



Hayvansal Gıdalardan Elde Edilen *Kocuria Varians* İzolatlarının Biyofilm Üretim ve Antibakteriyel Direnç Profillerinin Araştırılması

 Yasin ÖZKAYA¹  Dursun Alp GÜNDOĞ¹  Candan GÜNGÖR²  Nurhan ERTAŞ ONMAZ²

¹ Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kayseri/Türkiye

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Kayseri/Türkiye

◆ Geliş Tarihi/Received: 02.09.2024

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 30.09.2024

◆ Yayın Tarihi/Published: 31.12.2024

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Özkaya Y, Gündoğ D, Güngör C, Ertaş-Onmaz N. Hayvansal Gıdalardan Elde Edilen *Kocuria Varians* İzolatlarının Biyofilm Üretim ve Antibakteriyel Direnç Profillerinin Araştırılması. *Bozok Vet Sci* (2024) 5, (2):48-54.

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ilinde bulunan perakende gıda satış merkezlerindeki et ve süt ürünlerinde doğal olarak bulunan veya starter kültür olarak kullanılan *Kocuria* spp. prevalansı, biyofilm oluşturma yetenekleri ve antibiyotik direnç profillerinin araştırılması amaçlandı. Bu kapsamda, satış merkezlerinden toplanan 70 adet hayvansal gıda örneklerinden seri dilüsyonlar halinde kanlı agar ekim yapıldı ve elde edilen farklı koloniler Phoenix otomatik sistemi (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) ile tanımlandı. Elde edilen izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri, mikroploka yöntemi; antibiyotik duyarlılıkları ise disk difüzyon testi ile belirlendi. Analiz edilen 70 örneğin 5 (%7.14)'inde *Kocuria varians*, 1'inde (%1.42) *Corynebacterium matruchotii*, 1'inde (%1.42) *Corynebacterium jeikeium* ve 1'inde (%1.42) *Streptococcus oralis* belirlendi. Tanımlanan izolatlar arasında, et ürünlerinden izole edilen *K. varians* izolatları orta biyofilm oluşturma yeteneğine sahipken, peynirden elde edilen zayıf biyofilm özelliğine sahipti. Elde edilen *K. varians* izolatlarının tamamı oksasilin'e dirençli iken 4'ü (%80) linezolid ve rifampisine karşı da direnç göstererek çoklu ilaç direnç profili sergiledi. Bu izolatların ÇAD indeksi 0.43 olarak belirlendi. Sonuç olarak, bu çalışmada et ve süt ürünlerinden elde edilen *K. varians* izolatları biyofilm üretebilmeleri, çoklu antimikrobiyal direncine sahip olmaları ve gıda patojenlerine gen aktarımını artırabilme riski nedeniyle gıda güvenliği ve halk sağlığı sorunları oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnç, biyofilm, gıda güvenliği, hayvansal gıda, *K. varians*

Investigation of Biofilm Production and Antibacterial Resistance Profiles of *Kocuria varians* Isolates from Animal Originated Foods

Abstract: This study aimed to determine the prevalence of *Kocuria* spp., which occur naturally or are used as starter cultures, in meat and dairy products sold in retail food outlets in Kayseri province, as well as to evaluate their biofilm formation capabilities and antibiotic resistance profiles. In this context, serial dilutions of 70 animal food samples collected from sales outlets were plated on blood agar, and the different colonies obtained were identified using the Phoenix automated system (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD). The biofilm-forming abilities of the isolates were determined using the microplate method, and their antibiotic susceptibilities were assessed by the disk diffusion test. Of the 70 analyzed samples, 5 (7.14%) were found positive for *Kocuria varians*, 1 (1.42%) for *Corynebacterium matruchotii*, 1 (1.42%) for *Corynebacterium jeikeium*, and 1 (1.42%) for *Streptococcus oralis*. Among the identified isolates, *K. varians* isolates from meat products exhibited moderate biofilm-forming ability, while those from cheese showed weak biofilm-forming ability. All *K. varians* isolates were resistant to oxacillin, and 4 isolates (80%) also exhibited resistance to linezolid and rifampicin, indicating a multidrug resistance profile. The Multiple Antibiotic Resistance index of these isolates was determined to be 0.43. In conclusion, the *K. varians* isolates obtained from meat and dairy products may pose food safety and public health concerns due to their ability to form biofilms, exhibit multidrug resistance, and the risk of gene transfer to foodborne pathogens.

Keywords: Antibiotic resistance, biofilm formation, food safety, animal products, *K. varians*

1. Giriş

Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar, başta hayvansal gıda ürünleri olmak üzere, kontamine gıda maddelerinin tüketimi sonucunda gıda güvenliğini ve insanlarda hastalıklara neden olabileğinden dolayı halk sağlığını olumsuz etkilemektedir (1). Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlara neden olan başta *Salmonella* ve *Campylobacter* cinsleri olmak üzere, en sık karşılaşılan bakteriler *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7,

Listeria monocytogenes, *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp. ve *Aeromonas* spp.'dir (1). Bu patojenlerin yanı sıra, et ve süt ürünlerinde bulunan *Kocuria* spp.'lerin bazı türleri de son zamanlarda giderek artan bir şekilde insan enfeksiyonlarının nedeni olarak bildirilmektedir (2).

Kocuria türleri, *Micrococcaceae* ailesi, *Actinomycetales* takımı ve *Actinobacteria* sınıfına ait katalaz pozitif ve koagülaz negatif Gram pozitif kokoid bakterilerdir (3).

Kocuria cinsine ait henüz 18 tür (*K. varians*, *K. rosea*, *K. kristinae*, *K. palustris*, *K. rhizophila*, *K. marina*, *K. polaris*, *K. aegyptia*, *K. carniphila*, *K. himachalensis*, *K. flava*, *K. turfanensis*, *K. atrinae*, *K. gwangalliensis*, *K. halotolerans*, *K. koreensis*, *K. coralli* ve *K. salsicia*) tanımlanmıştır (4). Çoğu *Kocuria* türü 20°C ile 37°C arasında ürerken, *K. aegyptia* ve *K. marina* ise sırasıyla 40°C ve 43°C'ye kadar üreyebilir. Buna karşılık, *K. polaris* 5°C'de büyüeyebilir. Çoğu suşu %5 NaCl'ye tolerans gösterir (4). Genellikle orofarenks, deri ve mukoza zarında kolonize olan bu kommensal mikroorganizmalar, et ve süt gibi gıda ürünlerinin yanı sıra, memeli derisi, tatlı su, deniz suyu, buzullar gibi soğuk habitatlardan veya derin su kaynaklarından izole edilmişlerdir (2,4,5). *Kocuria* türleri gıdalarda genellikle laktik asit bakterileriyle beraber izole edilirler (2,6). *Kocuria* cinsinde yer alan 18 tür arasında 5'inin (*K. kristinae*, *K. varians*, *K. rhizophila*, *K. rosea* ve *K. marina*) fırsatçı patojenler olduğu bilinmektedir ve daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış, intravenöz kateter veya peritoneal diyaliz kullanan hastalarda tanımlanmıştır (7). Bu türlerden, *K. varians*, gıda endüstrisinde özellikle serbest amino asitlerin yıkımı ve yağ asitlerinin oksidasyonu ile bazı ürünlerin organoleptik benzersizliğine katkıda bulunabilir ancak aynı zamanda toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardan da sorumludur (2,3,4,5,8,9). Etkenin en önemli virülans faktörlerinden birisi olan biyofilm oluşturma yetenekleri ve antibiyotik direnç mekanizmaları ile halk sağlığı açısından risk teşkil edebilirler (2). *K. varians* 'ın ve biyofilminin varlığının diğer mikroorganizmalardan farklı olarak, yüzeylerde *L. monocytogenes* 'in biyofilm oluşturmalarını desteklediği ortaya konmuştur (2). Buna ilaveten *Kocuria* türlerinin, oksasilin, penisilin, eritromisin, tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri rapor edilmiştir (6,10,11,12). Ayrıca bu türün bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı patojen olarak peritonitis ve beyin apsesi gibi hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (5). Bunun yanı sıra, *Kocuria* türleri ile koagülaz negatif stafilokoklar arasındaki fenotipik benzerlik nedeniyle, bu iki cins arasındaki yanlış tanımlama *Kocuria* türlerinin yetersiz tanısına yol açabilmektedir (8). Ancak matriksle desteklenmiş lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), 16S rRNA gen sekanslama, VITEK (BioMerieux, NC, ABD), VITEK 2 (BioMerieux, NC, ABD) ve BD Phoenix™ otomatize sistemleri (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) gibi gelişmiş mikrobiyolojik tekniklerin kullanımı ile etkenin izolasyon oranı artmıştır (8,9). Ülkemizde, gıda kaynaklı mikroorganizmalardan *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* ve *L. monocytogenes* gibi mikroorganizmalara ile ilgili geniş bir bilgi yelpazesi vardır (13,14,15,16,17). Ancak, gıda kaynaklı *Kocuria spp.* gibi bazı mikroorganizmalarla ilgili yeterince bilgi bulunmamaktadır.

Bu kapsamda bu çalışma, Kayseri ilinde bulunan hayvansal ürün perakende satış merkezlerindeki et ve süt ürünlerinde

Kocuria cinsine ait türlerin Phoenix otomatik sistemi (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) ile belirlenmesi, elde edilen izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerinin ve antibiyotik dirençlerinin belirlenerek bu mikroorganizmanın potansiyel gıda güvenliği ve halk sağlığı tehlikelerinin araştırılması amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

Kayseri ilinde bulunan hayvansal ürün perakende satış merkezlerinden 10'ar adet kaşar peyniri, beyaz peynir, yoğurt, pastırma, salam, sosis ve sucuk olmak üzere toplam 70 örnek, aseptik koşullarda toplanarak (ISO/TS 17728:2015) soğuk zincir koşullarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Laboratuvarı'na getirilerek 1-2 saat içinde analiz edildi.

2.1. *Kocuria spp.* İzolasyonu

Bu amaçla, her numunedan 10 g alınarak 90 mL steril %0.1'lik peptonlu su (BPW, Oxoid, Birleşik Krallık) ilestomacher poşeti içerisinde homojenize edildikten sonra 30°C'de 5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, kültürün on kat dilüsyonları (10⁻¹ -10⁻⁴) hazırlandı. Her bir dilüsyondan 0.1 mL alınarak kanlı agara (Merck, Almanya) ekildi ve 30° C'de 24-48 saat aerobik olarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında gelişen farklı morfolojideki koloniler kanlı agara subkültüre edilerek 30° C'de 24 saat inkübe edildi. Kanlı agarda hemoliz oluşturmayan, 2-3 mm boyutlarında, beyazımsı, küçük, yuvarlak formda olan koloniler, Gram boyama, hareket, katalaz, koagülaz testlerine tabi tutuldu (3,8). Fenotipik testler sonucunda elde edilen şüpheli koloniler BD Phoenix™ - Gram Positive ID Paneli (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinde Phoenix sistemi (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda tür bazında tanımlandı.

2.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları, Kirby-Baur disk difüzyon yöntemi ile ticari antibiyotik diskleri (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, doksisisiklin (30 µg), azitromisin (15 µg), penisilin (10 UI), rifamisin (5 µg), linezolid (30 µg), oksasilin (1 µg), klindamisin (2 µg) ve vankomisin (30 µg) antibiyotik kullanıldı (18). Kısaca, izolatlar kanlı agara (Merck, Almanya) ekilerek 1 gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, her bir izolata ait kolonilerden, bulanıklığı 0.5 McFarland standardına göre steril fizyolojik tuzlu su (%0.85 NaCl) ile ayarlandı. Elde edilen her bir süspansiyonun Mueller-Hinton agar (MHA, Merck, Almanya)'a yayma plak yöntemi ile ekilmesini takiben agarların üzerlerine antibiyotik diskler yerleştirilerek 24 saat 37°C'de inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon sonrasında, diskleri çevreleyen inhibisyon zon çapları ölçülerek kaydedildi. Duyarlılık yorumlanması için Klinik ve

Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) sınır değerleri kullanıldı (18). Çoklu Antibiyotik Direnç İndeksi (ÇAD indeksi), test izolatların her birinin dirençli olduğu antibiyotik sayısının çalışmada kullanılan toplam antibiyotik sayısına oranı olarak hesaplandı (19).

2.3. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma yetenekleri mikroplak (MP) yöntemi ile belirlendi (20). Özetle, izolatlar %2'lik glikoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Almanya) içerisinde 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bakteri kültürlerinin yoğunlukları 0,5 McFarland (~ 1 × 10⁸ kob/mL) standardına göre ayarlandı. Hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan 100'er µL alınarak 96 kuyucuklu, düz tabanlı ve steril polistiren mikrotitre plakasına eklendi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Kuyucukların birine pozitif kontrol olarak güçlü biyofilm üreten *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ilave edildi. Sadece steril TSB içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyonun ardından her bir kuyu boşaltılarak 250 µL fizyolojik tuzlu su ile üç tekrarlı şekilde yıkandı. Oluşan biyofilm yapısının fiksasyonu sağlamak için her bir kuyucuğa 200 µL %99'luk metanol (Merck, Almanya) eklendi ve 15 dakika bekletildi. Fiksasyon sonrası 30 dk boyunca kurutulan kuyucuklar, 200 µL %1'lik kristal viyole (Merck, Almanya) eklenerek 5 dakika boyunca boyandıktan sonra, tutunmayan

boyanın uzaklaştırılması amacı ile steril distile su ile yıkandı ve 30 dk kurumaya bırakıldı. Plakanın kurutulmasını takiben,

boyanın dağılması amacıyla kuyucuklara 160 µL %33'lük glasiyal asetik asit eklendi. Plakaların optik dansitesi (OD) 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucu (MultiskanFC-51119000, Thermo, ABD) kullanılarak ölçüldü. Her izolat ve kontrollerin analizleri üç tekrarlı yapıldı ve tekrarların ortalama OD'leri alınarak aşağıdaki formülde belirtildiği şekilde negatif kuyucukların cut off (sınır, OD_c) değeri ile kıyaslanarak biyofilm varlığı ve gücü belirlendi. Mikrotitre plaka testi için kesme OD (OD_c), negatif kontrolün ortalama OD'sinin üç standart sapma üzerinde olarak tanımlandı ve biyofilm özellikleri Stepanović ve ark. (20) tarafından tarif edildiği gibi şu şekilde sınıflandırıldı: OD ≤ OD_c biyofilm (-), OD_c < OD ≤ 2X OD_c zayıf biyofilm (+), 2X OD_c < OD ≤ 4X OD_c orta biyofilm (++) , 4X OD_c < OD güçlü biyofilm (+++) oluşumu.

3. Bulgular

Çalışmada analiz edilen 70 hayvansal gıda örneğinden, yapılan konvensiyonel analizler sonucunda Gram pozitif, hareketsiz, katalaz pozitif ve koagülaz negatif özellikteki *Kocuria* spp. şüpheli 50 izolat elde edildi. BD Phoenix™ - Gram Pozitif ID Paneli ile analiz edilen izolatların %95-99 güven aralığında yapılan tanımlamaları sonucunda; 5 (% 10)'i *Kocuria varians*, 1 (%2)'i *Corynebacterium matruchotii*, 1 (%2)'i *Corynebacterium jeikeium* ve 1 (%2)'i *Streptococcus oralis* olarak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada Analiz Edilen Örneklerde İzole Edilen Bakteriler

Analiz Edilen Örnek	İzole Edilen Bakteri ve Oranı (%)			
	<i>K. varians</i>	<i>C. matruchotii</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>S. oralis</i>
Kaşar peyniri (n=10)	-	-	-	-
Yoğurt (n=10)	-	-	-	-
Beyaz peynir (n=10)	1 (10)	-	-	1 (10)
Pastırma (n=10)	2 (20)	-	1 (10)	-
Salam (n=10)	1 (10)	-	-	-
Sosis (n=10)	-	1 (10)	-	-
Sucuk (n=10)	1 (10)	-	-	-
Toplam (n=70)	5 (7.14)	1 (1.42)	1 (1.42)	1 (1.42)

K. varians izolatlarının büyük çoğunluğu (%80;4/5) et ürünlerinden izole edilirken, yalnızca biri (%20;1/5) süt ürünlerinden izole edildi. Bu türün analiz edilen örneklerdeki dağılımı ise; %2 (2/10)'sı pastırma, %1 (1/10)'i sucuk, %1 (1/10)'i salamdan ve %1 (1/10)'i beyaz peynir örneği

şeklindeydi. Ayrıca, analiz edilen örneklerden beyaz peynir, pastırma ve sosiste sırasıyla *S. oralis* (n=1), *C. jeikeium* (n=1) ve *C. matruchotii* (n=1)'da belirlendi.

Çalışmada elde edilen *K. varians* izolatlarının tamamı biyofilm üretme özelliğine sahipti. Et ürünlerinden izole

edilen dört *K. varians* izolatı (%80; 4/5) orta düzeyde biyofilm oluşturma yeteneğine sahipken, peynirden elde edilen bir izolat (%20; 1/5) zayıf biyofilm oluşturma yeteneğine sahipti. Ayrıca *S. oralis* orta, *C. matruchotii* zayıf ve *C. jeikeium* güçlü biyofilm özelliği gösterdi (Tablo 2).

Çalışma kapsamında elde edilen *K. varians* izolatlarının tamamı oksasiline dirençli iken dört *K. varians* izolatı (%80) oksasilin'in yanında linezolid ve rifamisine karşı da direnç göstererek çoklu ilaç direnç (ÇAD) profili sergiledi (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmada elde edilen *K. Varians* izolatlarının kaynağı, biyofilm kabiliyeti ve antibiyotik direnç profili.

Bakteri Türü	İzole Edilen Kaynak	Pozitif İzolat Sayısı	İzolatlarının MPT'de Biyofilm Yapma Kabiliyeti (%)			Antibiyotik Direnç Profili	ÇAD indeksi =a/b
			Güçlü	Orta	Zayıf		
<i>K. varians</i>	Beyaz peynir	1	-	-	1 (100)	Oksasilin	-
	Pastırma	2	-	2 (100)	-	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	0.43
	Salam	1	-	1 (100)	-	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	0.43
	Sucuk	1	-	1 (100)	-	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	0.43
<i>S. oralis</i>	Beyaz peynir	1	-	1(100)	-	-	-
							0.43
<i>C. matruchotii</i>	Sosis	1	-	-	1(100)	Rifamisin, Linezolid, Oksasilin	-
<i>C. jeikeium</i>	Pastırma	1	1(100)	-	-	Penisilin, Oksasilin	-

4. Tartışma ve Sonuç

Kocuria spp.'nin gıdalarda giderek artan varlığı rapor edilmekte olup, diğer Gram pozitif koklarla olan yapısal ve biyokimyasal benzerlikleri nedeniyle izolasyonları ve kantifikasyonları gıda endüstrilerinde dikkate alınmamaktadır. *Kocuria* spp.'ler biyoteknolojik potansiyellerine rağmen, bu bakterilerin patojenik özellikleri ve biyofilm oluşturma kapasiteleri nedeniyle endüstriyel kullanımlarıyla ilgili endişeler bulunmaktadır (4,5). Bildiğimiz kadarı ile *Kocuria* cinsi bakterilerin hayvansal gıdalardaki prevalansına ait sınırlı sayıda bulunan önceki çalışmalarda daha çok süt ve süt ürünlerine odaklanılmıştır (2,6,12,21,22). Bu çalışmalardan, Machado ve ark. (6), pastörize edilmiş süt örneklerinin %25'inde, Rodriguez-Alonso ve ark. (12), analiz ettikleri peynir izolatlarının %3'ünde *K. varians* izolasyonunu rapor etmişlerdir. Bunun yanında, Organji ve ark. (21) inceledikleri çiğ süt örneğinin %40'ında *K. rhizophila*, Weber ve ark. (23) süt çiftliklerindeki sağım makinelerinde *K. salsicia* izole etmişlerdir. Bahsi geçen çalışmalardan farklı olarak, bu

ÇAD profili sergileyen *K. varians* izolatlarının tamamı et ürünlerine aitti ve ÇAD indeksi 0.43 idi. Diğer yandan *K. varians* izolatların tamamı doksisisiklin, azitromisin, penisilin ve klindamisin'e duyarlı idi.

Benzer şekilde *C. matruchotii* ve *C. jeikeium* da oksasilin'e dirençliydi. Bunun yanında *C. matruchotii* rifamisin, ve linezolid'e, *C. jeikeium* ise penisiline dirençliydi. *S. oralis* ise test edilen tüm antibiyotiklere duyarlıydı (Tablo 2).

çalışmada hem süt hem de et ürünlerinde *Kocuria* spp. varlığı araştırıldı ve analiz edilen örneklerin %7.14'inde *K. varians* belirlendi. İzole edilen *K. varians*'ın 4'ü (%80) et ürünlerine (2 pastırma, 1 sucuk ve 1 salam) ve biri (%20) ise peynir örneğine aitti. Benzer şekilde, Gardini ve ark. (10) inceledikleri 53 kuru fermente edilmiş sosis örneklerinden %5.6'sında *K. kristinae* izole etmişler ve %3.77'sini de *Kocuria* cinsi düzeyinde tanımlamışlardır. Bu çalışmada *K. varians*'ın et ürünlerinde daha yaygın bulunması, Gardini ve ark. (10)'nın da belirttiği gibi hayvanların mukozasında ve derisinde kommensal olarak bulunan bu bakterilerin kesim işlemleri sırasında çapraz kontaminasyonla ete geçebileceğini ve dolayısı ile sucuk, salam ve pastırma üretimi için kullanılan ham maddenin yabancı mikrobiyotasını oluşturmuş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca et kimyasal bileşimi nedeniyle kabul edilemez düzeylerde mikrobiyal büyümeyi desteklediğinden et ürünleri üretiminde kullanılan etin yüzeyindeki ilk mikroorganizma sayısı, süt pastörizasyonunda olduğu gibi azaltılamaz (24,25). Bu çalışmada etken süt ürünleri arasında sadece beyaz peynirden

izole edilirken kaşar peyniri ve yoğurttan izole edilememiştir. Türk beyaz peynirinin yüksek nem ve pH seviyesine sahip olması, onun kaşar peyniri gibi sert veya yarı sert ve nem oranı nispeten daha düşük peynirlere göre daha fazla mikrobiyal büyümeye eğilimli olmasına neden olmaktadır. Ayrıca beyaz peynir için kontaminasyonun diğer nedeni patojenlerin, kirlenmiş salamura suyu kullanımı ile peynire aktarılabilmesidir (26). Geleneksel Türk süt ürünü olan yoğurt ise düşük pH'ya sahip olması nedeniyle diğer süt ürünlerine göre mikrobiyal bozulmalara karşı daha dayanıklıdır (27).

Kocuria cinsi bakterilerin hayvansal gıdalardaki prevalansına ait sınırlı veri olmasının diğer ana sebebinin ise izole edilen bu cinsin diğer koagülaz negatif stafilokoklarla fenotipik benzerlikleri nedeni ile karıştırılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (8). *Kocuria* türlerinin tanımlanması amacıyla uygulanan moleküler analizlerin veya VITEK ve BD Phoenix™ otomatize sistemleri gibi geleneksel biyokimyasal fenotip bazlı sistemlerin uygulanması *Kocuria* türlerine ait izolatların tanımlanmasında etkili olduğu bildirilmektedir (8,9).

Gıdalardan izole edilen bakterilerin antimikrobiyal maddelere karşı direnci uzun zamandır büyük bir endişe kaynağıdır (2). Özellikle son yıllarda gıda zincirinin çoklu ilaç direncine sahip bakteriler için önemli bir kaynak oluşturduğu ve antibiyotik direncinin aktarımı üzerindeki etkileri iyi bir şekilde bilinmektedir (2).

Buna karşılık, gıdalardan izole edilen *Kocuria* suşlarının antibiyotik direncine ilişkin yeterli düzeyde çalışma olmaması bu türlerin halk sağlığı açısından oluşturulduğu riskin göz ardı edilmesine neden olmaktadır. Çalışmamızda izole edilen 5 *K. varians* izolatının hepsinin (%100), test edilen antibiyotiklerin en az birine dirençli olduğu ve bu izolatlardan 4'ünün oksasilin, linezolid ve rifamisine karşı çoklu direnç gösterdiği belirlendi. Benzer şekilde, İtalya'da fermente sosislerden izole edilen *Kocuria* türüne ait izolatların (10) ve Brezilya'da pastörize sütlerden izole edilen *K. varians* izolatlarının (6) çoklu antibiyotik direnci gösterdikleri belirtilmiş ve *K. varians* izolatlarının çoğunlukla klindamisin, kloramfenikol, penisilin ve tetrasikline karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (6). Fransa'da pastörize sütlerden elde edilen *Kocuria* türlerine ait izolatların makrolid grubu antibiyotikler ağırlıklı olmak üzere, test edilen antibiyotiklere karşı direnç gösterdikleri, beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları belirtilmiştir (11). Bu çalışma bulgularının tam aksine, İspanya'da çiğ süttten yapılan el yapımı peynirlerden izole edilen *K. varians* izolatlarının beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç gösterdikleri ancak vankomisine karşı duyarlı oldukları gözlemlenmiştir (12). Çalışmalar arasındaki farklılıkların nedeni, örneklemenin yapıldığı yer, örneklem büyüklüğü ve çeşidi, örneklerin muhafaza koşulları, işleme şekilleri ve uygulanan analiz metotları ile ilgili olabileceği

gibi farklı bölgelerde kullanılan farklı antibiyotik türlerinin sık kullanımı ile ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte, sadece patojen bakterilerin değil, et ürünlerinde, süt ürünlerinde, hazır gıdalarda probiyotik olarak önerilen bakteri suşlarının da antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilecekleri bildirilmiştir (28,29,30). Antibiyotik dirençli bu bakterilerin, direnç genlerini diğer türlere aktarılmasında rezervuar olarak rol alabileceğinden dolayı, besin zinciri boyunca antibiyotik direncinin genişlemesi açısından göz ardı edilemeyecek ciddi bir endişe yaratabileceği belirtilmiştir (30, 31). Bu çalışmada çoklu antibiyotik dirençli tüm izolatların ÇAD indeksinin 0.43 olması, bakterilerin izole edildiği gıdaların kaynağının sık antibiyotik kullanımına maruz kalan hayvanlar olduğunu ve bu bakterilerin gıda güvenliği ve halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturabileceğini göstermektedir. Antibiyotiklerin sıklıkla kullanıldığı bir kaynaktan gelen mikroorganizmalarda ÇAD indeksinin 0.2'den büyük, antibiyotikler seyrek kullanıldığı ya da hiç kullanılmadığı kaynaklarda ise bu indeksin 0.2'ye eşit veya daha küçük olduğu bildirilmiştir (19).

Çoklu antibiyotik direncinin yanı sıra gıda endüstrisinde oluşan biyofilmler, gıdaların bozulmasına ve/veya patojen mikroorganizmaların rezervuarı haline gelerek ekonomik ve halk sağlığı açısından sorunlara sebebiyet vermektedir (32). Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekzopolisakaritler (EPS)'in genellikle biyofilmlerin yapısı ve stabilitesinde önemli bir role sahip olduklarına inanılmaktadır. Ayrıca, EPS üreten starter kültürler süt ve et ürünlerinin fermentasyonunda endüstriyel ölçekte kullanılmaktadır. Ancak starter kültürler tarafından üretilen EPS'nin, muhtemelen moleküler özelliklerindeki ve membranla etkileşimlerindeki farklılıklar nedeniyle, biyofilm oluşumu ile birebir ilişkili olmadığı belirtilmiştir (33, 34). Garcia-Fernandez ve ark. (33) test ettikleri laktik asit bakterisinin ST3534 suşunun, biyofilm oluşumunu destekleyen EPS üretirken, JFR+ suşunun ise bağlanma yeteneği ve biyofilm oluşumu azaltılmış EPS ürettiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, EPS üreten tüm starter kültürlerin biyofilm oluşturma yetenekleri açısından bir avantajı olmadığını bildirmişlerdir. *Kocuria* türlerinin, genellikle *Bacillus*, *Acinetobacter*, ve *Pseudomonas* gibi çeşitli bakterilerle beraber biyofilm oluşturulduğu bilinmektedir (2,35,36). Yapılan çalışmalarda *K. varians* ve *L. monocytogenes* tarafından paslanmaz metal yüzeylerde oluşturulan biyofilm yapısının incelenmesi sonucunda *L. monocytogenes* kolonilerinin *K. varians*'ın biyofilm yapısına tutundukları bildirilmiştir (37). Bu çalışmada, izole edilen 5 *K. varians* izolatlarının dördü orta, biri ise zayıf olmak üzere tamamının (%100) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlendi. Biyofilm üretme yeteneğine sahip bu izolatların çoğunun aynı zamanda çoklu ilaç direnci sergilemesi dikkat çekici idi. *Kocuria* türlerinin genellikle gıda ekipmanları ve yüzeylerden elde edildiği ve elde edilen izolatların orta ve güçlü düzeyde biyofilm oluşturdıkları bildirilmiştir (3). Buna

ek olarak gıda işleme ortamlarında oluşturulan biyofilmin et doğrama bölümünden izole edilen *Kocuria* türü bakterilerin diğer bakterilerle sinerjik etkisi ile oluşturulduğu ortaya konmuştur (32). Benzer şekilde, Weber ve ark. (23)'nın yaptıkları bir çalışmada, hayvansal gıda ve gıdalarla ilişkili ekipmanlarda (özellikle süt sağım makinalarındaki boru sistemleri) *Kocuria* cinsine ait türler ile başka bakteri cinsleri arasında etkileşimler olduğunu tanımlamıştır. Brezilya'da yürütülen bir çalışmada ise pastörize sütlerden elde edilen *K. varians* izolatlarının %31'inin biyofilm ürettiği bildirilmiştir (6). Genellikle gıda ekipmanları ve yüzeylerden elde edilmesine rağmen (38) gıdalardan da elde edilebilen *K. varians*'ın biyofilm oluşturma yeteneğinin, çoklu antibiyotik direnci ile gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği endişesini artırmaktadır.

Ayrıca bu çalışmada analiz edilen örneklerde tespit edilen diğer bakterilerden, *Corynebacterium* cinsi, çok sayıda insan ve hayvan patojenini içermesinin yanı sıra, toprak, bitki materyali, atık su ve süt ürünleri gibi çok çeşitli materyallerde tespit edilen patojenik olmayan türleri de içerir (22). *C. jeikeium*, özellikle risk grubunda yer alan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar açısından çoklu ilaca dirençli ve son derece öldürücü bir patojendir. *C. jeikeium* penisilinler, sefalosporinler ve aminoglikozidlerle yapılan antibiyotik tedavisine dirençliyken, önerilen birincil tedavi rejimi olan vankomisine duyarlı olmaya devam etmektedir (39). *C. matruchotii*, in vitro mineralizasyonu tetikleyebilen kalsifiye edici bir bakteridir ve ağız boşluğundaki tüm anatomik bölgeler arasında en çok diş yüzeyindeki diş plağından izole edilir (40). Bu özelliğinden dolayı *C. matruchotii* iyi diş sağlığı ile ilişkilendirilmiştir ve *Streptococcus* türlerine yapışma yeteneği nedeniyle bazı biyofilm yapılarının organizasyonunda önemli olduğu varsayılmaktadır (41). *S. oralis*, tüm ağız içi yüzeylerden izole edilebilen, ağız mikrobiyotasının sayısal olarak önemli bir üyesidir ve dişlerin birincil kolonizasyonunda yer alan öncü bir mikroorganizmadır. *S. oralis*, nötrojenik kanser hastalarında subakut bakteriyel endokardit ve septiseminin önemli etiyolojik ajanı olarak kabul edilmektedir (42). Dolayısıyla bu bakteri türlerinin biyofilm yetenekleri ve antibiyotik direnç profilleri nedeni ile çalışmamızda analiz edilen et ve süt ürünlerinde tespit edilmesi tüketici sağlığı açısından tehlike arz edebilir.

Sonuç olarak, *Kocuria* türleri gıdalarda istenilen tekstür ve lezzet özelliklerini sağlaması açısından starter kültür olarak ve biyoteknolojideki diğer kullanımları ile umut verici bir cins olarak tanımlanmaktadır. Ancak geliştirdiği antibiyotik direnci ve bu özelliklerin yatay gen aktarımı ile patojenik türlere aktarabilmesi, bunun yanında biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olması ve patojenlerin biyofilm oluşturmalarını desteklemesi nedeni ile bu bakterilerin endüstride kullanımıyla ve potansiyel gıda güvenliği riskleri ile ilgili endişeler mevcuttur. Bunun önüne geçilmesi için

istenilen fonksiyonel özelliklere sahip ve olumsuz özellikleri olmayan suşların genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik olarak araştırılması gerekmektedir. Buna ilaveten, bu türün izolasyonunda ve tanımlanmasında yapısal ve biyokimyasal benzerlikleri nedeniyle karıştırılmaları, gıda endüstrisinde ve kliniklerde gözden kaçabilir. Bu nedenle, *K. varians*'ın endüstriyel kullanımı ve halk sağlığı açısından oluşturabileceği potansiyel risklerin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Abebe E, Gugsu G, Ahmed M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of tropical medicine* 2020; 29: 4674235
2. Ramos GLDPA, Vigoder HC, dos Santos Nascimento J. *Kocuria* spp. in foods: biotechnological uses and risks for food safety. *Applied Food Biotechnology* 2021; 8(2): 79-88.
3. Ziogou A, Giannakodimos I, Giannakodimos A, Baliou S, Ioannou P. *Kocuria* Species Infections in Humans—A Narrative Review. *Microorganisms* 2023; 11(9): 2362
4. Meng X, Chen F, Xiong M, Hao H, Wang KJ. A new pathogenic isolate of *Kocuria kristinae* identified for the first time in the marine fish *Larimichthys crocea*. *Frontiers in Microbiology* 2023;14: 1129568.
5. Tsai CY, Su SH, Cheng YH, Chou YL, Tsai TH, et al. *Kocuria varians* infection associated with brain abscess: a case report. *BMC infectious diseases* 2010; 10: 1-4.
6. Machado MAA, Ribeiro WA, Toledo VS, Ramos GLPA, Vigoder HC, et al. Antibiotic resistance and biofilm production in catalase-positive gram-positive cocci isolated from brazilian pasteurized milk. *Journal of food quality and hazards control* 2020.
7. Youn HY, Seo KH. Isolation and characterization of halophilic *Kocuria salsicia* strains from cheese brine. *Food Science of Animal Resources* 2022; 42(2): 252.
8. Kandi V, Palange P, Vaish R, Bhatti AB, Kale V, et al. Emerging bacterial infection: identification and clinical significance of *Kocuria* species. *Cureus* 2016; 8(8).
9. Živković Zarić RS, Pejčić AV, Janković SM, Kostić MJ, Milosavljević MN, et al. Antimicrobial treatment of *Kocuria kristinae* invasive infections: Systematic re: a case report. *BMC infectious diseases* 2019; 10: 1-4.
10. Gardini F, Tofalo R, Suzzi G. A survey of antibiotic resistance in *Micrococcaceae* isolated from Italian dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 2003; 66(6): 937-945.
11. Perrin-Guyomard A, Soumet C, Leclercq R, Doucet-Populaire F, Sanders P. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from pasteurized milk and characterization of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance genes. *Journal of food protection* 2005; 68(2): 347-352.
12. Rodriguez-Alonso P, Fernandez-Otero C, Centeno JA, Garabal JJ. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae*/*Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. *Journal of food science* 2009; 7(6): M284-M293.
13. Gungor C, Barel M, Dishan A, Disli HB, Koskeroglu K, et al. From cattle to pastirma: Contamination source of methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) along the pastirma production chain. *LWT* 2021; 151: 112130.
14. Heybet Z, Ozkaya Y, Gundog DA, Gungor C, Onmaz NE. Animal-originated foods as Potential sources of multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* Pathotypes in Kayseri, Türkiye. *Food Control* 2024; 164: 110586.

15. Atabey C, Kahraman T, Koluman A. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Salmonella* Spp., *E. Coli* O157, and *L. Monocytogenes* in Meat and Dairy Products. *Animal Health Production and Hygiene* 2021; 10(1): 17-22.
16. Al S, Barel M, Dışhan A, Karadal F, Hızlısoy H, et al. Tüketime Hazır Gıdalarda *Listeria monocytogenes* Varlığının Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2020; 17(2): 149-155.
17. Aydın F, Yağız A, Abay S, Müştak HK., Diker KS. Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* in beef meat samples and characterization of the recovered isolates. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 2020; 15: 15-25.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2023; 28th edn.
19. Mir R, Salari S, Najimi M, Rashki A. Determination of frequency, multiple antibiotic resistance index and resistotype of *Salmonella* spp. in chicken meat collected from southeast of Iran. *Veterinary medicine and science* 2022; 8(1): 229-236.
20. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods* 2000; 40(2): 175-179.
21. Organji SR, Abulreesh HH, Elbanna K, Osman GE, Almalki MH. Diversity and characterization of *Staphylococcus* spp. in food and dairy products: a foodstuff safety assessment. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2018; 7(6): 586.
22. Khamis A, Raoult D, La Scola B. Comparison between *rpoB* and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(4): 1934-1936.
23. Weber M, Liedtke J, Plattes S, Lipski A. Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and-independent methods. *PLoS One* 2019; 14(9): e0222238.
24. Kołożyn-Krajewska D, Dolatowski ZJ. Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry* 2012; 47(12): 1761-1772.
25. Mladenović KG, Grujović MŽ, Kiš M, Furmeg S, Tkalec VJ, et al. Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat. *Applied microbiology and biotechnology* 2021; 1-13.
26. Kızanlık PK. Microbiological quality evaluation of various types of cheese. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2018; 15(2): 86-93.
27. Çetin B, Atik A, Karasu S. Kırklareli'nde üretilen yoğurt ve ayranların fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi. *Akademik Gıda* 2014; 12(2): 57-60.
28. Lukasova J, Sustackova A. Enterococci and Antibiotic Resistance. *Acta Vet. Brno* 2003; 72: 315-323.
29. Kastner S, Perreten V, Bleuler H, Hugenschmidt G, Lacroix C, et al. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and applied microbiology* 2006; 29(2): 145-155.
30. Zarzecka U, Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W. Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms. *Lwt* 2020; 127: 109424.
31. Ammor MS, Belén Flórez AB, Van Hoek AHAM, Los Reyes-Gavilán CGA, Aarts HJM, et al. Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology and Biotechnology* 2008; 14: 6-15.
32. Röder HL, Raghupathi PK, Herschend J, Brejnrod A, Knöchel S, et al. Interspecies interactions result in enhanced biofilm formation by co-cultures of bacteria isolated from a food processing environment. *Food Microbiology* 2015; 51: 18-24.
33. Garcia-Fernandez N, Hassan A, Anand S. Effect of exopolysaccharides produced by dairy starter cultures on biofilms formed on reverse osmosis membranes. *JDS communications* 2021; 2(3): 104-109.
34. Lu L, Zhao Y, Li M, Wang X, Zhu J, et al. Contemporary strategies and approaches for characterizing composition and enhancing biofilm penetration targeting bacterial extracellular polymeric substances. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2023.
35. Wagner EM, Fischel K, Rammer N, Beer C, Palmethofer AL, et al. Bacteria of eleven different species isolated from biofilms in a meat processing environment have diverse biofilm forming abilities. *International Journal of Food Microbiology* 2021; 349: 109232.
36. Sadiq FA, De Reu K, Yang N, Burmölle M, Heyndrickx M. Interspecies interactions in dairy biofilms drive community structure and response against cleaning and disinfection. *Biofilm* 2024; 7: 100195.
37. Midelet G, Kobilinsky A, Carpentier B. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Applied and Environmental Microbiology* 2006; 72(4): 2313-2321. doi: 10.1128/AEM.72.4.2313-2321.2006
38. Lim ES, Lee JE, Kim JS, Koo OK. Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. *LWT* 2017; 77: 376-382.
39. Pardo SMM, Patel RH, Ramsakal A, Greene J. Disseminated *Corynebacterium jeikeium* infection in cancer patients. *Cureus* 2020; 12(6).
40. Li Q, Zhou F, Su Z, Li Y, Li J. *Corynebacterium matruchotii*: a confirmed calcifying bacterium with a potentially important role in the supragingival plaque. *Frontiers in Microbiology* 2022; 13: 940643.
41. Almeida E, Puri S, Labossiere A, Elangovan S, Kim J, et al. Bacterial multispecies interaction mechanisms dictate biogeographic arrangement between the oral commensals *Corynebacterium matruchotii* and *Streptococcus mitis*. *Msystems* 2023; 8(5): e00115-23.
42. Do T, Jolley KA, Maiden MC, Gilbert SC, Clark D, et al. Population structure of *Streptococcus oralis* *Microbiology* 2009; 155(8): 2593-2602.