoloji göstermektedir.



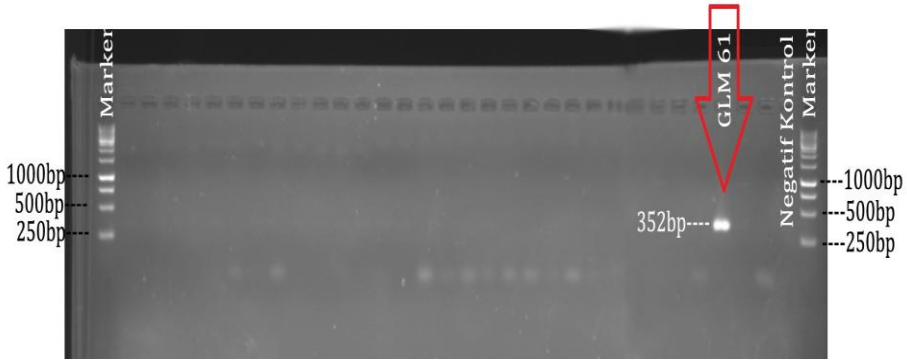
Şekil 4.14. GLM 112 ve GLM 152 izolatlarında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü.

erm (C) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 26 adet *Lactococcus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 61) *erm* (C) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.10.). *erm* (C) fragmanı yaklaşık 642 bp uzunluğundadır. *erm* (C) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *S.aureus* MRSA T 27 suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.15.' da verilmiştir. Elde ettiğimiz *erm* (C) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *erm* (C) gen dizileri ile % 99 oranında homoloji göstermektedir.



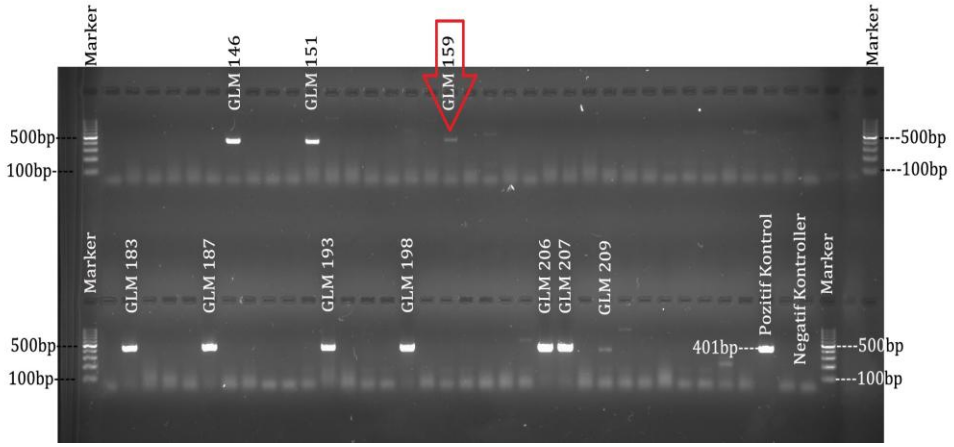
Şekil 4.15. GLM 61 izolatında saptanan *erm* (C) geninin jel görüntüsü.

tet (K) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 26 adet *Lactococcus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 61) *tet* (K) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.10.). *tet* (K) fragmanı yaklaşık 352 bp uzunluğundadır. *tet* (K) geni taramalarında pozitif kontrol olarak kullanılabilecek suş temin edilemediğinden dolayı taramalar pozitif kontrolsüz yapılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.16'de verilmiştir.



Şekil 4.16. GLM 61 izolatında saptanan *tet* (K) geninin jel görüntüsü.

tet (M) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 26 adet *Lactococcus* cinsi izolatın bir tanesinde (GLM 159) *tet* (M) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.10.). *tet* (M) fragmanı yaklaşık 401 bp uzunluğundadır. *tet* (M) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. faecalis* JH2-2+(*Tn*916) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.17 'de verilmiştir.



Şekil 4.17. GLM 159 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü.

Çizelge 4.10. *Lactococcus* izolatlarında saptanan direnç genleri.

İzolat No	**16S rRNA Sonucu**	***aac* (6′) *aph* (2″)**	***erm* (C)**	***tet* (K)**	***tet* (M)**
GLM 61	*Lc. lactis* subsp. *lactis bv. diacetylactis*		+	+	
GLM 152	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain MNC38	+			
GLM 112	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	+			
GLM 159	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25				+

Lactococcus cinsi 26 izolatta *cat*, *erm* (A), *erm* (B), *tet* (L), *tet* (S), *tet* (Q), *van* (A), *van* (B), *van* (C) ve *van* (X) bölgeleride taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir.

Lactococcus cinsine dahil olan izolatların hiçbirinde eritromisin, kloramfenikol, linkomisin, tetrasiklin, meropenem, teikoplanin, siprofloksasin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı fenotipik direnç gözlenmemiştir. Agar MİK dilüsyon sonuçlarına göre sadece bir izolat (GLM 152) gentamisin antibiyotiğine, bir

izolat ise (GLM 72) ampisiline dirençli bulunmuştur. GLM 152 izolatında PCR sonucunda *aac* (6′) *aph* (2″) geninin bulunması, direncin genotipik doğasını doğrulamıştır. Ancak laktokok izolatları arasında GLM 112, GLM 159 ve GLM 61 fenotipik direnç göstermedikleri halde sırasıyla *aac* (6′) *aph* (2″), *tet* (M) ve *erm* (C) + *tet* (K) genlerini barındırmaktadır.

Lactococcus cinsi içeriside yedi farklı tür bulunmaktadır ve bunlardan sadece *Lc. lactis* subsp. *lactis* ve *Lc. lactis* subsp. *cremoris* teknolojik öneme sahiptir (Carr vd., 2002). *Lc. lactis* genelde Gram pozitif spektrumlu eritromisin, linkomisin, teikoplanin ve vankomisin; geniş spektrumlu antibiyotiklerden kloramfenikol ve B-laktamlardan penisilin, ampisilin gibi antibiyotiklere duyarlıdır. Pekçok laktokok türü ise kanamisin, gentamisin gibi aminoglikozidlere dirençlidir. Çiğ sütten yapılan yumuşak peynirden izole edilen *Lc. lactis* subsp. *lactis* K214 suşunun en az 3 tane farklı plazmid tarafından kodlanan antibiyotik direnç geni (tetrasiklin *tet* (S), kloramfenikol ve streptomisin) taşıdığı bildirilmiştir (Perreten vd., 1997). Diğer tetrasiklin dirençli suşlarda ise *tet* (M) genine rastlanmaktadır.

Rodriguez-Alonso vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada çiğ sütten yapılan peynirlerden izole edilen laktokoklarda düşük düzeyde tetrasiklin (% 4,3), gentamisin (% 17,4), kloramfenikol (% 2,2), eritromisin (% 2,2), linkomisin (% 2,2) direnci bulunmuştur.

Temmerman vd. (2003)'nin probiyotik LAB ile yaptıkları çalışmada, *Lc. lactis* subsp. *lactis* suşlarının tümünün kanamisine (% 100), % 63'ünün tetrasikline ve % 38'inin eritromisine dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Laktokok suşlarının hiçbirinde penisilin, kloramfenikol ve vankomisin direncine rastlanmamıştır.

Tez çalışmamızda izole edilen laktokokların klinik olarak önemli antibiyotiklere dirençlilikleriyle ilgili bulgular literatür sonuçları ile uyumludur. Denenen antibiyotiklere direnç yüzdeleri düşüktür, rastlanan genler, laktokoklarda da bulunduğu belirtilen direnç genleridir. Fenotipik direnç gözlenmediği halde PCR sonucunda gözlenen *tet* (M), *tet* (K), *erm* (C) ve *aac* (6′) *aph* (2″) genlerinin sessiz genler olduğu ve ifade edilmediği söylenebilir.

4.3.7. *Leuconostoc* ve *Pediococcus* Cinslerine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları

Çalışmada izole edilen *Leuconostoc ve Pediococcus* Cinslerine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.11.'de verilmiştir. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri, European Commission 2003, EFSA 2008 raporları, Hummel vd. (2007b), D'aımmo, (2007), Walsh (2003), Danielsen ve Wind (2003)' da belirtilen antibiyotik sınır değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca her antibiyotik için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ (µg/mL) değerleri belirlenip Çizelge 4.12.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. *Leuconostoc ve Pediococcus* cinslerine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Leuconostoc*			**2**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[4], 32[5]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Kefir, Ev yapımı	GLM 73	*Leuco. mesenteroides* strain 32MgMLAF	8	0,125	1	4	0,125	16	4	≥128	4	≥128
Kefir, Ev yapımı	GLM 78	*Leuco. mesenteroides* strain 32MgMLAF	2	0,125	0,5	4	1	8	2	≥128	4	≥128
Lor, Market	GLM 85	*Leuco. mesenteroides* strain 32MgMLAF	2	≤0,0625	0,25	4	≤0,0625	16	4	≥128	2	≥128
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 141	*Leuco. mesenteroides* strain 32MgMLAF	4	≤0,0625	0,5	4	0,125	16	2	≥128	1	≥128
Kefir, Ev yapımı	GLM 75	*Leuco. mesenteroides* strain CR1_1417	4	0,125	1	4	0,25	16	4	≥128	2	≥128
Lor, Market	GLM 87	*Leuco. mesenteroides* strain THK-D433	4	≤0,0625	0,25	4	≤0,0625	8	2	≥128	2	≥128
Kefir, Market	GLM 64	*Leuco. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain NM178-1	2	≤0,0625	2	4	≤0,0625	8	1	≥128	1	≥128

Çizelge 4.11. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Leuconostoc*			**2**	**1**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[4], 32[5]**	**32[2]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Kefir, Market	GLM 65	*Leuco. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain NM178-1	2	≤0,0625	0,25	4	≤0,0625	8	1	≥128	1	≥128
Kefir, Market	GLM 63	*Leuco.* mesenteroides subsp. *mesenteroides* strain NM178-1	2	≤0,0625	1	2	≤0,0625	8	1	≥128	0,5	≥128
EFSA, (2008) /*Pediococcus*			**4**	**64**	**16**	**4**	**1[1]**	**8[4], 32[5]**	**16[3]**	**D.D.**	**8**	**D.D.**
Çökelek, Mandıra	GLM 121	*P. parvulus* strain: Ni555	2	≤0,0625	0,25	4	2	0,25	2	2	16	≥128
Çökelek, Mandıra	GLM 124	*P. parvulus* strain: Ni555	1	≤0,0625	0,25	2	0,125	0,25	1	1	8	16

Antibiyotik sınır değerleri µg/mL cinsindendir. Leuco: Leuconostoc. P: Pediococcus. D.D.: Doğal Dirençli. [1]EFSA, (2008), Klindamisin. [2]Danielsen ve Wind (2003) ve Hummel vd., (2007b). [3] European Commission, (2003), cipro/enrofloxacin. [4]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Orta derecede dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [5]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil değil).

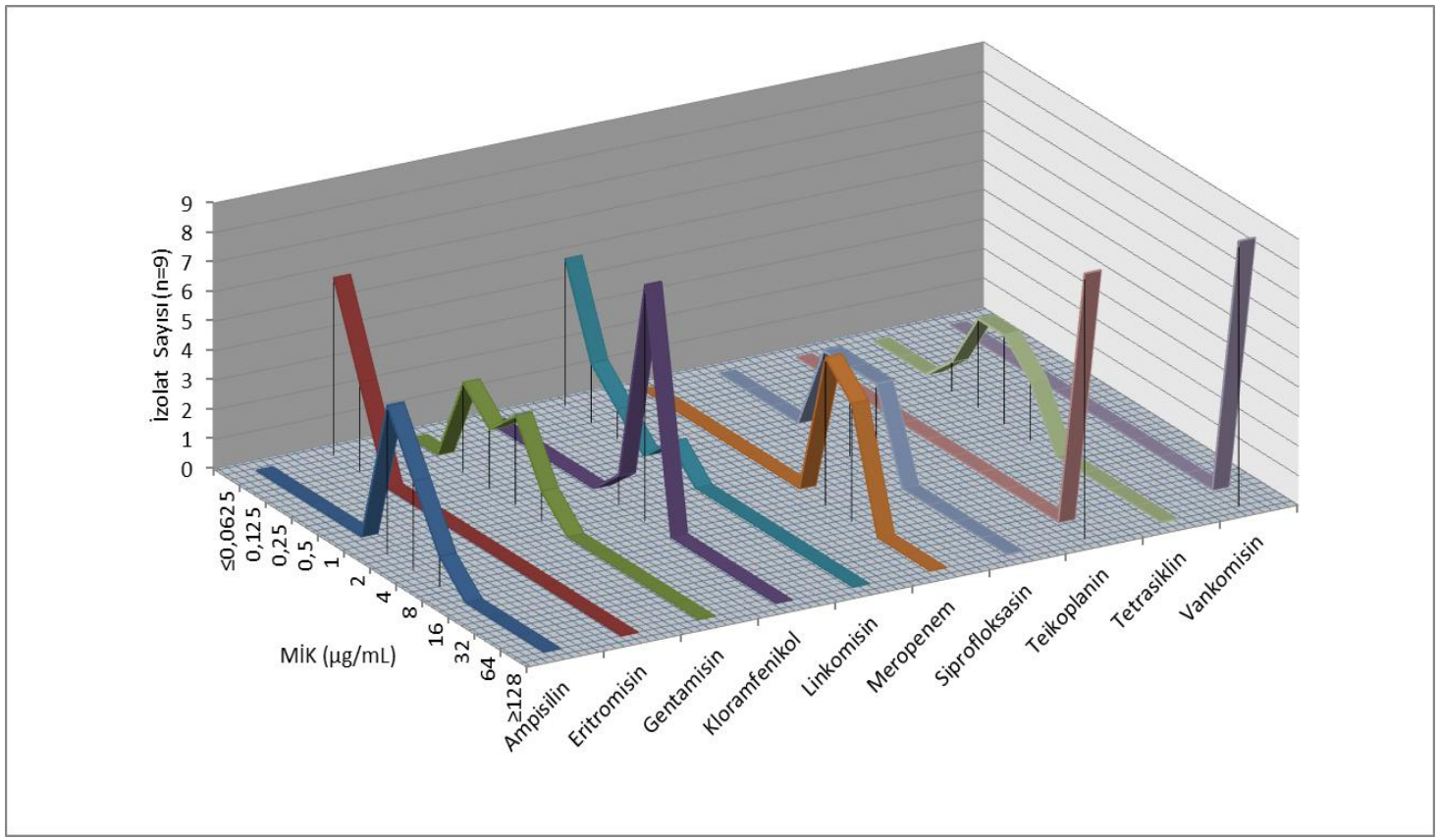
Çizelge 4.12. *Leuconostoc* cinsi için MİK $_{50}$/MİK $_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.

***Leuconostoc* cinsi için MİK $_{50}$/MİK $_{90}$**				**Dirençli İzolat Sayısı ve Yüzdesi***
Antibiyotikler	**MİK Aralığı (µg/mL)**	**MİK$_{50}$ (µg/mL)**	**MİK$_{90}$ (µg/mL)**	
Ampisilin	2/8	2	4	9 / 4 / %44,44
Eritromisin	≤0,0625 / 0,125	≤0,0625	0,125	9 / 0 / %0
Gentamisin	0,25 / 2	0,5	1	9 / 0 / %0
Kloramfenikol	2 / 4	4	4	9 / 0 / %0
Linkomisin	≤0,0625 / 1	≤0,0625	0,25	9 / 0 / %0
Meropenem	8 / 16	8	16	9 / 9 / %100
Siprofloksasin	2 / 4	2	4	9 / 0 / %0
Teikoplanin	≥128 / ≥128	≥128	≥128	9 D.D.
Tetrasiklin	0,5 / 4	2	4	9 / 0 / %0
Vankomisin	≥128 / ≥128	≥128	≥128	9 D.D.

**Toplam örnek sayısı / dirençli örnek sayısı / yüzde değeri (%)*

Pediococcus cinsi iki izolatımız olduğundan, MİK$_{50}$ / MİK$_{90}$ değerleri belirlenmemiştir.

Leuco. mesenteroides türlerinin MİK değerlerinin dağılımına bakıldığında, linkomisin dışında tüm antibiyotikler için unimodal bir dağılım görülmektedir. Linkomisin antibiyotiği için ise hafif düzeyde kazanılmış bir dirençten söz edilebilir. (Şekil 4.18.)



Şekil 4.18. *Leuco.mesenteroides* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı.

4.3.8. *Leuconostoc* ve *Pediococcus* Cinslerine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları

Leuconostoc ve *Pediococcus* cinsi toplam 11 izolatta *aac* (6′) *aph* (2″), *cat*, *erm* (A), *erm* (B), *erm* (C), *tet* (K), *tet* (L), *tet* (M), *tet* (S), *tet* (Q), *van* (A), *van* (B), *van* (C) ve *van* (X) bölgelerinin hepsi taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir.

Gıdalardan izole edilen *Leuconostoc* ve *Pediococcus* türlerinin antibiyotik dirençliliği ile ilgili çalışmalar diğer LAB'ne oranla oldukça azdır. *Leuconostoc* türleri glikopeptid antibiyotiklerin yanısıra, genelde (en azından bir kısmı), nalidiksik asid, gentamisin, kanamisin, streptomisin antibiyotiklerine de dirençlidir (Ammor vd., 2007). Çalışmamızda izole edilen *Leuconostoc* izolatlarının da tümü vankomisin ve teikoplanin (glikopeptid) antibiyotiklerine dirençli (≥128 mg/L) bulunmuştur. Dokuz *Leuconostoc* izolatından hepsi meropeneme, 4 tanesi ampisiline dirençli iken, eritromisin, kloramfenikol, gentamisin, linkomisin, siprofloksasin ve tetrasiklin antibiyotiklerine direnç gözlenmemiştir. Literatürde, pek çok *Leuconostoc* türünün bulgularımızı destekler nitelikte kloramfenikol, eritromisin, klindamisin ve tetrasikline hassas oldukları bildirilmiştir. *Leuconostoc mesenteroides* izolatlarından hiç birinde aranan direnç genlerine rastlanılmamıştır.

İspanya'da çiğ sütten yapılan peynir örneklerinden izole edilen *Leuconostoc* cinsine dahil izolatların hiçbirinde fenotipik olarak tetrasiklin, gentamisin, linkomisin, kloramfenikol ve eritromisin direnci gözlenmemiştir (Rodriguez-Alonso vd., 2009). *Pediococcus* türleri, diğer bazı *Lactobacillus'* lar gibi, glikopeptid antibiyotiklerden vankomisin ve teikoplanine doğal dirençlidirler. Bu bilgilerle tutarlı bir şekilde çalışmamızda izole edilen tüm *Leuconostoc* suşları ve iki *Pediococcus* suşundan bir tanesinin vankomisin için MİK değeri ≥128 mg/L olarak bulunmuştur.

Afrika'daki fermente gıdalardan LAB izolasyonu ve antibiyotik dirençlilikleriyle ilgili yapılan çalışmada, diğer LAB'nin yanısıra izole edilen 1 *Leuconostoc pseudomesenteroides* suşunun gentamisine dirençli (MİK 64 mg/L), ampisilin, kloramfenikol, klindamisin, tetrasiklin ve eritromisine duyarlı olduğu belirlenmiştir (Adimpong vd., 2012).

Gıdalardan izole edilen *Pediococcus* spp. nin antibiyotik hassasiyeti ilgili oldukça az veri bulunmaktadır. Penisilin G, imipenem, gentamisin, eritromisin, klindamisin, kloramfenikol gibi antibiyotikler pediokoklara karşı genelde etkili iken, hassasiyet oranları türe göre değişebilmektedir (Swenson vd., 1990; Tankovic vd., 1993; Zarazaga vd., 1999; Temmerman vd., 2003; Danielsen vd., 2006). Pediokoklar, vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptid antibiyotiklere, streptomisine, kanamisine ve tetrasikline (özellikle *P. acidilactici*) doğal dirençli olarak bildirilmiştir (Swenson vd., 1990; Danielsen vd., 2006). Çalışmamızda izole edilen Pediokok suşları vankomisine dirençli bulunmuş (MİK ≥128 mg/L ve 16 mg/L), ancak teikoplanin için MİK değerlerinin oldukça düşük olduğu (MİK 2 mg/L ve 1 mg/mL) gözlenmiştir. Bu durum glikopeptid direncinin genotipik yapısıyla ilgili olabilir. GLM 121 izolatı ise linkomisin ve tetrasikline dirençlidir. Bazı *Pediococcus* suşlarının tüm Beta-laktamlar, aminoglikozidler, makrolidler, tetrasiklin ve kinolonlara karşı direnç gösterdiğine dair veriler bulunmaktadır (Tankovic vd., 1993; Temmerman vd., 2003). İki *Pediococcus parvulus* suşunda da aranan antibiyotik direnç genlerine rastlanmamıştır.

4.3.9. *Streptococcus* Cinsine Dahil LAB İzolatlarının MİK Sonuçları

Çalışmada izole edilen *Streptococcus* cinsine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir. İzolatların antibiyotik dirençlilikleri, EFSA 2008 raporu, Hummel vd. (2007b), D'aımmo, (2007), Walsh (2003), Danielsen ve Wind (2003)' da belirtilen antibiyotik sınır değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca her antibiyotik için $MİK_{50}$ / $MİK_{90}$ (µg/mL) değerleri belirlenip Çizelge 4.14.' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. *Streptococcus* cinslerine dahil LAB'nin agar dilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK sonuçları.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Streptococcus thermophilus*			**2**	**2**	**32**	**4**	**2[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Lor, Market	GLM 81	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	0,25	≤0,0625	8	4	1	≤0,0625	1	≤0,0625	0,25	0,25
Lor, Mandıra	GLM 116	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	0,25	≤0,0625	0,25	1	≤0,0625	≤0,0625	0,25	≤0,0625	32	≤0,0625
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 148	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	0,5	≤0,0625	16	2	4	≤0,0625	2	0,125	0,25	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 150	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	0,5	≤0,0625	64	2	0,125	≤0,0625	2	0,125	0,5	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 155	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	0,5	≤0,0625	16	2	≤0,0625	≤0,0625	2	≤0,0625	≤0,0625	0,125
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 156	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1	≤0,0625	16	2	4	≤0,0625	2	≤0,0625	0,25	0,125
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 151	*S. macedonicus* ACA-DC 198	0,5	≥128	≥128	2	1	≤0,0625	0,5	≤0,0625	32	0,5
Tulum Pey., Mandıra	GLM 198	*S. macedonicus* ACA-DC 198	0,5	≥128	4	4	1	≤0,0625	1	≤0,0625	64	0,25

Çizelge 4.13. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Streptococcus thermophilus*			**2**	**2**	**32**	**4**	**2[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Koyun Pey., Mandıra	GLM 218	*S. macedonicus* ACA-DC 198	0,25	≤0,0625	4	4	≤0,0625	≤0,0625	1	≤0,0625	0,5	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 143	*S.macedonicus* strain WX301	0,25	0,25	0,5	4	0,125	≤0,0625	0,5	≤0,0625	0,25	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 145	*S. macedonicus* strain WX301	0,25	≤0,0625	4	2	0,125	≤0,0625	0,5	≤0,0625	0,25	0,125
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 146	*S. macedonicus* strain WX301	1	≥128	≥128	2	≤0,0625	≤0,0625	0,5	≤0,0625	32	0,25
Tulum Pey., Mandıra	GLM 187	*S. macedonicus* strain WX301	1	≥128	≥128	4	16	≤0,0625	1	≤0,0625	≥128	0,25
Tulum Pey., Mandıra	GLM 193	*S. macedonicus* strain WX301	1	≥128	≥128	2	16	≤0,0625	4	≤0,0625	64	0,25
Koyun Pey., Mandıra	GLM 206	*S. macedonicus* strain WX301	1	≥128	≥128	2	0,125	≤0,0625	1	≤0,0625	64	0,25

Çizelge 4.13. devamı.

Kaynak Yeri ve Türü	İzolat No	Bakteri Grubu	Ampisilin	Eritromisin	Gentamisin	Kloramfenikol	Linkomisin	Meropenem	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Vankomisin
EFSA, (2008) / *Streptococcus thermophilus*			**2**	**2**	**32**	**4**	**2[1]**	**8[3], 32[4]**	**32[2]**	**8[3], 32[4]**	**4**	**4**
Koyun Pey., Mandıra	GLM 207	*S. macedonicus* strain WX301	1	≥128	≥128	2	≤0,0625	≤0,0625	1	≤0,0625	64	0,25
Beyaz Pey., Mandıra	GLM 147	*S. macedonicus* strain WX301	0,25	≤0,0625	4	2	≤0,0625	≤0,0625	0,5	≤0,0625	0,25	0,25

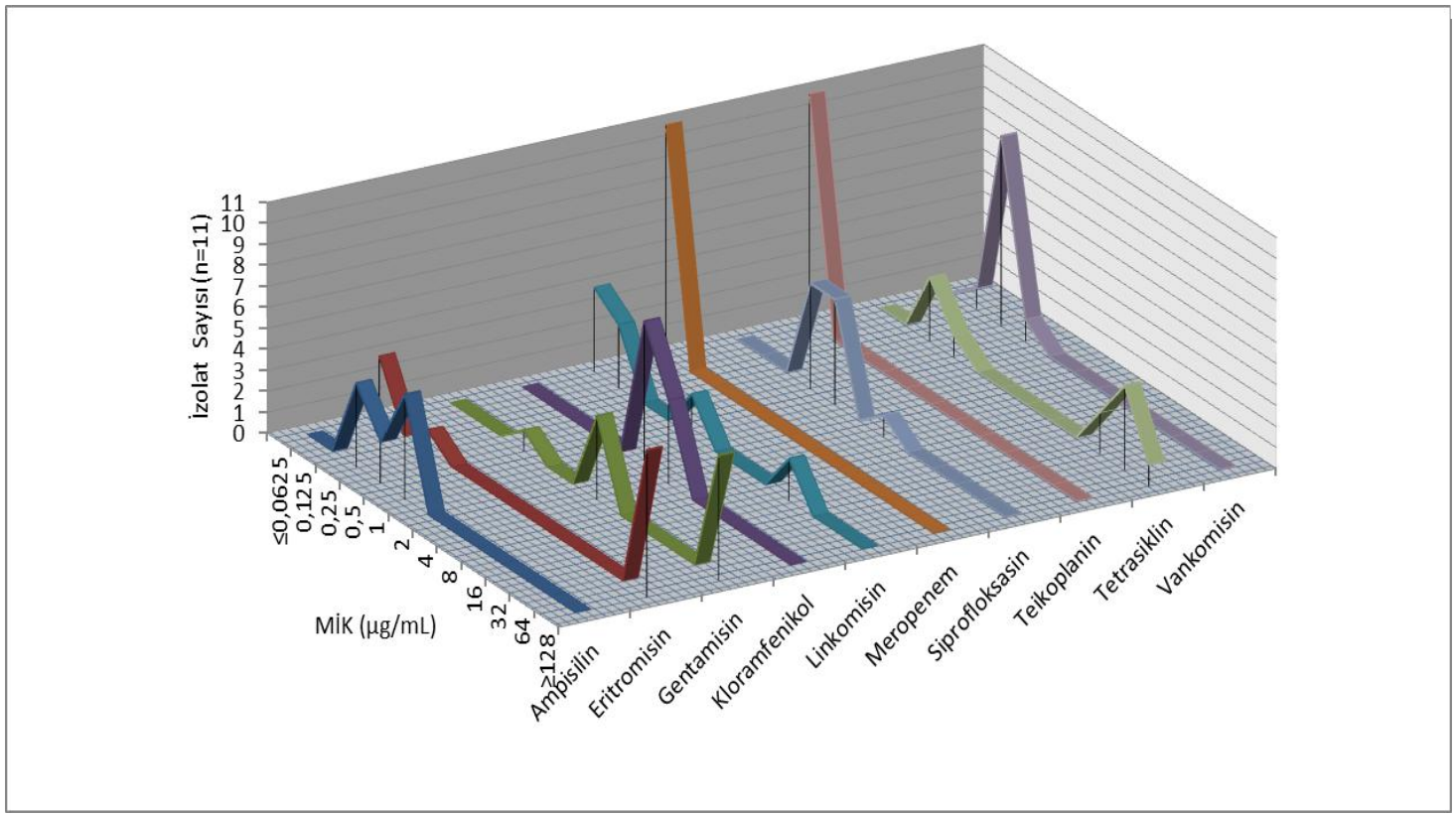
Antibiyotik sınır değerleri µg/mL cinsindendir. S: Streptococcus. [1]EFSA, (2008), Klindamisin. [2]Danielsen ve Wind (2003) ve Hummel vd., (2007b). [3]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Orta derecede dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil). [4]D'aımmo, (2007) ve Walsh(2003)Dirençli (Belirtilen antibiyotik sınır değeri dahil değil).

Çizelge 4.14. *Streptococcus* cinsleri için MİK $_{50}$ / MİK $_{90}$ değerleri, dirençli izolat sayısı ve yüzdesi.

***Streptococcus* cinsleri için MİK $_{50}$/MİK $_{90}$**				**Dirençli İzolat Sayısı ve Yüzdesi***
Antibiyotikler	**MİK Aralığı (µg/mL)**	**MİK$_{50}$ (µg/mL)**	**MİK$_{90}$ (µg/mL)**	
Ampisilin	0,25 - 1	0,5	1	17 / 0 / %0
Eritromisin	≤0,0625 - ≥128	≤0,0625	≥128	17 / 7 / %41,17
Gentamisin	0,25 - ≥128	16	≥128	17 / 7 / %41,17
Kloramfenikol	1 - 4	2	4	17 / 0 / %0
Linkomisin	≤0,0625 - 16	0,125	4	17 / 4 / %23,52
Meropenem	≤0,0625 - ≤0,0625	≤0,0625	≤0,0625	17 / 0 / %0
Siprofloksasin	0,25 - 4	1	2	17 / 0 / %0
Teikoplanin	≤0,0625 - 0,125	≤0,0625	≤0,0625	17 / 0 / %0
Tetrasiklin	≤0,0625 - ≥128	0,5	64	17 / 8 / %47,05
Vankomisin	≤0,0625 - 0,5	0,25	0,25	17 / 0 / %0

**Toplam örnek sayısı / dirençli örnek sayısı / yüzde değeri (%)*

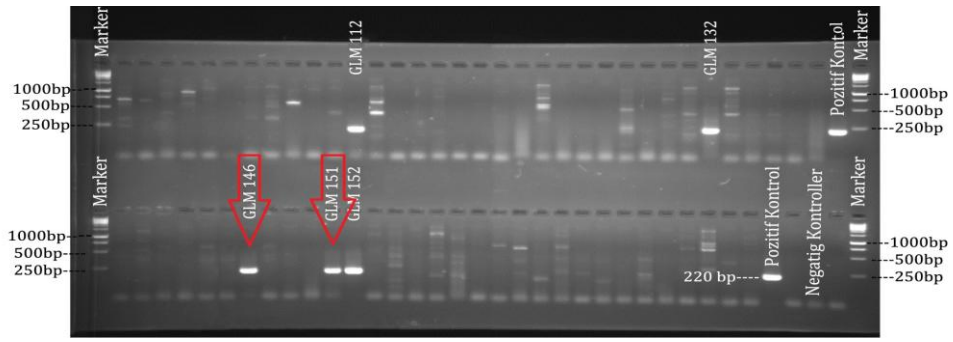
S.macedonicus suşlarında vankomisin, teikoplanin, meropenem, kloramfenikol ve ampisilin antibiyotikleri için kazanılmış direnç varlığı gözlenmemektedir. Ancak eritromisin, gentamisin, linkomisin, siprofloksasin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin MİK dağılımına bakıldığında bimodal olduğu ve kazanılmış dirence işaret ettiği görülebilir (Şekil 4.19.).



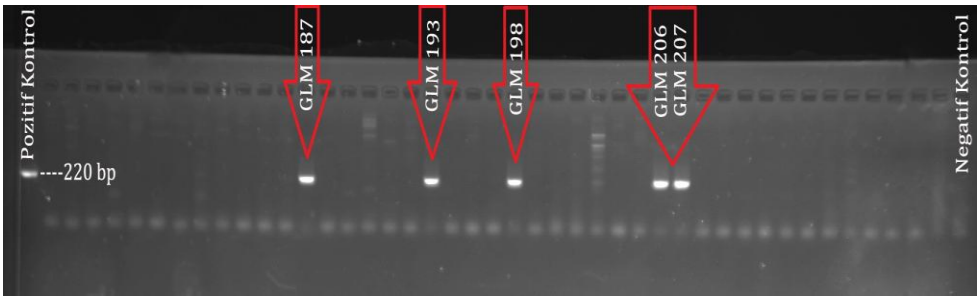
Şekil 4.19. *S. macedonicus* suşlarında antibiyotik MİK değerlerinin dağılımı.

4.3.10. *Streptococcus* Cinslerine Dahil LAB İzolatlarında PCR ile Direnç Geni Tarama Sonuçları

aac (6′) *aph* (2″) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 17 adet *Streptococcus* cinsi izolatın 7 tanesinde (GLM 146, GLM 151, GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207) *aac* (6′) *aph* (2″) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.15.). *aac* (6′) *aph* (2″) fragmanı yaklaşık 220 bp uzunluğundadır. *aac* (6′) *aph* (2″) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. coli* DH10B (pAT392) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.20.' te ve Şekil 4.21.' de verilmiştir. Elde ettiğimiz *aac* (6′) *aph* (2″) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *aac* (6′) *aph* (2″) gen dizileri ile % 100 (GLM 146), % 97 (GLM 151) ve % 92 (GLM 198) oranlarında homoloji göstermektedir.

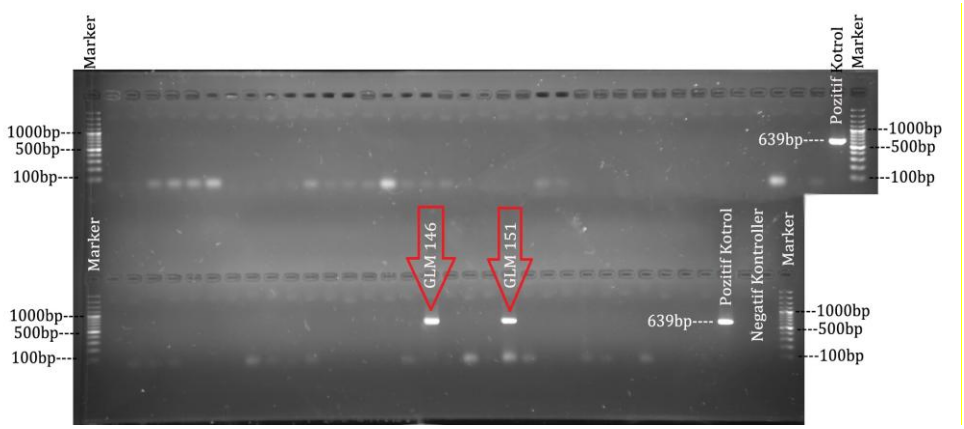


Şekil 4.20. GLM 146 ve GLM 151 izolatlarında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü.

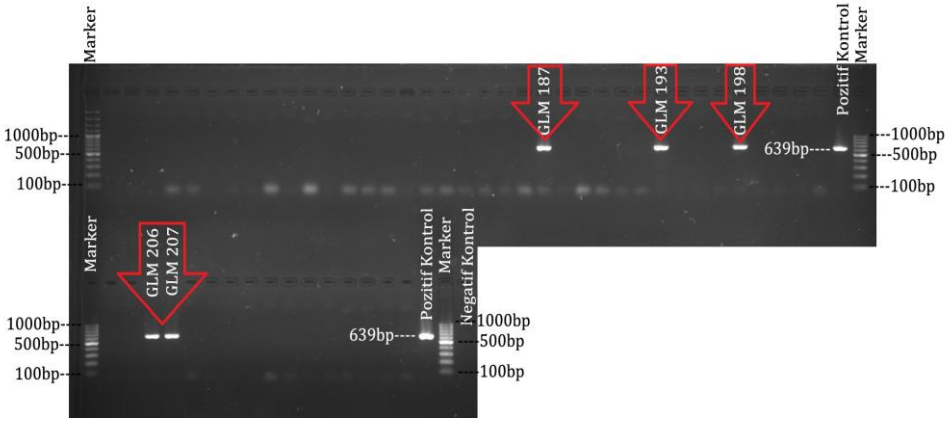


Şekil 4.21. GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *aac* (6′) *aph* (2″) geninin jel görüntüsü.

erm (B) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 17 adet *Streptococcus* cinsi izolatın 7 tanesinde (GLM 146, GLM 151, GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207) *erm* (B) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.15.). *erm* (B) fragmanı yaklaşık 639 bp uzunluğundadır. *erm* (B) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. faecium*+(*Tn*917) suşu kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.22.'de ve Şekil 4.23' de verilmiştir. Elde ettiğimiz *erm* (B) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *erm* (B) gen dizileri ile % 100 (GLM 146, GLM 151, GLM 187, GLM 193, GLM 198 ve GLM 207) ve % 99 (GLM 206) oranlarında homoloji göstermektedir.

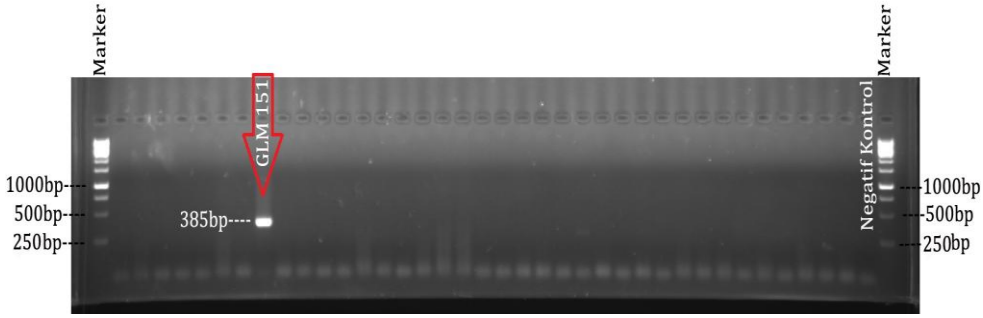


Şekil 4.22. GLM 146 ve GLM 151 izolatlarında saptanan *erm* (B) geninin jel görüntüsü.

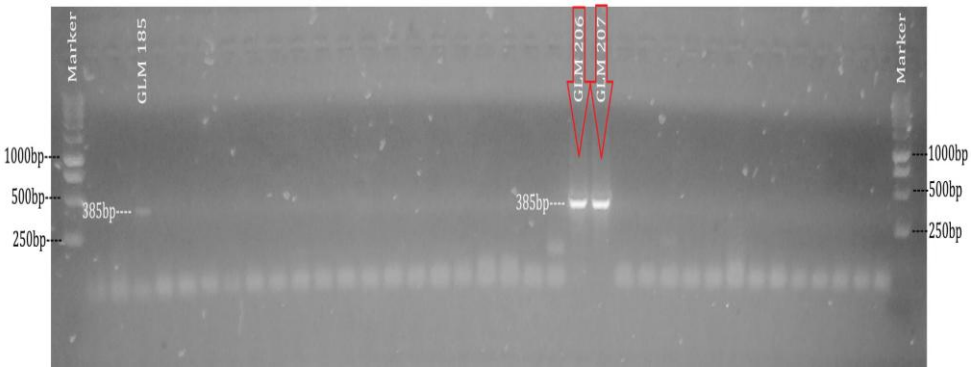


Şekil 4.23. GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *erm* (B) geninin jel görüntüsü.

tet (L) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 17 adet *Streptococcus* cinsi izolatın 3 tanesinde (GLM 151, GLM 206 ve GLM 207) *tet* (L) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.15.). *tet* (L) fragmanı yaklaşık 385 bp uzunluğundadır. *tet* (L) geni taramalarında pozitif kontrol olarak kullanılabilecek suş temin edilemediğinden dolayı taramalar pozitif kontrolsüz yapılmıştır. PCR sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.24.' de ve Şekil 4.25.'de verilmiştir. Elde ettiğimiz *tet* (L) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *tet* (L) gen dizileri ile % 96 (GLM 151, GLM 206) oranında homoloji göstermektedir.



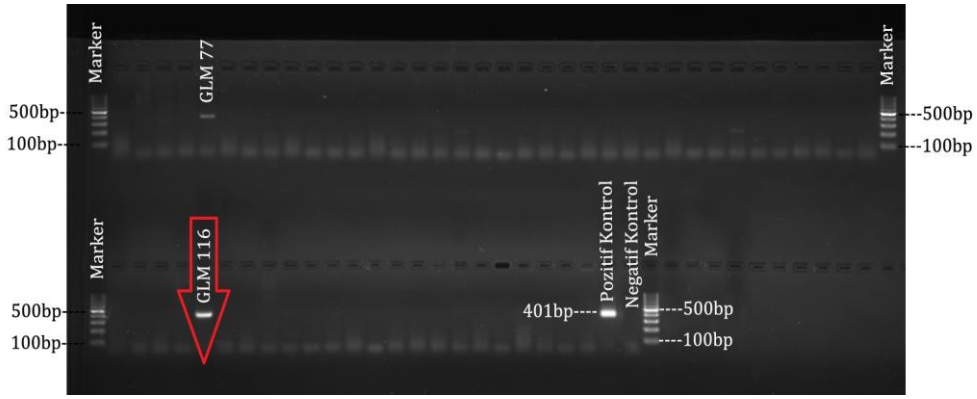
Şekil 4.24. GLM 151 izolatında saptanan *tet* (L) geninin jel görüntüsü.



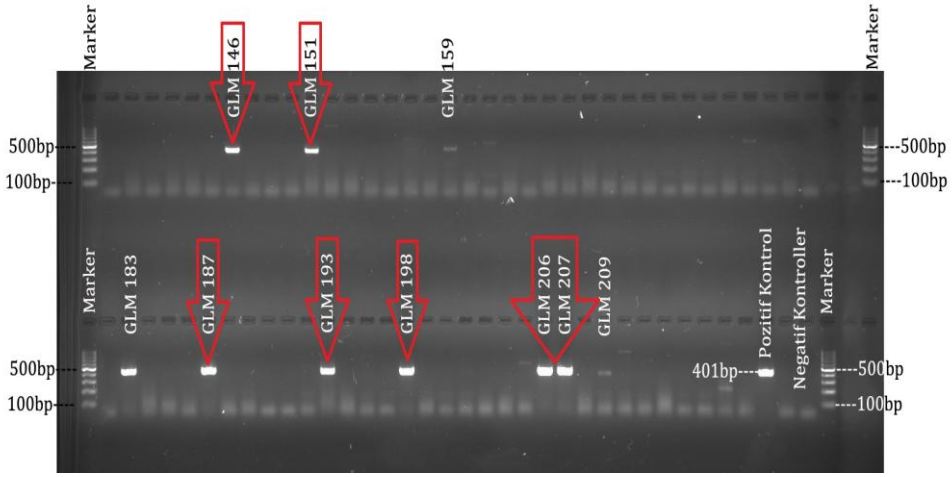
Şekil 4.25. GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *tet* (L) geninin jel görüntüsü.

tet (M) primerleri kullanılarak yapılan taramada, 17 adet *Streptococcus* cinsi izolatın 8 tanesinde (GLM 116, GLM 146, GLM 151, GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207) *tet* (M) bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.15.). *tet* (M) fragmanı yaklaşık 401 bp uzunluğundadır. *tet* (M) geni taramalarında pozitif kontrol olarak, *E. faecalis* JH2-2+(*Tn*916) suşu kullanılmıştır. PCR

sonucu elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.26.' da ve Şekil 4.27.'de verilmiştir. Elde ettiğimiz *tet* (M) amplikonlarının sekans sonuçları veritabanlarındaki *tet* (M) gen dizileri ile % 100 (GLM 146, GLM 193, GLM 198, GLM 206, GLM 207) ve % 99 (GLM 116, GLM 151) oranlarında homoloji göstermektedir.



Şekil 4.26. GLM 116 izolatında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü.



Şekil 4.27. GLM 146, GLM 151, GLM 187, GLM 193, GLM 198, GLM 206 ve GLM 207 izolatlarında saptanan *tet* (M) geninin jel görüntüsü.

Çizelge 4.15. *Streptococcus* izolatlarında saptanan direnç genleri.

İzolat No	**16S rRNA Sonucu**	***aac* (6′) *aph* (2′′)**	***erm* (B)**	***tet* (L)**	***tet* (M)**
GLM 116	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060				+
GLM 151	*S. macedonicus* ACA-DC 198	+	+	+	+
GLM 198	*S. macedonicus ACA-DC 198*	+	+		+
GLM 146	*S. macedonicus strain WX301*	+	+		+
GLM 187	*S. macedonicus strain WX301*	+	+		+
GLM 193	*S. macedonicus strain WX301*	+	+		+
GLM 206	*S. macedonicus strain WX301*	+	+	+	+
GLM 207	*S. macedonicus strain WX301*	+	+	+	+

Streptococcus cinsi 17 izolatta *cat*, *erm* (A), *erm* (C), *tet* (K), *tet* (S), *tet* (Q), *van* (A), *van* (B), *van* (C) ve *van* (X) bölgeleride taranmış olup, hiçbirinde ilgili genler tespit edilmemiştir.

Araştırmamız kapsamında izole edilen *Streptococcus* cinsine ait suşların 11 tanesi *S. macedonicus*, 6 tanesi ise *Streptococcus lutetiensis* olarak tanılanmıştır. Streptokok türlerinin hiçbirinde fenotipik ampisilin, kloramfenikol, meropenem, siprofloksasin, teikoplanin ve vankomisin direnci saptanmamıştır. Streptokok suşlarının % 47,05'si tetrasikline % 41,17'si eritromisine, % 41,17'si gentamisine, ve % 23,52'si linkomisine dirençlidir ve dirençli suşların MİK değerleri özellikle eritromisin ve gentamisin için oldukça yüksektir (MİK ≥128 mg/mL). *S. macedonicus* izolatlarında antibiyotik direnç yüzdeleri, *S. lutetiensis* izolatlarına göre daha yüksektir (Çizelge 4.13.).

Eritromisine dirençli tüm *S. macedonicus* izolatlarında (n=7) *erm* (B) geni; tetrasikline dirençli olan streptokokların tümünde *tet* (M), üçünde ise *tet* (L)

geni; gentamisin dirençli olanlarda ise tümünde gentamisin direnciyle ilgili *aac* (6′) *aph* (2″) geni bulunmuştur. Gentamisin dirençli streptokoklardan birinde (GLM 150) fenotipik direnç gözlenmesine rağmen ilgili gen bulunamazken, diğer bir suşta (GLM 198)'de ise *aac* (6′) *aph* (2″) geni bulunmasına rağmen fenotipik direnç gözlenmemiştir. Ayrıca 17 Streptokok izolatının 7 tanesi en az iki antibiyotiğe dirençlidir, yani çoklu antibiyotik direnci tespit edilmiştir. Çalışmamızda antibiyotik direnci açısından en riskli grubun streptokoklar olduğu söylenebilir ve hepsi mandıralarda satılan peynir (tulum, beyaz, lor, koyun) örneklerinden izole edilmiştir. Bu durumda, madıralarda satılan bu tip peynirler çiğ sütten imal ediliyor olabilir, ayrıca bu ürünlerde hayvanlardan sütlerine geçen antibiyotik dirençli bakteriler, bu direnci streptokoklara aktarmış olabilirler.

Teknolojik açıdan önemli kabul edilen tek streptokok türü *S. thermophilus* olarak belirtilmektedir. Bu türün antibiyotik direnciyle ilgili veriler de oldukça azdır, ancak genelde kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve siprofloksasine duyarlı olduğu bildirilmiştir (Aslim ve Beyatli, 2004; Katla vd., 2001; Temmerman vd., 2003). Bunun tersine, çalışmamızdakine benzer şekilde düşükten yüksek orana kadar gentamisin direnci de gösterebilmektedirler. *Streptococcus thermophilus* türünün antibiyotik direnci ve plazmid içeriği arasında bir ilişki bulunmaktadır (Aslim ve Beyatlı, 2004). Yine bulgularımızla benzer olarak, yetmiş adet *S. thermophilus* suşunun dördünde *erm* (B) geni varlığından ötürü eritromisin direnci saptanmıştır (Ammor vd., 2007).

4.4. Gots' Testi Sonuçları

Gots' testi, ampisilin, linkomisin, meropenem ve siprofloksasin antibiyotiklerinde MİK değerleri 1 µg/mL ve üzerinde olan izolatlarda "inaktivasyon yoluyla direnç" varlığının tespiti için kullanılmıştır. Gots' testi sonuçlarına göre; Ampisilin, meropenem ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı inaktivasyon yoluyla direnç varlığı gözlenmemiştir. Linkozamid inaktivasyonunu belirlemek için yarı sentetik klindamisin antibiyotiği kullanılmıştır. Linkozamid inaktivasyonu gözlenen örnekler Çizelge 4.16.' de belirtilmiştir.

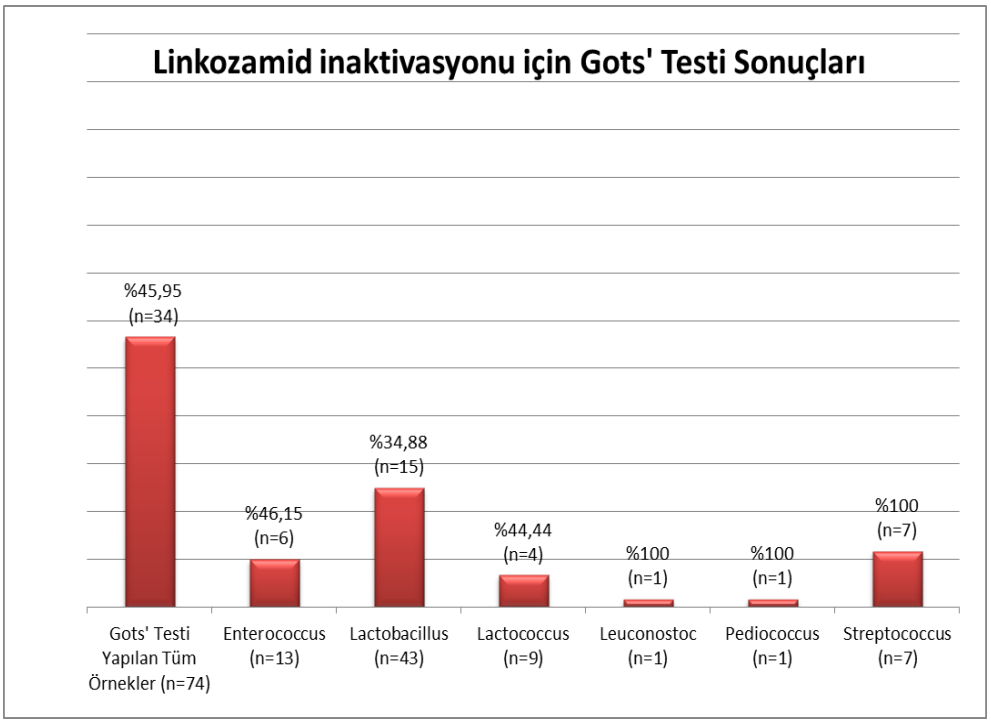
Çizelge 4.16. Linkozamid inaktivasyonu belirlenen örnekler.

İzolat	**16S rRNA Analiz Sonucu**	**Linkomisin MİK(µg/mL)**	**Gots' İnakti-vasyon**
GLM 131	*E. faecalis* strain DSPV 008SA	32	Var
GLM 132	*E. faecalis* strain OS13	64	Var
GLM 168	*E. faecium* DO	2	Var
GLM 144	*E. faecium* strain LET 301	16	Var
GLM 175	*E. faecium* strain MDF1104	2	Var
GLM 176	*E. faecium* strain MDF1104	32	Var
GLM 172	*Lb. brevis* strain T9	8	Var
GLM 55	*Lb. casei* strain NM68-3	1	Var
GLM 114	*Lb. casei* strain WX214	2	Var
GLM 90	*Lb. casei* W56	2	Var
GLM 170	*Lb. casei* W56	2	Var
GLM 202	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens strain:* Ni1467	1	Var
GLM 177	*Lb. paracasei* strain: T2-2	2	Var
GLM 120	*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strain KLDS 1.0631	1	Var
GLM 103	*Lb. plantarum* strain AY01	8	Var
GLM 162	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	1	Var
GLM 164	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	1	Var
GLM 165	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	2	Var
GLM 182	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	2	Var
GLM 197	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	2	Var
GLM 217	*Lb. rhamnosus* strain CNCM I-4036	1	Var

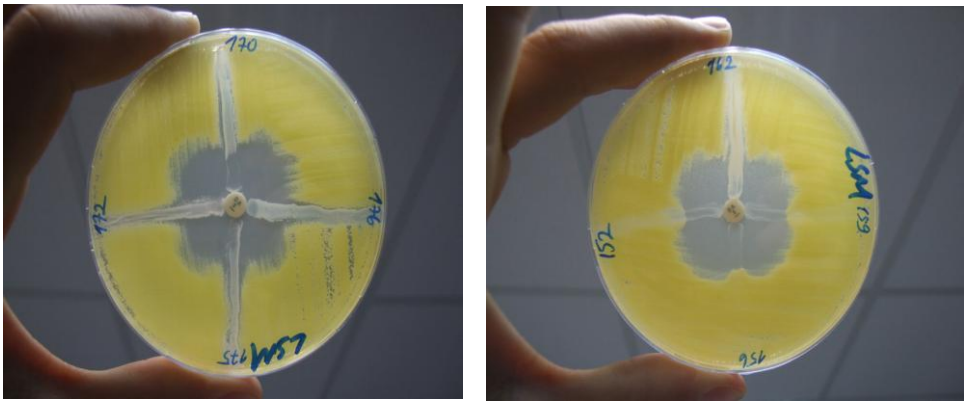
Çizelge 4.16. devamı.

İzolat	16S rRNA Analiz Sonucu	Linkomisin MİK(µg/mL)	Gots' İnakti-vasyon
GLM 152	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain MNC38	1	Var
GLM 111	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	2	Var
GLM 119	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	2	Var
GLM 159	*Lc. lactis* subsp. *lactis* strain M-T-MRS_25	2	Var
GLM 78	*Leuco. mesenteroides* strain 32MgMLAF	1	Var
GLM 121	*P. parvulus* strain: Ni555	2	Var
GLM 81	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	1	Var
GLM 148	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	4	Var
GLM 156	*S. lutetiensis* canine oral taxon 152 clone PP060	4	Var
GLM 151	*S. macedonicus* ACA-DC 198	1	Var
GLM 198	*S. macedonicus* ACA-DC 198	1	Var
GLM 187	*S. macedonicus* strain WX301	16	Var
GLM 193	*S. macedonicus* strain WX301	16	Var

Klindamisin için Gots' testi yapılan örneklerde linkomisine dirençli kabul edilen 49 LAB izolatının 20'sinde inaktivasyon gözlenmiştir. (Şekil 4.29.)MİK değerleri düşük olup, inaktivasyon gözlenen LAB suşları da bulunmuştur. Sonuçlara göre teste tabi tutulan tüm LAB izolatlarının % 45,94' ünde klindamisine karşı inaktivasyon yoluyla direnç gözlemlenmiştir. (Şekil 4.28.)



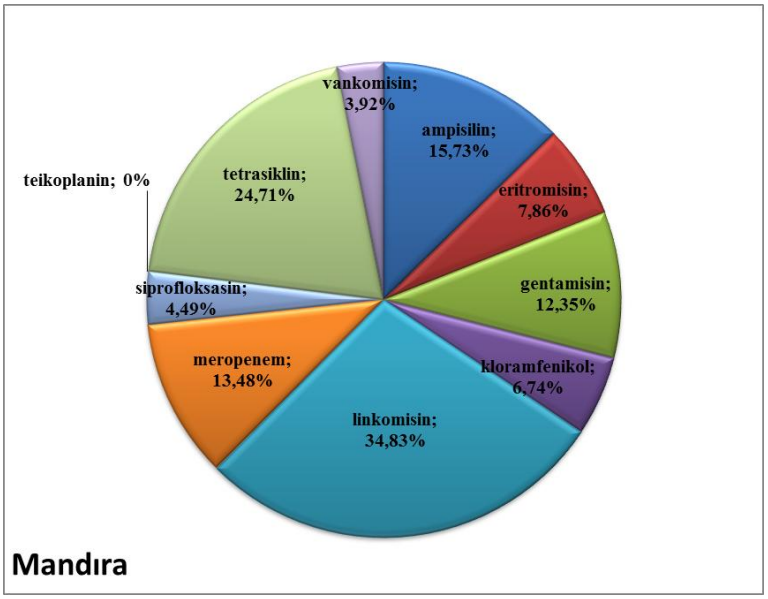
Şekil 4.28. Linkomazid inaktivasyonu için yapılan Gots' testi sonuçları



Şekil 4.29. Klindamisine karşı inaktivasyon yoluyla direnç gözlenen izolatlara örnek.

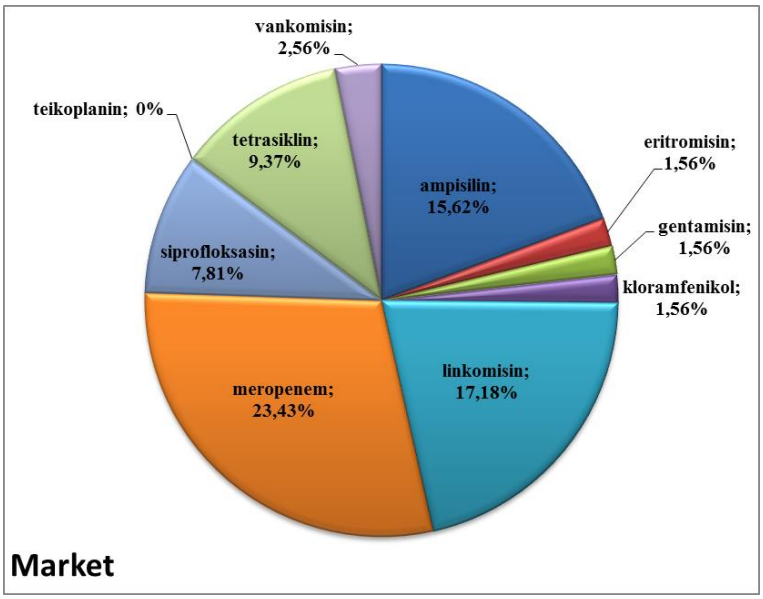
4.5. İzolasyon Kaynaklarına Göre LAB'nin Antibiyotik Direnç Yüzdeleri

İzolasyon kaynağına göre LAB ve antibiyotik dirençlilikleri değerlendirildiğinde en yüksek direnç yüzdeleri mandıra örneklerinde gözlenmiştir. (Şekil 4.30., Şekil 4.31. ve Şekil 4.32.)



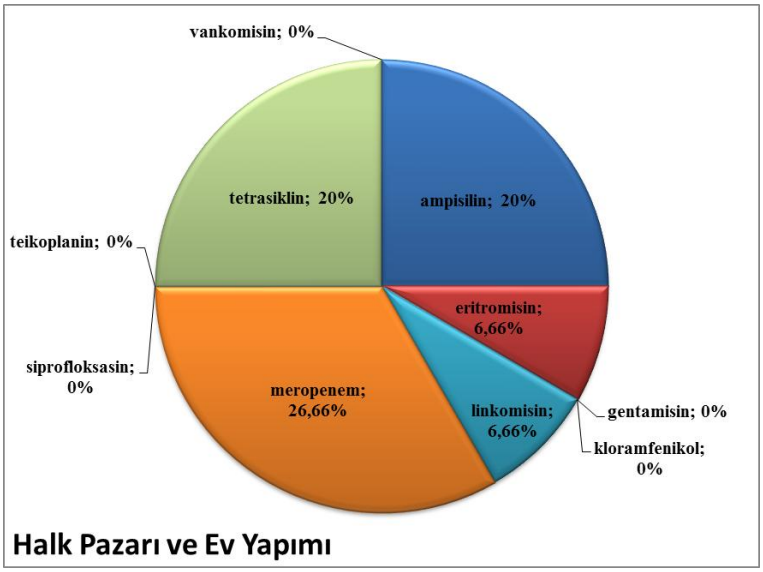
Her antibiyotik için; (n=89), teikoplanin için; (n=86)+(n=3 D.D.), vankomisin için; (n=51)+(n=38+D.D.).

Şekil 4.30. Mandıra örneklerinden izole edilen LAB' nin direnç dağılımları.



Her antibiyotik için; (n=64), teikoplanin için; (n=59)+(n=5 D.D.) ,vankomisin için; (n=39)+(n=25+D.D.).

Şekil 4.31. Market örneklerinden izole edilen LAB' nin direnç dağılımları.



Her antibiyotik için; (n=15), teikoplanin için; (n=12)+(n=3 D.D.), vankomisin için; (n=8)+(n=7+D.D.).

Şekil 4.32. Halk pazarı ve ev yapımı örneklerinden izole edilen LAB' nin direnç dağılımları.

5. SONUÇ

Son 50 yıl içerisinde insan ömrünün uzunluğu ve kalitesi, beslenme alışkanlıklarındaki gelişmeler ve enfeksiyon hastalıklarına karşı antibiyotiklerin kullanılmasıyla oldukça artmıştır. Bununla birlikte, antibiyotik uygulamalarının altın çağı, zararlı mikroroganizmalar arasında direncin ortaya çıkması ve yayılması ile giderek kapanmaktadır. Günümüzde ise, gıdalarda, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerindeki (GIS) LAB ve bifidobakteriler gibi kommensal bakteri populasyonları antibiyotik direnç genleri bakımından bir kaynak rolü oynayabileceği için oldukça dikkat çekmektedir. Bu direnç insan patojeni ve fırsatçı bakterilere aktarılarak, enfeksiyonların tedavisini zorlaştırabilir (Ammor vd., 2007).

Sonuç olarak, çalışmamızda izole edilen tüm LAB izolatları değerlendirildiğinde teikoplanin dışında tüm antibiyotiklere değişen oranlarda direnç gözlenmiştir. Antibiyotik direnci açısından linkomisin, tetrasiklin, meropenem ve ampisiline dirençli suş sayısı daha fazladır. Bu tür antibiyotiklerin yoğun kullanımından dolayı fermente süt ürünlerindeki LAB'nde bir seçilim baskısı oluşmuş olabilir.

LAB grupları arasında en yüksek antibiyotik direnci gösteren gruplar enterokok ve streptokoklar iken, en düşük yüzdeler *Lactococcus* cinsine dahil üyelerde saptanmıştır. Streptokoklar aynı zamanda en fazla çeşit ve sayıda antibiyotik direnç geni barındıran cinstir ve genotipik olarak çoklu antibiyotik direnci taşıyan 9 izolatın 7'si *Streptococcus* cinsine dahildir ve hepsi mandıra örneklerinden izole edilmiştir.

Fenotipik olarak çoklu antibiyotik direnci gözlenen izolatlar, yani birden fazla antibiyotik için MİK değerleri antibiyotik sınır değerlerinden yüksek olan izolatların oranı enterokoklar içerisinde %50, pediokoklarda %50, *Leuconostoc* suşlarında %44, streptokoklarda %41 ve laktobasillerde %31 oranındadır. *Lactococcus lactis* türlerinin hiçbirinde fenotipik olarak çoklu antibiyotik direnci gözlenmemiştir.

PCR denemeleri sonucu en fazla gözlenen direnç genleri *tet* (M) (%7,14), *aaa*(6')-*aph*(2'') (%5,95) ve *erm* (B) (% 4,76) olarak belirlenmiştir ve bu genler LAB'nde en sık bulunan direnç genleridir. Ayrıca bu genler plazmid ya da

transpozonlarca kodlanabildikleri için diğer patojenik ya da kommensal bakterilere aktarım riski taşımaktadırlar.

Çalışmamızdaki LAB izolatlarını, izolasyon kaynaklarına göre, market ürünleri, mandıra ürünleri ve halk pazarı/ ev yapımı ürünler olarak sınıflandırdığımızda, en yüksek antibiyotik direnç yüzdelerinin mandıra örneklerinde gözlendiği bulunmuştur. Bunları, market ürünleri ve halk pazarı/ev yapımı örnekleri izlemektedir. Bu durum mandıra ve market örneklerinin daha yoğun antibiyotik baskısının olduğu çevrelerden, özellikle hayvanların sağaltımında ve beslenmesinde aşırı antibiyotik kullanılan çiftlik vb. yerlerden kaynaklanması ile açıklanabilir. Ayrıca temin edilen kaynaklara bakılmaksızın sütün ısıl işleme tabi tutulmasıyla hazırlanan örneklerde (hazır kefir ve yoğurt) antibiyotik direncinin düşük olduğu gözlenmiştir.

Fermente süt ürünlerinden izole edilen LAB'nde antibiyotik direnç genlerinin saptanması ve bunların plazmid/transpozon yerleşimli olması, bu izolatların antibiyotik direncini diğer yararlı veya patojen bakterilere aktarabileceği anlamına gelmektedir. Dolayısıyla ilerideki çalışmalarda, direnç geni taşıyan bakterilerin konjugasyon denemeleri ile bu özellikleri başka bakterilere transfer edebilme yetenekleri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. MF., Jespersen, L. 2012. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology,** 12:75.

Akkan, G. 1997. Antibiyotiklerin sınıflandırılmaları. İ.Ü. **Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu**, (2-3 Mayıs), pp. 53-62, İstanbul.

Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 22–32.

Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiol**., 24: 559-570.

Ammor, M.S., Florez, A.B., Van Hoek, H.A., de Los Reyes-Gavilan, G.C., Aarts, H.J., Margolles, A., Mayo, B. 2008. Molecular characterization of Intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. **J. Mol. Microbiol Biotechnol**, 14: 6-15.

Anonim (16.07.2012). Vikipedi, özgür ansiklopedi, Antibiyotik. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Antibiyotik], Erişim Tarihi: 20.11.2012

Aslım, B., Beyatlı, Y. 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yoghurts. **Journal of Food Science and Technology**, 41: 18- 22.

Aydın, K. 2007. Makrolidler ve linkozamidler. **Ankem Derg**.,21(Ek 2): 57-61.

Azadnia, P., Khan, Nazer, A. H. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. **Iranian Journal of Veterinary Research Shiraz University**, 10: 235-240.

Batish, V.K., Ranganathan, B. 1986. Antibiotic susceptibility of deoxyribonuclease positive enterococci isolated from milk and milk products and their epidemiological significance. **Int. J. Food Microbiol**, 16: 203–206.

Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **Int. J. Food Microbiol**., 126: 278-285.

Bozdoğan, B. 2011. Antibiyotik İnaktivasyonuna Bağlı Direncin Fenotipik Tespiti. Antibiyotik Duyarlılığı İçin Fenotipik Yöntemler. Kurs Kitapçığı, 2: 33-35, Aydın.

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literatüre survey. **Crit. Rev. Microbiol**, 28: 281–370.

Clementi, F., Aquilanti, L. 2011. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. **Anaerobe**, 17: 394-398.

Condon, S. 1983. Aerobic metabolism of lactic acid bacteria. **Ir. J. Food Sci. Technol**, 7: 15–25.

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Lait,** 85: 193- 204.

Çataloluk, O., Gogebakan, B. 2004. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin. **FEMS Microbiol Lett**, 236: 7-12.

Çıtak, S., Yücel, N., Orhan, S. 2004. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish White cheese. **Int. J. Dairy Technol**, 57: 27-31.

D'aımmo, M.R., Modesto, M., Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. **Int. J. food Microbiol**, 115: 35-42.

Danielsen, M., Simpson, P.J., O'Connor, E.B., Ross, R.P., Stanton, C. 2006. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial angents. **J. Appl. Microbiol**, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03097.x.

Danielsen, M., Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **Int. J. Food Microbiol**, 82: 1-11.

Davies, R., Roberts, T.A. 1999. Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from commercial swine carcasses: effect of feed additives. **Lett. Appl. Microbiol.**, 29: 327– 333.

DeLisle, S., Perl, T.M. 2003. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. **Chest**, 123: 504–518.

Delorme, C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **Int. J. Food Microbiol**., 126: 274-277.

Donabedian, S.M., Thal, L.A., Hershberger, E., Perri, M.B., Chow, J.W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce, K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Mackinson, C., Debess, E., Madden, J., Angulo, F., Zervos, M.J. 2003. Molecular characterization of gentamicinresistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. **J. Clin. Microbiol**, 41 (3): 1109–1113.

EFSA 2007. Opinion of the scientific committe on a request from EFSA on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assesment of selected microorganisms referred to EFSA. **The EFSA J**.,187: 1-16.

EFSA 2008. European Commission. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in th e assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **The EFSA J.,** 732: 1-15.

Egervärn, M., Roos, S., Lindmark, H. 2009. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum.* **Journal of Applied Microbiology**, 107: 1658 – 1668.

European Commission. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on The Criteria for Assessing The Safety of Micro Organisms Resistant to Antibiotics of Human Clinical and Veterinary Importance. Adopted on 3 July 2001, revised on 24 January 2003.

Evren, M., Apan, M., Tutkun, E., Evren, S. 2011. Geleneksel fermente gıdalarda bulunan laktik asit bakterileri. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR**, 9: 11-17.

FEEDAP European Commision 2005. Opinion of the FEEDAP panel on the updating of the criteria used in the assesment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA J**., 223: 1-12.

Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 4385– 4389.

Frazzon, A.P.G., Gama, B.A., Hermes, V., Bierhals, C.G., Pereira, R.I., Guedes, A.G., d'Azevedo, P.A. and Frazzon, J. 2010 Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance

mediated by tetM and tetL genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World J. Microb. Biot.**, 26: 365–370.

Gevers, D., Danielson, M., Huys, G. 2003. Molecular characterization of *tet*(M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69: 1270–1275.

Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. **FEMS Microbiol. Rev**, 26: 163–171.

Gülay, Z. 2002. Antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumu. **Toraks Dergisi**, 1: 75-88.

Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S. 1998. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. **Letters in Applied Microbiology**, 26: 153-154.

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

Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. 2007a. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from *enterococci* isolated from food. **Syst. Appl. Microbiol.**, 30: 1-7.

Hummel, A.S., Hertel C., Holzapfel, W. H., and Franz, C. M. A. P. 2007b. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol**., 73: 730-739.

Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.-M., Swings, J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from food. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70 (3): 1555–1562.

Katla, A.K., Kruse, H., Johnsen, G., Herikstad, H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products**. Int. J. Food Microbiol.**, 67: 147–152.

Kim, K.S., Morrison, J.O., Bayer, A.S. 1982. Deficient autolytic enzyme activity in antibiotic-tolerant lactobacilli. **Infect. Immun**, 36: 582–585.

Klare, I., Konstabel, C., Müller-Bertling, S., Reissbrodt, R., Huys, G., Vancanneyt, M., Swings, J., Goossens, H.,Witte, W. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli, Pediococci, Lactococci,* and *Bifidobacteria.* **Applied and Environmental Microbiology,** 71: 8982–8986.

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **J. Antimicrob. Chemother**, 59: 900-912.

Klein, G., Hallmann, C., Casas, I. A. 2000. Exclusion of *van*A, *van*B and *van*C type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. **J. Appl. Microbiol.**, 89: 815-824.

Klein, G., Pack, A., Reuter, G.1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 1825–1830.

Knudtson, L.M., Hartman, P.A. 1993. Antibiotic resistance among enterococcal isolates from environmental and clinical sources. **J. Food Prot.**, 56: 489 – 492.

Korhonen, J. 2010. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. University of Eastern Finland, Dissertations in Forestry and Natural Sciences, Finland.

Kök Taş, T., Ekinci, F.Y., G.Şeydim, Z.B. 2011. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. **International Journal of Dairy Technology**, 65/1: 126-131.

Leclercq, R., Dutka-Malen, S., Duval, J., Courvalin, P. 1992. Vancomycin resistance gene *van*C is specific to *Enterococcus gallinarum.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 36: 2005-2008.

Liu, C., Zhang, Z., Dong, K., Yuan, J., 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.

Lopes, M.d.F.S., Ribeiro, T., Martins, M.P., Tenreiro, R., Crespo, M.T.B. 2003. Gentamicin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. **J. Antimicrob. Chemother**, 52: 214–219.

Mathur, S., Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. **Int. J. Food Microbiol**., 105: 281-95.

Navidghasemizad, S., Hesari, J., Saris, P., Nahaei., M R. 2009. Isolation of lactic acid bacteria from Lighvan cheese, a semihard cheese made from raw sheep milk in Iran. **International Journal of Dairy Technology**, 62-(2): 260-264.

Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J.E., Millar, B.C., Xu, J. 2011. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. **Curr. Microbiol.**, 62: 1081–1089.

Nazik, H., Öngen, B. 2010. Türkiye'de plazmit aracılı kinolon direnci. **Ankem Derg**., 24(1): 46-54.

Ogier, J.C., Casalta, E., Farrokh, C., Saïhi, A. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. **Int. J. Food Microbiol**., 126: 286-290.

Osmanağaoğlu, Ö., Beyatlı, Y. 2002. The use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria ın food biopreservation. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg**., 32: 295-306.

Ouoba, L., Lei, V., Jensen, L. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **Int. J. Food Microbiol.,** 121: 217-224.

Öztürk, R. 2002. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç geliştirme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. **İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri**, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, 31: 83-100.

Pan, L., Hu, X., Wang, X. 2011. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods, **Food Control**, 22: 1316-1321.

Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G., Teuber, M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. **Nature**, 389: 801–802.

Putman, M., van Veen, H.W., Degener, J.E., Konings, W.N. 2001. The lactococcal secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines. **Microbiology**, 147: 2873–2880.

Quednau, M., Ahrne´, S., Petersson, A.C., Molin, G. 1998. Antibiotic- resistant strains of Enterococcus isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. **J. Appl. Microbiol.**, 84: 1163 – 1170.

Robrido, B., Singh, K.V., Baquero, F., Murray, B.E., Torres, C. 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. **Int. J. Food Microbiol.**, 54: 197–204.

Rodriguez-Alonso,P., Fernandez-Otero, C., Centeno, J.A., Garabal, J.I. 2009. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheesemaking. **Journal of Food Science**, 74(6): 284-293.

Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Poeta, P. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **Int. J. Food Microbiol**, 111: 234-240.

Sorek, R., Zhu, Y., Creevey, C.J., Francino, M.P., Bork, P., Rubin, E.M. 2007. Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. **Science,** 318: 1449–1452.

Sutclıffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrob. Agents Chemother**, 40: 2562-2566.

Swenson, J.M., Facklam, R.R., Thornsberry, C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. **Antimicrob. Agents Chemother**, 34: 543–549.

Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R. 1984. Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, Ege Üniv. Fen Fak. Teksirler Serisi, No: 55, İzmir.

Tankovic, J., Leclercq, R., Duval, J. 1993. Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. **Antimicrob. Agents Chemother**, 37: 789–792.

Tatlı, D. 2009. Geleneksel Süt Ürünlerinden Izole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enst., Yüksek Lisans Tezi, Adana.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **Int. J. Food Microbiol.**, 81: 1-10.

Teuber, M., Perreten, V. 2000. Role of milk and meat products as vehicles for antibiotic-resistant bacteria. **Acta. Vet. Scand.,** 93: 75– 87.

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. **Antonie van Leeuwenhoek**, 102: 541–551.

Toomey, N., Bolton, D., Fanning, S. 2010. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. **Research in Microbiology**., 161: 127-135.

Turner, P.C., Mclennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. 2004. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. Nobel Yayın, 613: 346 s.

Walsh, C. 2003. Natural and producer immunity versus acquired resistance. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, Press, ASM., Ed. pp. 91-106, Washington.

Werner, G., Willems, R.J.L., Hildebrandt, B. 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 1499–1506.

Yüce, A. 2001. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. **Klinik Dergisi,** 2: 41-46.

Zarazaga, M., Sa´ enz, Y., Portillo, A., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., Del Campo, R., Baquero, F., Torres, C. 1999. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother**, 43: 3039–3041.

Zhou, N., Zhang, J.X., Fan, M.T., Wang, J., Guo, G., Wei, X.Y. 2012. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. **Journal of Dairy Science**, 95/ 9: 4775-4783.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Melihcan ÖZTEBER

Doğum Yeri ve Tarihi : BURSA / 29.01.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

Başbülbül Özdemir, G., Oryaşın E., Bıyık H.H., **Özteber M**., Bozdoğan B. 2011. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. **Indian J Microbiol**, 51, (2):182–187.

Özteber M., Sertel Y., Başbülbül Özdemir G. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented dairy products and boza in Aydin. **Current Opinion in Biotechnology**, Vol.22, Suppl.1, S: 94,(Özet).

b) Bildiriler

-Uluslar arası

Özteber M., Sertel Y., Başbülbül Özdemir G. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented dairy products and boza in Aydin. **Current Opinion in Biotechnology**, Vol.22, Suppl.1, S: 94, (Poster Bildiri).

Özteber M. 2009. Entomopatojen Funguslar ve Biyolojik Mücadeledeki Yeri. **II. Entomopatojenler ve Mikrobiyal Mücadele Sempozyumu**, (Sözlü Bildiri).

-Ulusal

Başbülbül Özdemir G., **Özteber M**. 2012. Et ve Süt Ürünlerinde *Listeria Monocytogenes* Gelişimini Engellemek için Yeni Bir Bakteriyosin (Toebicin 218)'in Kullanım Olanaklarının Araştırılması. **TİM Gıda Ar-Ge Proje Pazarı**, İzmir, P-016, S: 47, (Poster Bildiri).

c) Katıldığı Projeler

"Termofilik bakterilerde PCR yöntemiyle bakteriyosin genlerinin taranması", Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, FEF-10006. 2010-2012.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : melihcandurmaz@hotmail.com
melihcandurmaz@gmail.com

Tarih : …/…/ 2013