

## SUCUKTAN İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS* VE *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* SUŞLARINDA ENTEROTOKSİN GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI\*

Hasan Çetin, Yasin Tuncer\*\*

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta

Geliş tarihi / Received: 05.11.2015

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 04.01.2016

Kabul tarihi / Accepted: 05.01.2016

### Özet

Bu çalışmanın amacı, starter kültür kullanılmadan üretilen geleneksel fermente Türk sucuklarından izole edilen 51 koagülaz-negatif *Staphylococcus* (KNS) ve 10 *Macrocooccus caseolyticus* suşlarında enterotoksin yapısal genlerinin varlığının araştırılmasıdır. Bu amaçla, toplam 61 sucuk izolatında 18 enterotoksin yapısal geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırıldı. PZR denemeleri sonucu izolatların hiçbirinin enterotoksin yapısal geni içermediği tespit edildi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar sucuktan izole edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının enterotoksin üretimi bakımından güvenilir olduklarını gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Enterotoksin genleri, koagülaz-negatif *Staphylococcus*, *Macrocooccus caseolyticus*, sucuk, multiplaks-PZR

## INVESTIGATION OF ENTEROTOXIN GENES IN COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* AND *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* STRAINS FROM TURKISH DRY FERMENTED SAUSAGE (SUCUK)

### Abstract

The aim of this study was to investigate the presence of enterotoxin structural genes in 51 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) and 10 *Macrocooccus caseolyticus* strains isolated from traditional fermented Turkish sausages (sucuk) produced without using starter culture. For this purpose, the presence of 18 enterotoxin structural genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sbe*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* and *tst1*) were researched by polymerase chain reaction (PCR) in a total of 61 isolates from sucuk. The PCR results indicated that none of the isolates has contained enterotoxin structural gene. The results of this study showed that CNS and *M. caseolyticus* strains isolated from sucuk were safe in terms of enterotoxin production.

**Keywords:** Enterotoxin genes, coagulase-negative *Staphylococcus*, *Macrocooccus caseolyticus*, Turkish dry fermented sausage (sucuk), multiplex-PCR

\* Bu çalışma 15<sup>th</sup> International Nutrition & Diagnostics Conference Prag/Çek Cumhuriyeti'nde poster olarak sunulmuş ve kongre kitabında özet olarak basılmıştır. *This study was presented as a poster at the 15<sup>th</sup> International Nutrition & Diagnostics Conference in Prague, Czech Republic, and it was published as an abstract in the book of proceedings.*

\*\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yasintuncer@sdu.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 1713,

☎ (+90) 246 237 0437

## GİRİŞ

Sucuk sığır, koyun ve/veya manda eti karışımına sığır yağı ve/veya koyun kuyruk yağı, tuz, şeker, nitrit/nitrat ve sarımsak, karabiber, kırmızıbiber, kimyon ve yenibahar gibi çeşitli baharatlar ilave edilerek üretilen bir et ürünüdür (1, 2). Türkiye’de üretilen et ürünleri arasında popüler bir ürün olan sucuk sadece Türkiye’de değil aynı zamanda birçok Orta Asya, Orta Doğu, Güneydoğu Avrupa ve Kuzey Avrupa ülkelerinde de oldukça popülerdir (2). Geleneksel sucuk üretiminde, hazırlanan sucuk hamuru özel kılıflara doldurulduktan sonra sucuk kangalları tipik duyuşsal karakteristiğinin gelişmesi için fermente edilir ve olgunlaştırılır (3).

Yapılan çalışmalar fermente et ürünlerinin kendilerine has karakteristik tat, aroma ve tekstürünün oluşmasında rol oynayan temel bakteri gruplarının laktik asit bakterileri (LAB) ve KNS’ların olduğunu göstermiştir (4). Gram-pozitif, katalaz-pozitif, koagülaz-negatif koklar geleneksel yöntemlerle üretilen doğal fermente et ürünlerinden sıklıkla izole edilmektedirler. Geçmiş yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar ile fermente sosislerden KNS (5-16) ve *M. caseolyticus* (16-18) suşlarının izole edildiği bildirilmiştir. Bu bakteriler sucuk fermantasyonu sırasında nitratı nitrite indirgeyerek renk oluşumunda ve stabilizasyonunda görev almalarının yanı sıra, lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucu peptit, amino asit, aldehit, amin ve serbest yağ asitleri gibi düşük molekül ağırlıklı bileşenleri oluşturarak ürüne has tekstür ve karakteristik tat ve aromanın oluşmasında da etkin rol oynamaktadırlar. Bunların yanı sıra, et fermantasyonlarında aktif rol oynayan diğer bir bakteri grubu olan LAB’nin ürettiği bir metabolit ve okside edici ajan olan hidrojen peroksiti, ürettikleri katalaz enzimi ile parçalayarak ürünün aromasının, renginin ve raf ömrünün korunmasını da sağlamaktadırlar (19, 20).

KNS’ların fermente et ürünlerinde oynadıkları bu önemli rolün yanı sıra, çeşitli kaynaklardan izole edilen bazı üyelerinin enterotoksin üreterek tüketici sağlığı açısından risk oluşturdukları da yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (21-23). Günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalar, *Staphylococcus aureus*’un emetik aktivite gösteren stafilokokal enterotoksinler (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER, SES ve SET) ve primat modellerde emetik aktivite göstermeyen (SEIL ve SEIQ) veya henüz primat modellerde test edilmeyen

(SEIJ, SEIK, SELM, SELN, SEIO, SEIP, SEIU, SEIU2 ve SEIV) stafilokokal benzeri proteinler gibi çeşitli toksinler ürettiğini göstermiştir. Ayrıca, *S. aureus*’un başlangıçta SEF olarak isimlendirilen emetik aktivite göstermeyen toksik şok stafilokokal toksini (TSST-1) de ürettiği tespit edilmiştir (24).

Bu çalışmada, Afyonkarahisar ilinden temin edilen starter kültür kullanılmadan üretilen doğal fermente sucuk örneklerinden izole edilen ve 16S rDNA dizi analizi ile moleküler düzeyde tanımlanan 51 KNS ve 10 *M. caseolyticus* suşlarında 18 enterotoksin yapısal geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) varlığının PZR ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, sucuktan izole edilen *M. caseolyticus* suşlarında enterotoksin yapısal genlerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Mikroorganizmalar

Çalışma kapsamında kullanılan 51 KNS ve 10 *M. caseolyticus* suşu Geniş (25) tarafından Afyonkarahisar ilinden temin edilen starter kültür kullanılmadan üretilen fermente sucuk örneklerinden izole edilmiş ve 16S rDNA dizi analizi ile tür düzeyinde tanısı yapılmıştır. Genomik DNA’da spesifik bölgeler pA (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'- CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' genel 16S rDNA bakteri primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi REFGEN Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Limited Şirketine (ODTÜ, Teknokent, Ankara) yaptırılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri türleri ve sayıları Çizelge 1’de verilmiştir. KNS ve *M. caseolyticus* suşları Triptone Soy Broth (TSB, Lab M, Ltd., Bury, Lancashire, İngiltere) besiyeri ortamında 37 °C’de 18 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Stok kültürler TSB besiyeri ortamına % 20 (w/w) oranında steril gliserol (Riedel-de Haën, Seelze, Almanya) ilave edilerek -32 °C’de muhafaza edilmiştir. Çalışma materyalleri ise, gliserol ilave edilmemiş TSB ortamında +4 °C’de ve haftalık transferler yapılarak saklanmıştır.

### Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için KNS ve *M. caseolyticus* suşları TSB besiyerinde 37 °C’de 18 saat süreyle geliştirilmiştir. Suşlardan genomik DNA izolasyonu Cancilla ve ark. (26) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Genomik DNA örneğinin elektroforezi % 0.7 agaroz oranı

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan bakteri türleri  
Table 1. Bacterial species used in this study

Bakteri türleri Bacterial species	Adet Count
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	21
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	10
<i>Staphylococcus xylosum</i>	4
<i>Staphylococcus sciuri</i>	3
<i>Staphylococcus hominis</i>	2
<i>Staphylococcus warneri</i>	2
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	1

ile hazırlanan jelde 85 voltta 1.5-2.0 saat süreyle yapılmıştır. Elektroforez sonrası jel 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltide 45 dakika boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda jel fotoğrafı Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Co., Japonya) kullanılarak çekilmiştir.

#### **KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında enterotoksin genlerinin PZR ile araştırılması**

KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında enterotoksin genlerinin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) varlığı Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo #F-548L, Litvanya) kullanılarak multipleks-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Multipleks-PZR işlemi Techne TC3000 (Cambridge, İngiltere) termal döngü cihazında toplam 20 µL PZR karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enterotoksin genlerinin varlığının tespitinde kullanılan spesifik primerler ve ürün büyüklükleri Çizelge 2'de verilmiştir. Multipleks-PZR denemelerinde 4 takım primer (Takım 1: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*; Takım 2: *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selp*; Takım 3: *selk*, *selm*, *selo*, *tst-1*; Takım 4: *sell*, *seln*, *selq*, *selr*) karışımı kullanılmıştır. Primer takımları her bir primerden 2 µM konsantrasyonda içerecek şekilde hazırlanmıştır. Denemelerde; 1 döngü 94 °C'de 120 saniye başlangıç denatürasyonu, 35 döngü 95 °C'de 30 saniye / 57 °C'de 90 saniye / 72 °C'de 90 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan PZR protokolü uygulanmıştır (27). Denemelerde *S. aureus* ATCC25923 suşu (*seg*<sup>+</sup> ve *sei*<sup>+</sup>) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Multipleks-PZR denemeleri sonucu zayıf PZR bandı verdiği tespit edilen örnekler kontrol amacıyla aynı primerler kullanılarak tekli PZR uygulanmıştır. Enterotoksin genlerinin tekli PZR ile çoğaltılmasında PCR Master Mix (Thermo

#K0172, Litvanya) kullanılmıştır. PZR denemelerinde; 1 döngü 94 °C'de 120 saniye başlangıç denatürasyonu, 30 döngü 94 °C'de 30 saniye / 55 °C'de 30 saniye / 72 °C'de 60 saniye çoğaltma ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır (27).

Çoğaltılan enterotoksin genlerinin PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi Thermo OWL EASYCAST B2 cihazında % 2 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Multipleks-PZR ürünlerine 2'şer µL yükleme boyası (Orange DNA Loading Dye, Thermo #R0631, Litvanya) ilave edilmiştir. Daha sonra, hazırlanan örneklerden 15'er µL jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 85 voltta 1.5-2.0 saat süreyle yapılmıştır. Jeller 0.2 µg/mL konsantrasyonda etidyum bromit içeren boyama çözeltisinde 45 dakika boyanmıştır. Fragment büyüklükleri O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA marker (Fermentas #SM1153, Litvanya) kullanılarak hesaplanmıştır. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Co., Japonya) kullanılmıştır.

#### **ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA**

Yapılan bu çalışmada kullanılan 51 KNS ve 10 *M. caseolyticus* suşlarından izole edilen genomik DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir. Bazı KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.

Çalışma kapsamında, starter kültür kullanılmadan üretilen doğal fermente sucuk örneklerinden izole edilen 51 KNS ve 10 *M. caseolyticus* suşlarında 18 enterotoksin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) yapısal geninin varlığı 4 takım primer karışımı kullanılarak multipleks-PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Multipleks-PZR denemeleri sonucu zayıf PZR bandı verdiği tespit edilen örnekler kontrol amacıyla aynı primerler kullanılarak tekli PZR uygulanmıştır. Multipleks-PZR (Şekil 2) ve tekli PZR denemeleri sonucu KNS ve *M. caseolyticus* suşlarından hiçbirinde enterotoksin yapısal geninin varlığı tespit edilmemiştir.

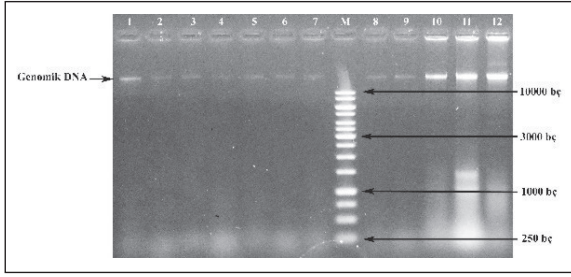
Enterotoksijenik stafilokoklara en fazla kırmızı et, kanatlı eti, balıketi ve ürünleri ile süt ve ürünleri gibi proteince zengin hayvansal kaynaklı gıdalarda rastlanılmaktadır (28). Bu nedenden dolayı proteince zengin bir gıda olan sucuktan izole edilen KNS'lerin enterotoksin üretim özelliklerinin

Çizelge 2. Enterotoksin genlerinin tespitinde kullanılan PZR primerleri, ürün büyüklükleri ve primer takımları  
 Table 2. PCR primers, product sizes and primer sets for detection of enterotoxin genes

Gen Gene	Primer Primer	Primer sekansları (5' - 3') Primer sequences (5' - 3')	Ürün büyüklüğü (bp) Product size (bp)	PZR takımı PCR set
sea	SEA-3	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG	127	1
	SEA-4	TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC		
seb	SEB-1	TCGCATCAAACCTGACAAAACG	477	1
	SEB-4	GCAGGTA CTCTATAAAGTGCCTGC		
sec	SEC-3	CTCAAGAACTAGACATAAAAGCTAGG	271	1
	SEC-4	TCAAAAATCGGATTAACATTATCC		
sed	SED-3	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG	319	1
	SED-4	TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC		
see	SEE-3	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	178	1
	SEE-2	TAACCTACCGTGGACCCTTC		
seg	SEG-1	AAGTAGACATTTTTGGCGTTCC	287	2
	SEG-2	AGAACCATCAAACCTCGTATAGC		
seh	SEH-1	GTCTATATGGAGGTACAACACT	213	2
	SEH-2	GACCTTTACTTATTTGCTGTC		
sei	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454	2
	SEI-2	ATCCATATTCTTGCCTTTACCAG		
selj	SEJ-1	ATAGCATCAGAACTGTTGTTCCG	152	2
	SEJ-2	CTTTCTGAATTTTACCACCAAAGG		
selp	SEP-3	TGATTTATTAGTAGACCTTGG	396	2
	SEP-4	ATAACCAACCGAATCACCAG		
selk	SEK-1	TAGGTGTCTCTAATAATGCCA	293	3
	SEK-2	TAGATATTGTTAGTAGCTG		
selm	SEM-1	GGATAATTCGACAGTAACAG	379	3
	SEM-2	TCCTGCATTAATCCAGAAC		
selo	SEO-1	TGTGTAAGAAGTCAAGTGATG	214	3
	SEO-2	TCTTTAGAAATCGCTGATGA		
tst1	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	447	3
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT		
sell	SEL-1	TAACGGCGATGTAGGTCCAGG	383	4
	SEL-2	CATCTATTTCTTGTGCGGTAAC		
seln	SEN-1	TATGTTAATGCTGAAGTAGAC	282	4
	SEN-2	ATTTCCAAAATACAGTCCATA		
selq	SEQ-1	AATCTCTGGGTCAATGGTAAGC	122	4
	SEQ-2	TTGTATTGTTTTGTAGGTATTTTCG		
selr	SER-1	GGATAAAGCGGTAATAGCAG	166	4
	SER-4	GTATTCCAAACACATCTAAC		

araştırılması tüketici sağlığı açısından mevcut riskin ortaya konulması adına önem arz etmektedir. Çalışma kapsamında 18 enterotoksin geninin varlığının araştırıldığı KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının hiçbirinde enterotoksin yapısal geninin tespit edilmemiş olması bir avantajdır. Son yıllarda hem PZR hem de PZR ve/veya DNA mikroarray teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmalarda da et ürünleri, süt ve peynirlerden izole edilen KNS'larda stafilokokal enterotoksin genlerinin nadiren bulunduğu gösterilmiştir (29-33). Farklı araştırmacılar tarafından gıda kaynaklı KNS'lerin enterotoksin üretim özelliklerinin araştırıldığı çalışmalar bu

çalışmadan elde edilen bulguları desteklemektedir. Rosec ve ark. (29), farklı gıdalardan izole ettikleri 51 KNS suşunun hiçbirinin enterotoksin SEA, SEB, SEC, SED ve SEE üretmediğini bildirmişlerdir. Blaiotta ve ark. (30) et ve süt ürünlerinden izole ettikleri KNS (84 adet) ve *M. caseolyticus* (2 adet) suşlarının hiçbirinin *seA*, *seB*, *seC*, *seD*, *seE*, *seG*, *sbe*, *seI*, *seJ*, *seM*, *seN*, *seO* ve *tsst1* genlerini içermediğini rapor etmişlerdir. Even ve ark. (31), peynir ve kuru fermente sosislerden izole ettikleri 129 KNS suşundan sadece 1 adedinin (*S. saprophyticus*) *sec* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda



Şekil 1. Bazı KNS ve *M. caseolyticus* Suşlarının Genomik DNA Örnekleri

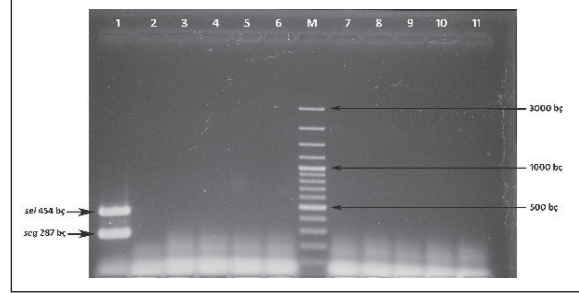
1: *S. saprophyticus* BYS1; 2: *S. saprophyticus* BYS2; 3: *S. saprophyticus* BYS4; 4: *M. caseolyticus* BYS5; 5: *S. saprophyticus* BYS7; 6: *S. saprophyticus* BYS8; 7: *S. cohnii* BYS9; M: O'GeneRuler™ 1 kb DNA marker (Fermentas, #SM1163, Litvanya); 8: *S. sciuri* BYS10; 9: *S. saprophyticus* BYS11; 10: *S. vitulinus* BYS12; 11: *S. saprophyticus* BYS13; 12: *S. xylosus* BYS14

Figure 1. Genomic DNA Samples of Some CNS and *M. caseolyticus* Strains

1: *S. saprophyticus* BYS1; 2: *S. saprophyticus* BYS2; 3: *S. saprophyticus* BYS4; 4: *M. caseolyticus* BYS5; 5: *S. saprophyticus* BYS7; 6: *S. saprophyticus* BYS8; 7: *S. cohnii* BYS9; M: O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas, #SM1163, Lithuania); 8: *S. sciuri* BYS10; 9: *S. saprophyticus* BYS11; 10: *S. vitulinus* BYS12; 11: *S. saprophyticus* BYS13; 12: *S. xylosus* BYS14

gıda kaynaklı KNS suşlarının stafilkokal enterotoksin üretimi açısından düşük risk içerdiğini bildirmişlerdir. Seitter ve ark. (32) tarafından yapılan çalışmada, *S. equorum*, *S. xylosus* ve *S. carnosus* türlerini içeren 32 KNS suşunun hiçbirinin stafilkokal enterotoksin geni içermediği tespit edilmiştir. Benzer olarak, iki farklı geleneksel Hırvat fermente sosisinden izole edilen 39 KNS suşunda 13 enterotoksin geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *seg*, *sei*, *tst1*, *sed*, *see*, *seh*, *sej*, *sem*, *sen* ve *seo*) varlığının PZR ile araştırıldığı bir çalışmada suşların hiçbirinin enterotoksin geni içermediği tespit edilmiştir (33).

Bu çalışmada elde edilen bulguların aksine, farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli gıdalardan ve gıda üretiminde çalışan işçilerin ellerinden izole edilen bazı KNS türlerinin stafilkokal enterotoksin genlerine sahip olduğu gösterilmiştir (34-42). Vernozy-Rozand ve ark. (34), süt ürünlerinden izole ettikleri *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus* ve *S. gallinarum* türlerinin Rodriguez ve ark. (35) ise, etten izole ettikleri *S. xylosus* ve *S. cohnii* türlerinin enterotoksin geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Udo ve ark. (36), gıda üretiminde çalışan işçilerin ellerinden stafilkokal enterotoksin ve/veya TSST1 geni içeren *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. warneri* ve



Şekil 2. KNS ve *M. caseolyticus* Suşlarında Takım 2 (*seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selp*) Primer Karışımı Kullanılarak Yapılan Multipleks-PZR Denemesi

1: pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC25923 *seg*<sup>+</sup> ve *sel*<sup>+</sup>); 2: negatif kontrol (su); 3: *S. saprophyticus* BYS1; 4: *S. saprophyticus* BYS2; 5: *S. saprophyticus* BYS4; 6: *M. caseolyticus* BYS5; M: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA marker (Fermentas); 7: *S. saprophyticus* BYS7; 8: *S. saprophyticus* BYS8; 9: *S. cohnii* BYS9; 10: *S. sciuri* BYS10; 11: *S. saprophyticus* BYS11

Figure 2. Multiplex-PCR Assay in CNS and *M. caseolyticus* Strains Used Set 2 (*seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *selp*) Primer Mix

1: positive control (*S. aureus* ATCC25923 *seg*<sup>+</sup> and *sel*<sup>+</sup>); 2: negative control (water); 3: *S. saprophyticus* BYS1; 4: *S. saprophyticus* BYS2; 5: *S. saprophyticus* BYS4; 6: *M. caseolyticus* BYS5; M: O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas); 7: *S. saprophyticus* BYS7; 8: *S. saprophyticus* BYS8; 9: *S. cohnii* BYS9; 10: *S. sciuri* BYS10; 11: *S. saprophyticus* BYS11

*S. schleiferi* gibi KNS suşları izole ettiklerini bildirmişlerdir. Cunha ve ark. (37), Brezilya'nın Botucatu şehrinde bulunan market ve şarküterilerden topladıkları farklı gıda örneklerinden izole edip biyokimyasal yöntemlerle tür düzeyinde tanısını yaptıkları 20 KNS suşunda enterotoksin genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında, izole ettikleri suşlardan 4 adedinin enterotoksin geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 3 suşun *sea* geni, 1 suşun ise *sec* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Ters pasif lateks aglutinasyon yöntemi ile enterotoksin üretimi araştırılmış ancak enterotoksin geni içerdiği tespit edilen 4 suştan hiçbirinin enterotoksin üretmediği belirlenmiştir. Rall ve ark. (38) tarafından yapılan bir çalışmada, Brezilya'da üretilen Minas peynirinden izole edilen 65 KNS suşunun % 26.2'sinin enterotoksin geni içerdiğini tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada, % 18.5 ile en sık rastlanan genin *sea* geni olduğu tespit edilmiştir. *sea* genini sırasıyla % 4.6 bulunma sıklığı ile *sec* ve % 3.1 ile *seb* genleri izlenmektedir. Ancak, enterotoksin geni içerdiği tespit edilen suşların hiçbirinin *in vitro* koşullarda enterotoksin üretmediği belirlenmiştir. Guimarães ve ark. (39), mastitis test sonuçları pozitif olan sütlerden izole ettikleri 128 KNS suşundan 85 adedinin (% 66) enterotoksin geni içerdiğini

rapor etmişlerdir. İzolatlarda *sea*, *seb* ve *sec* genlerinin daha yüksek sıklıkla bulunduğu saptanmıştır. Piechota ve ark. (40), mastitisli ve mastitissiz inek sütlerinden ve ahır ortamından izole ettikleri 185 *Staphylococcus* izolatının 22 adedinin (% 13) KNS olduğunu ve bu izolatların % 68'inde *sec*, % 18'inde *seb* ve *sed*, % 13.6'sında *see* ve % 4.5'inde *sea* geni bulunduğunu bildirmişlerdir. Aye ve ark. (41), 385 gıda örneğinden 62 (% 16) *Staphylococcus* suşu izole etmişlerdir. İzole edilen bu 62 suşun 49'u (% 79) koagülaz-negatif olarak tanımlanmış ve sadece çilekten izole edilen *S. lugdunensis* suşuna ait pozitif *sec* geni tespit edilmiştir. Bertelloni ve ark. (42), Tuscan, İtalya'da bulunan 3 çiftliğin süt toplama tanklarından tedarik ettikleri 120 süt örneğinden izole ettikleri 74 KNS izolatında *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* ve *tst-1* genlerinin varlığını araştırdıkları çalışmalarında, izolatların 40 adedinin (% 54.1) en az bir enterotoksin geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 25 izolatın sadece bir enterotoksin geni, 15 izolatın ise 2 veya daha fazla sayıda enterotoksin geni içerdiğini rapor etmişlerdir. İzolatların hiçbirinde *seb* ve *sed* genleri tespit edilmemiştir. Enterotoksin genleri arasında en sık rastlanan genin *sea* geni olduğu, bunu *sec-1* geninin izlediği belirtilmiştir. 74 izolatın 31 adedinin *sea* geni, 19 adedinin ise *sec-1* geni içerdiğini saptamışlardır.

## SONUÇ

Bu çalışmada, starter kültür kullanılmadan üretilen fermente sucuk örneklerinden izole edilen 51 KNS ve 10 *M. caseolyticus* suşlarında 18 enterotoksin yapısal geninin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seb*, *sei*, *selj*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp*, *selq*, *selr* ve *tst1*) varlığı PZR ile araştırılmış ve suşlardan hiçbirinin enterotoksin geni içermediği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, sucuktan izole edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının enterotoksin üretimi bakımından güvenilir olduklarını göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hasan Çetin'in yüksek lisans tezinden alınmış ve 4148-YL1-14 nolu proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Kaban G. 2010. Volatile compounds of traditional Turkish dry fermented sausage (sucuk). *Int J Food Prop*, 13: 525-534.
2. Ercoşkun H, Özkal SG. 2011. Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation. *Food Control*, 22: 165-172.
3. Kaban G. 2013. Sucuk and pastırma: microbiological changes and formation of volatile compounds. *Meat Sci*, 95: 912-918.
4. Talon R, Leroy S. 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Sci*, 89: 303-309.
5. Mauriello G, Casaburi A, Blainotta G, Villani F. 2004. Isolation and technological properties of coagulase-negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci*, 67: 149-158.
6. Kaban G, Kaya M. 2008. Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk). *J Food Sci*, 73: 385-388.
7. Kozacinski L, Drosinos E, Caklovica F, Cocolin L, Gasparik-Reichhardt J, Veskovc S. 2008. Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technol Biotechnol*, 46: 93-106.
8. Resch M, Nagel V, Hertel C. 2008. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *Int J Food Microbiol*, 127: 99-104.
9. Bonomo MG, Ricciardi A, Zotta T, Sico MA, Salzano G. 2009. Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci*, 83: 15-23.
10. Coton E, Desmots M-H, Leroy S, Coton M, Jamet E, Christieans S, Donnio P-Y, Lebert I, Talon R. 2010. Biodiversity of coagulase-negative staphylococci in French cheeses, dry fermented sausages, processing environments and clinical samples. *Int J Food Microbiol*, 137: 221-229.
11. Marty E, Bodenmann C, Buchs J, Hadorn R, Eugster-Meier E, Lacroix C, Meile L. 2012a. Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* from spontaneously fermented meat products and safety assesment for new starters. *Int J Food Microbiol*, 159: 74-83.
12. Marty E, Buchs J, Eugster-Meier E, Lacroix C, Meile L. 2012b. Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiol*, 29: 157-166.

13. Cachaldora A, Fonseca S, Franco I, Carballo J. 2013. Technological and safety characterization of Staphylococcaceae isolated from Spanish traditional dry-cured sausages. *Food Microbiol*, 33: 61-68.
14. Landeta G, Curiel JA, Carrascosa AV, Munoz R, De Las Rivas B. 2013. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Sci*, 93: 387-396.
15. Zdolec N, Dobranic V, Zdolec G, Duricic D. 2013. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria from industrially produced dairy products. *Mljekarstvo*, 63: 30-35.
16. Kesmen Z, Yarimcam B, Aslan H, Yetim H. 2014. Application of different molecular techniques for characterization of catalase-positive cocci isolated from sucuk. *J Food Sci*, 79: 222-228.
17. Lacumin L, Manzano M, Comi G. 2012. Catalase-positive cocci in fermented sausage: variability due to different pork breeds, breeding systems and sausage production technology. *Food Microbiol*, 29: 178-186.
18. Busconi M, Zacconi C, Scolari G. 2014. Bacterial ecology of PDO Coppa and Pancetta Piacentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product. *Int J Food Microbiol*, 172: 13-20.
19. Hammes WP, Knauf HJ. 1994. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci*, 36: 155-168.
20. Rantsiou K, Cocolin L. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages determined by molecular methods: a review. *Int J Food Microbiol*, 39: 123-128.
21. Carmo LSD, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, Souza JMD, Sena MJD, Santos DAD, Shupp JW, Pereira SRK, Jett M. 2004. A case study of massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog Dis*, 1: 241-246.
22. Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Santos DA, Cerqueira MMOP, Cantini A, Nicoli JR, Jett M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais Brazil. *Int J Infect Dis*, 12: 410-415.
23. Zell C, Resch M, Rosenstein R, Albrecht T, Hertel C, Götz F. 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int J Food Microbiol*, 127: 246-251.
24. Argudin MA, Mendoza MC, Rodicio MR. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2: 1751-1773.
25. Geniş B. 2015. Fermente sucuktan izole edilen koagülaz-negatif *Staphylococcus* ve *Macroccoccus caseolyticus* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının ve dekarboksilasyon aktivitelerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 74 s.
26. Cancilla MR, Powell IB, Hillier AJ, Davidson BE. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with <sup>32</sup>P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58: 1772-1775.
27. Omoe K, Hu DL, Takahashi-Omoe H, Nakane A, Shinagawa K. 2005. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 246: 191-198.
28. Erol İ, İşeri Ö. 2004. Stafilokokal enterotoksinler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51: 239-245.
29. Rosec JP, Gigaud O, Dalet C, Richard N. 1997. Enterotoxin production by staphylococci from foods in France. *Int J Food Microbiol*, 35: 213-221.
30. Blaiotta G, Pennacchia C, Villani F, Ricciardi A, Tofalo R, Parente E. 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *J Appl Microbiol*, 97: 271-284.
31. Even S, Leroy S, Charlier C, Zakour NB, Chacornac JP, Lebert I, Jamet E, Desmonts MH, Coton E, Pochet S, Donnio PY, Gautier M, Talon R, Leloir Y. 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase-negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *Int J Food Microbiol*, 139: 87-95.
32. Seitter M, Nerz C, Rosenstein R, Götz F, Hertel C. 2011. DNA microarray based detection of genes involved in safety and technologically relevant properties of food associated coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol*, 145: 449-458.
33. Dobranic V, Zdolec N, Racic I, Vujnovic A, Zdelar-Tuk M, Filipovi I, Grgurevi N, Spicic S. 2013. Determination of enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci from autochthonous Croatian fermented sausages. *Vet Archiv*, 83: 145-152.

34. Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Prevost G, Lapeyre C, Bes M, Brun Y, Fleurette J. 1996. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *Int J Food Microbiol*, 30: 271-280.
35. Rodriguez M, Nunez F, Córdoba JJ, Bermudez E, Asensio MA. 1996. Gram positive catalase-positive cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. *Appl Environ Microbiol*, 62: 1897-1902.
36. Udo EE, Al-Bustan MA, Jacob LE, Chugh TD. 1999. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning. *J Med Microbiol*, 48: 819-823.
37. Cunha MLRS, Peresi E, Calsolari RAO, Júnior JPA. 2006. Detection on enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz J Microbiol*, 37: 70-74.
38. Rall VLM, Sforcin JM, Augustini VCM, Watanabe MT, Fernandes AJ, Rall R, Silva MG, Júnior JPA. 2010. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp. isolated from nasal cavities and hands of food handlers. *Braz J Microbiol*, 40: 1067-1073.
39. Guimarães FF, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, Pantoja JCF, Langoni H. 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci*, 96: 2866-2872.
40. Piechota M, Kot B, Zdunek E, Mitrus J, Wicha J, Wolska MK, Sachanowicz K. 2014. Distribution of classical enterotoxin genes in staphylococci from milk of cows with- and without mastitis and the cowshed environment. *Pol J Vet Sci*, 17: 407-411.
41. Aye R, Gautam A, Reyaz A, Vinson H, Gibbs PS, Barigye R. 2014. Evaluation of selected toxigenic genes and antimicrobial agent susceptibility in *Staphylococcus* spp. isolated from foods purchased from North Dakota grocery stores. *J Food Nutr Disor*, 3(3): 1-5.
42. Bertelloni F, Fratini F, Ebani VV, Galiero A, Turchi B, Cerri D. 2015. Detection of genes encoding for enterotoxins, TSST-1 and biofilm production in coagulase-negative staphylococci from bovine bulk tank milk. *Dairy Sci & Technol*, 95: 341-352.