

KOAGÜLAZ-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS* (KNS) VE *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN VE ADEZYON FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

Gaye Asuman Yerli, Banu Özden Tuncer**

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

Geliş / Received: 03.09.2020; Kabul / Accepted: 16.03.2021; Online baskı / Published online: 25.03.2021

Yerli, G.A., Özden Tuncer, B. (2021). Koagülaz-negatif *Staphylococcus* (KNS) ve *Macrocooccus caseolyticus* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin ve adezyon faktörlerinin araştırılması. GIDA (2021) 46 (3) 500-514 doi: 10.15237/gida. GD20099

Yerli, G.A., Özden Tuncer, B. (2021). Investigation of biofilm formation properties and adhesion factors of coagulase-negative *Staphylococcus* and *Macrocooccus caseolyticus* strains. GIDA (2021) 46 (3) 500-514 doi: 10.15237/gida. GD20099

ÖZ

Bu çalışmada geleneksel fermente Türk sucuklarından izole edilmiş toplam 50 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* (KNS) ve 10 adet *Macrocooccus caseolyticus* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri fenotipik olarak belirlenmiş ve aynı zamanda suşlarda biyofilm oluşumu ile ilişkili genler ve adezyon genlerinin varlığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPZR) ile araştırılmıştır. Fenotipik olarak slaym (slime) üretimi Congo Red agar (CRA), biyofilm üretim düzeyi mikrotitre plaka yöntemi ile belirlenmiştir. CRA besiyerinde slaym üreticisi olduğu belirlenen 33 suşun tamamının mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının 28'inin orta, 23'ünün zayıf ve 1'nin güçlü biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. Sekiz suşa ise biyofilm üretiminin olmadığı tespit edilmiştir. mPZR denemeleri sonucu biyofilm üreticisi olduğu belirlenen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının %84.62'sinin araştırılan genlerden en az birini içerdiği bulunmuştur. Suşların %66.67'sinde *eno* geni, %15.67'sinde *icaA* geni varlığı belirlenmiştir. Diğer taraftan biyofilm üreticisi olduğu belirlenen 8 suşun ise çalışma kapsamında araştırılan biyofilm genlerinin hiçbirini içermediği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sucuk, koagülaz-negatif *Staphylococcus*, Biyofilm, Adezyon faktörler

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION PROPERTIES AND ADHESION FACTORS OF COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* AND *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* STRAINS

ABSTRACT

In this study, biofilm forming properties of 50 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) and 10 *Macrocooccus caseolyticus* strains isolated from traditional fermented Turkish sausages (sucuk) were

* Bu araştırma Gaye Asuman YERLİ'nin yüksek lisans tez çalışmasıdır. Bu çalışma 9. Gıda Mühendisliği Kongresi İzmir/Türkiye'de poster olarak sunulmuş ve kongre kitabında özet olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Gaye Asuman YERLİ. This study was presented as a poster presentation at the 9th Food Engineering Congress İzmir/Turkey, and study was published as a abstract in the book of proceedings.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ banutuncer@sdu.edu.tr

☎ (+90) 246 211 8006

☎ (+90) 246 237 0437

Gaye Asuman Yerli; ORCID no: 0000-0003-4586-9343

Banu Özden Tuncer; ORCID no: 0000-0001-9678-4441

phenotypically determined and also the presence of genes associated with biofilm formation and adhesion genes in the strains was investigated by multiplex polymerase chain reaction (mPZR). Slime production was determined on Congo Red agar (CRA) by phenotypically and biofilm production level was determined by microtiter plate method. All 33 strains determined to be slime producers in CRA medium were determined to be biofilm producers by microtiter plate method. It has been determined that 28 of KNS and *M. caseolyticus* strains are medium, 23 are weak and 1 is strong biofilm producers. Biofilm production was not detected in eight strains. As a result of mPZR experiments, 84.62 % of CNS and *M. caseolyticus* strains determined to be biofilm producers were found to be contain at least one of the genes investigated. *eno* gene was detected in 66.67% of the strains and the presence of *icaA* gene in 15.67% of the strains. On the other hand, it was determined that 8 strains determined to be biofilm producers do not contain any of the biofilm genes investigated within the scope of the study.

Key words: Sucuk, Coagulase-negative *Staphylococcus*, Biofilm, Adhesion Factors

GİRİŞ

Staphylococcus cinsine ait bazı üyeler insan ve hayvan patojeni olarak bilinmektedir. Bu grup bakteriler kan hücrelerinde gösterdikleri reaksiyona göre koagülaz-pozitif ve koagülaz-negatif stafilokoklar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birçok bakteri tarafından üretilen koagülaz enzimi kan içerisinde yer alan fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayarak kanın pıhtılaşmasına neden olmaktadır. Patojen *S. aureus* suşlarının birçoğu koagülaz-pozitif olmasına rağmen bazı doğal stafilokok suşları koagülaz reaksiyonu göstermezler. KNS'ların çoğu doğada, insan ve hayvan mukoz membranlarında sıkça bulunmakla birlikte fırsatçı patojen olarak tanınmakta ve bakteremi, septisemi, endokardit, idrar yolu enfeksiyonu ve şant enfeksiyonu gibi birçok enfeksiyona sebep olabilmektedir (Kloos vd., 1994; Piette ve Verschraegen, 2008; Rogers vd., 2009).

Stafilokokların *in vivo* katı yüzeylere tutunma ve hücre tabakalarından oluşan biyofilm oluşturma özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere tutunarak çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleri sonucu oluşur. KNS'ların etken olduğu enfeksiyonlar genellikle biomateriyaller üzerinde biyofilm tabakası oluşması sonucu gerçekleşir. Biyofilm oluşturan KNS'lar mikrobiyel topluluklar şeklinde yaşamakta ve gıda ile temas eden ekipmanlar üzerinde sanitizerlere direnç göstererek kontaminasyon kaynağı oluşturabilmektedir. Açık yüzeylerden sürüntü alarak biyofilm oluşumu tespit edilebilse de boru içleri gibi kapalı ekipmanlarda biyofilm

oluşumlarını belirlemek oldukça güçtür. Yüzeylerde biyofilm oluşturarak yaşam sürdüren bakteriler, aynı türün bireysel formlarına göre dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Bu nedenle geleneksel temizlik ve dezenfektan uygulamaları bu bakterileri öldürmek için yetersiz kalabilmektedir. Aynı zamanda biyofilm içerisinde fiziksel temas halinde bulunan bakteriler biyofilm oluşturma yeteneklerini konjugasyon aracılığı ile aktarabilmektedir. Biyofilmler bu bağlamda virülens ve direnç determinantlarının mikroorganizmalar arasında aktarımının sağlandığı ortam şartlarını da oluşturmaktadır (Schlegelova vd., 2010).

Tıbbi araç-gereç ve implantlarda özellikle *S. epidermidis* ve *S. aureus* kaynaklı biyofilm oluşumları oldukça sık araştırılmaktadır. Ancak literatürde çeşitli gıda örnekleri ve gıda ile ilişkili yüzey ve ekipmanlarda bulunabilecek biyofilm oluşturma yeteneğindeki stafilokok türleri üzerinde yeterince bilgi yer almamaktadır. Türler arasında değişiklik göstermesine rağmen *S. sciuri* ve *S. xylosus* susuz yüzeylerde biyofilm oluşturabilmekte *S. carnosus* ise çeşitli yüzeylerde varlık gösterebilmektedir. Söz konusu bakterilerin gıda ile ilişkili susuz yüzeylere tutunabilme ve biyofilm oluşturma yeteneği kolonizasyon şansını artırmakta ve gıda zehirlenmelerine zemin hazırlamaktadır (Planchon vd., 2007; Brooks ve Flint, 2008).

Laktik asit bakterileri ve KNS'lar sucuk gibi et fermentasyon ürünlerinin üretiminde yer alan başlıca bakteri gruplarıdır. KNS suşlarının doğal yaşam alanları insan ve hayvanların deri ve mukozaları olduğu için bu suşlar hayvansal

kaynaklı çeşitli gıdalardan izole edilebilmektedir. Farklı çalışmalarda çeşitli fermente et ürünlerinden izole edilen KNS türleri arasında yaygın olarak *S. xylosus*, *S. equorum* ve *S. saprophyticus* türlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca farklı çalışmalarda fermente sosislerden önceden *Staphylococcus caseolyticus* olarak adlandırılmış olan *Macrocococcus caseolyticus* suşlarının da izole edildiği belirtilmiştir (Kaban ve Kaya, 2008; Leroy vd., 2010; Talon ve Leroy, 2011; Busconi vd., 2014; Kesmen vd., 2014; Geniş ve Tuncer, 2018). Makrokoklar farklı memelilerin cilt yüzeylerinde ve çiğ süt, pastörize süt, süt ürünleri, et ve et ürünleri gibi gıdalarda da bulunabilmektedir. Makrokoklar insan enfeksiyonları ile doğrudan ilişkili olmasalar da, hayvanlarda enfeksiyonlara yol açan patojenler olarak rolleri son yıllarda giderek daha fazla araştırılmaktadır. *M. caseolyticus* ve *M. canis* koyun, sığır ve köpeklerde apse, mastitis, otitis ve dermatit gibi enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen makrokok türleridir. Diğer taraftan *M. caseolyticus* lipolitik ve proteolitik aktiviteleri nedeniyle gıda fermentasyonlarında kullanılabilir (Ramos vd., 2021).

Biyofilm oluşumu, biyofilmin yapışmasını, birikmesini, olgunlaşmasını ve dağılmasını içeren çok aşamalı bir süreçtir. Biyofilm oluşum kapasitesi birçok genetik faktör tarafından belirlenir. Ana biyofilm bileşeni, *icaABCD* operonunu oluşturan *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* genleri tarafından kodlanan enzimler tarafından sentezlenen polisakarit hücrelerarası adhezin (PIA) molekülüdür (Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020). *bap* geni tarafından kodlanan biyofilm ile ilişkili *bap* proteini suşların hem abiyotik yüzeylere ilk tutunmasını hem de hücreler arası tutunmayı desteklemektedir (Cucarella vd., 2001; Simojoki vd., 2012). Stafilocoklara ait bir protein ailesi olan MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Matrix Molecules, Matris Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyel Yüzey Bileşenleri) bakterinin yüzeylere tutunması ve konak hücre içine invase olması (girişi) ile ilişkilidir (Los vd., 2010; Simojoki vd., 2012, Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020).

MSCRAMM içerdiği, *fmbA* ve *fmbB* tarafından kodlanan fibronektin bağlayıcı protein A ve B, *clfA* ve *clfB* tarafından kodlanan fibrinojen bağlayıcı proteinler kümelenme faktörü A ve B, *cna* tarafından kodlanan kolajen bağlayıcı protein ve *fib* tarafından kodlanan fibrinojen bağlayıcı proteinler ile hücre dışı memeli proteinleri ve abiyotik yüzeylere tutunmayı sağlar. Koagülaz-pozitif ve koagülaz-negatif stafilocokların çeşitli yüzeylere tutunma kabiliyeti, laminin bağlayıcı proteini kodlayan *eno* geni tarafından da belirlenmektedir (Kong vd., 2018).

Biyofilm oluşturma kapasitesi, stafilocok virülansının en önemli faktörlerinden biridir. Fermente et ürünlerinde biyofilm oluşturan stafilocokların oluşması, et işleme tesislerinde teknolojik süreçlerde bozulmalara ve son ürünün kontaminasyonuna neden olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada sucuktan izole edilmiş KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında biyofilm oluşumunun prevalansını ve özelliklerini belirlemeyi ve bu izolatlarda biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda geleneksel fermente Türk sucuklarından izole edilmiş 50 adet KNS ve 10 adet *M. caseolyticus* suşlarında biyofilm oluşturma özellikleri fenotipik olarak belirlenmiş ve suşların biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerinin (*icaA*, *icaB* ve *bap*) yanında adezyon genlerinin de (*fmbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *eno*, *ebpS*, *bbp* ve *fmbA*) varlığı mPZR ile araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Mikroorganizma

Çalışma kapsamında Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanan, Afyonkarahisar ilinden temin edilen starter kültür kullanılmadan üretilmiş olan fermente Türk sucuklarından izole edilmiş ve 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile moleküler düzeyde tanıları yapılmış olan 50 adet KNS (21 *S. saprophyticus*, 16 *S. epidermidis*, 4 *S. xylosus*, 3 *S. scuri*, 2 *S. hominis*, 2 *S. warneri*, 1 *S. cohnii*, 1 *S. pasteurii*, 1 *S. vitulinus*) ve 10 adet *Macrocococcus* suşları kullanılmıştır (Geniş ve Tuncer, 2018).

Slaym oluşturma yeteneğinin Congo Red Agar yöntemi ile belirlenmesi

KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının slaym oluşturma özellikleri Congo Red Agar (CRA, 0.8 g/L congo red, 50 g/L sakaroz, 37 g/L Brain Heart Infusion broth, 10 g/L agar agar) ortamlarında fenotipik olarak incelenmiştir. Tryptone Soy Broth (TSB, LAB M Ltd., İngiltere) besiyerinde geliştirilen suşlar CRA besiyerine sürme yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin renkleri incelenerek fenotipik olarak slaym oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. CRA besiyeri ortamında siyah renkli koloniler slaym pozitif, pembe renkli koloniler slaym negatif olarak değerlendirilmiştir (Freeman vd., 1989).

Biyofilm üretiminin mikrotitre plaka yöntemi ile belirlenmesi

KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının biyofilm üretiminin belirlenmesinde 96 kuyulu mikrotitre plakalar (V plate, LP Italiana Spa, İtalya) kullanılmıştır. Biyofilm üretimi Toledo Arana vd. (2001) tarafından önerilen yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Aktif KNS ve *M. caseolyticus* suşları %0.25 (w/v) glukoz içeren TSB besiyerinde 1:100 oranında dilüe edilmiş ve mikrotitre plakalara 200 µL aktararak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakalar fosfat tampon (PBS, pH 7.4) ile mikropilaka yıkayıcı (Biotek ELx50, Vermont ABD) kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Plakalar 60 °C'de 1 saat kurutulmuştur. Daha sonra plakalar kristal viyole (%1, w/v) ile 15 dakika boyanmış ve tekrar yıkanmıştır. Plakalar 200 µL etanol/aseton (80:20, v/v) ile doldurulmuş ve biyofilm optik yoğunluğu (OD) 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu (Biotek Synergy HT, Vermont ABD) ile ölçülmüştür. Biyofilm üretim düzeyi Stepanović vd. (2007)'ye göre aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirilmiştir. ODc eşik değer optik yoğunluğunu, ODnc negatif kontrolün optik yoğunluğunu ve SDnc ise negatif kontrolün standart sapmasını ifade etmektedir. Suşlar; biyofilm üreticisi değil ($OD \leq ODc$), zayıf biyofil üreticisi ($ODc < OD \leq 2x ODc$), orta düzeyde biyofilm üreticisi ($2x ODc < OD \leq 4x ODc$) ve

güçlü biyofilm üreticisi ($4x ODc < OD$) olarak değerlendirilmiştir.

$$ODc = \text{ortalama } ODnc + (3 \times SDnc) \quad (1)$$

Genomik DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi

TSB besiyerinde 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılarak aktive edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarından Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'nın varlığı %0.7 (w/v) agaroz (AppliChem, Darmstadt, Almanya) oranı ile hazırlanan jellerde (Thermo OWL EASYCAST B2, Litvanya) tespit edilmiştir. Etidyum bromit (0.2 µg/mL) ile boyanan agaroz jellerin fotoğrafları Nikon D-5100 (Nikon Co., Japonya) fotoğraf makinesi ile çekilmiştir.

Biyofilm üretiminin mPZR ile genotipik tanısı

Çalışma kapsamında *fnbA* ve *fnbB* (fibronektin bağlayıcı protein A ve B), *fib* (fibrinojen bağlayıcı protein), *clfA* ve *clfB* (kümeleme faktörü A ve B), *cna* (kollejen bağlayıcı protein) *eno* (laminin bağlayıcı protein), *ebpS* (elastin bağlayıcı protein), *bbp* (kemik sialoprotein bağlayıcı protein), *icaA* ve *icaD* (hücreler arası adezin A ve D) ve *bap* (biyofilm ile ilişkili protein) genlerinin varlığı Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix (Thermo #F-548L, Litvanya) kullanılarak mPZR yöntemi ile Techne TC3000 (Cambridge, İngiltere) cihazı ile araştırılmıştır. mPZR denemelerinde varlığı araştırılan genlerin ampikon büyüklükleri ve bu genlere özgü primerlerin bağlanma sıcaklıkları dikkate alınarak 2 ayrı primer takımı oluşturulmuş (Primer takımı 1: *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *bbp*, *icaA* ve *icaD*; primer takımı 2: *cna*, *eno*, *bap*) ve 25 döngü olacak şekilde iki farklı PZR koşulu uygulanmıştır. *fnbA* geninin varlığı ise PCR Master Mix (Thermo #K0172, Litvanya) kullanılarak tekli PZR uygulaması ile araştırılmıştır. Denemelerde varlığı araştırılan genler ile kullanılan primerler, ampikon büyüklükleri ve PZR koşulları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. mPZR çalışmalarında araştırılan genler, primerler, PZR protokolleri ve amplicon büyüklükleri

Table 1. Genes researched in mPCR studies, primers, PCR protocols and amplicon sizes.

Gen Gene	Primer sekansı (5'-3') Primer sequence (5'-3')	PZR protokolü PCR protocol	Ürün büyüklüğü (bp) Amplicon size (bp)
<i>hap</i>	3'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAAAT-5' 5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 57 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 1 dk/min (1 döngü / cycle)	971 ^a
<i>bbp</i>	3'-AACTACATCTAGTACTCAACAACAG-5' 5'-ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	575 ^b
<i>djA</i>	3'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-5' 5'-CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	292 ^b
<i>djB</i>	3'-ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC-5' 5'-TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	205 ^b
<i>cna</i>	3'-GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC-5' 5'-AATCAGTAAATGCACTTTGTCCACTG-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 57 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 1 dk/min (1 döngü / cycle)	423 ^b
<i>ebpS</i>	3'-GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC-5' 5'-AATCAGTAAATGCACTTTGTCCACTG-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	423 ^b
<i>eno</i>	3'-ACGTGCAGCAGCTGACT-5' 5'-CAACAGCATCTTCAGTACCTTC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 57 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 1 dk/min (1 döngü / cycle)	302 ^b
<i>fjb</i>	3'-CTACAACFACAAATGCCGTCAACAG-5' 5'-GCTCTTGTAAGACCAATTTCTTCAC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	404 ^b
<i>fjbA</i>	3'-GTGAAGTTTTAGAAAGGTGGAAAGATTAG-5' 5'-GCTCTTGTAAGACCAATTTCTTCAC-3'	94 °C 6 dk/min (1 döngü / cycle); 94 °C 1 dk/min, 52 °C 1 dk/min, 72 °C 1 dk/min (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	643 ^b
<i>fjbB</i>	3'-GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT-5' 5'-CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTTC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	524 ^b
<i>icaA</i>	3'-CCTAACTAACGAAAAGGTAG-5' 5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	1315 ^c
<i>icaD</i>	3'-AAACGTAAGAGAGGTGG-5' 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	381 ^c

^a Seo vd. 2008^b Vasudevan vd. 2003^c Tristan vd. 2003

PZR denemeleri sonucunda çoğaltılan genlerin agaroz jel elektroforezleri %1.5 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde Thermo OWL EASYCAST B2 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elektroforez işleminin ardından tanktan çıkarılan jeller elektroforez tamponununun 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde 30 dk süre ile boyamaya bırakılmıştır. Boyama işlemi sonrasında jeller UV ışık altında incelenmiş ve Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinası kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada CRA besiyeri kullanılarak fenotipik olarak slaym oluşumunun test edildiği ilk denemede 60 izolatın 13'ünün (%21.66) siyah, 15'inin (%25.00) zayıf-siyah ve 32'sinin (%53.33) ise pembe koloni oluşturduğu gözlemlenmiştir. İkinci denemede ise izolatların 12'sinin (%20.00) siyah, 9'unun (%15.00) zayıf-siyah ve 39'unun (%65.00) ise pembe koloni oluşturduğu belirlenmiştir (Veri gösterilmedi). Zhou vd. (2013), kateter ve kan izolatı olan KNS suşlarının 3 ile 5 jenerasyon sonrasında siyah koloni yapısından bordo ve pembe koloni yapısına kadar değişim gösterdiğini belirlenmişlerdir. Araştırmacılar koloni rengindeki bu değişimin biyofilm oluşumu için *in vivo* ve *in vitro* koşullar arasındaki besin bileşenleri, pH, oksijen radikalleri ve antibiyotikler gibi farklı çevresel koşulların yarattığı pozitif seçici ortam varlığı veya biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu kesin bilinen *icaA* ve *icaD* genlerinin kaybı ya da mutasyonu sonucu olduğu hipotezini öne sürmüşlerdir. Mevcut çalışma kapsamında da farklı zamanlarda CRA besiyerinde slaym oluşumları test edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının farklı fenotipik sonuçlar vermesinin nedeni izolatların her bir denemeden önce de aktifleştirilmek için iki kez pasajlanmış olmaları olabilir. Simojoki vd. (2012), CRA besiyerinde siyah veya siyaha yakın kolonilerin slaym üreticisi olduklarını bildirmiştir. Bu bağlamda CRA besiyeri kullanılarak yapılan denemelerden herhangi birinde zayıf siyah veya siyah koloni rengi veren 33 (%55) suş slaym üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2).

Mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üretim yetenekleri araştırılan KNS ve *M. caseolyticus*

suşlarının 28'inin (%46.67) orta, 23'ünün (%38.33) zayıf ve 1'nin (1.67) güçlü biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Sekiz suşta (%13.33) ise biyofilm üretiminin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 2). CRA besiyerinde slaym üreticisi olduğu belirlenen 33 suşun tamamının mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan CRA besiyerinde slaym üretmediği belirlenen 23 suşun zayıf veya orta düzeyde biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak Gajewska ve Chajęcka-Wierczkowska (2020) CRA besiyerinde slaym üreten veya üretmeyen *S. aureus* ve KNS suşlarının mikrotitre plaka yöntemi ile güçlü biyofilm üreticisi olarak belirlendiklerini bildirmişlerdir.

Stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturabilme özelliklerinin incelenmesinde fenotipik değerlendirme yöntemlerinin yanı sıra genotipik çalışmaların da uygulanması önemlidir (Vasudevan vd., 2002). Bu bağlamda fenotipik olarak biyofilm oluşturma özellikleri belirlenen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında biyofilm ve adezyon genlerinin varlığı araştırılmıştır. Biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının %84.62'sinin araştırılan genlerden en az birini içerdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan biyofilm üreticisi 8 suşun ise çalışma kapsamında araştırılan biyofilm genlerinin hiçbirini içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3). Benzer olarak Gajewska ve Chajęcka-Wierczkowska (2020) *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosus* ve *S. simulans* türleri üyesi güçlü biyofilm üreticisi 5 KNS suşunun hiçbirinde biyofilm üretimi ile ilişkili gen tespit etmemişlerdir. Farklı çalışmalarda belirtildiği gibi, biyofilm genlerinin başarısız amplifikasyonu biyofilm ile ilişkili genlerde meydana gelebilen mutasyonlara bağlı olarak DNA dizilerindeki farklılıklardan kaynaklı olabilir (Oliveira vd. 2006; Darwish ve Asfour 2013; Melo vd., 2013).

Çizelge 2. KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının CRA besiyerinde slaym üretimi ve mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üretimiTable 2. Slime production of CNS and *M. caseolyticus* strains on CRA media and biofilm production by microtiter plate method.

Suşlar Strains	CRA Besiyerinde Slaym Üretimi Slime Production on CRA Media	Biyofilm Üretimi (Mikrotitre Yöntemi)* Biofilm Production (Microtiter Plate Method)*
<i>S. saprophyticus</i> BYS1	+	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS2	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS4	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS5	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS7	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS8	+	Orta
<i>S. cohnii</i> BYS9	-	Orta
<i>S. sciuri</i> BYS10	+	Güçlü
<i>S. saprophyticus</i> BYS11	-	Zayıf
<i>S. vitulinus</i> BYS12	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS13	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS14	-	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS15	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS16	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS17	-	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS18	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS19	+	Zayıf
<i>S. sciuri</i> BYS20	-	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS21	+	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS22	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS23	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS24	-	Zayıf
<i>S. hominis</i> BYS27	+	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS28	-	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS29	+	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS30	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS32	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS34	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS35	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS36	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS37	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS39	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS40	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS41	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS42	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS43	-	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS44	-	Zayıf
<i>S. sciuri</i> BYS45	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS46	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS47	-	Zayıf
<i>S. warneri</i> BYS48	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS49	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS50	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS51	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS52	+	Orta
<i>S. warneri</i> BYS53	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS54	-	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS55	+	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS56	-	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS57	+	Orta
<i>S. hominis</i> BYS58	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS59	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS60	-	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS61	-	-
<i>S. pasteurii</i> BYS62	+	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS63	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS64	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS65	+	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS66	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS67	-	Zayıf

* Zayıf/weak, orta/moderate, güçlü/strong

Çizelge 3. KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında saptanan biyofilm oluşumu ve adezyon genleri
 Table 3. *Biofilm formation and adhesion genes determined in CNS and M. caseolyticus strains.*

Suşlar <i>Strains</i>	Biyofilm Oluşumu ile İlişkili Genler / <i>Biofilm Associated Genes</i>			Adezyon Genleri / <i>Adhesion Genes</i>								
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>fib</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>eno</i>	<i>ebpS</i>	<i>bbp</i>
<i>S. saprophyticus</i> BYS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. cohnii</i> BYS9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. sciuri</i> BYS10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. vitulinus</i> BYS12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. sciuri</i> BYS20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. hominis</i> BYS27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS44	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i> BYS45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i> BYS48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. warneri</i> BYS53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. hominis</i> BYS58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pasteurii</i> BYS62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Çalışma kapsamında araştırılan biyofilm ve adezyon genlerinden KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında en sık rastlanan genin *eno* geni olduğu tespit edilmiştir. Adezyon genlerinden biri olan *eno* geni *M. caseolyticus* suşlarının tamamında (%100), KNS suşlarının ise %66.67'sinde tespit edilmiştir (Şekil 1). Söz konusu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da *eno* geninin adezyon genleri arasında en sık rastlanan gen olduğu bildirilmiştir (Seo vd., 2008; Simojoki vd., 2012; Darwish ve Asfour, 2013; Azara vd., 2017; Srednik vd., 2017; Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020). Seo vd. (2008), hayvan (36) ve havadan (35) izole ettikleri *Staphylococcus* spp. izolatlarında biyofilm oluşumu ile ilişkili fenotipik ve genotipik karakteristiklerin araştırıldığı çalışmalarında en sık rastlanan genin *eno* geni olduğunu tespit etmişlerdir. Havadan izole edilen suşların %83'ü, hayvansal izolatların ise %53'ünün *eno* geni içerdiği bildirilmiştir. Simojoki vd. (2012), 192 adedi mastitisli sığır sütü örneklerinden izole edilen ve 52 adedi referans KNS suşu olmak üzere toplam 244 adet KNS suşunda 9 adezyon geni (*fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *eno*, *ebpS*, *bbp* ve *fnbA*) ve 3 biyofilm oluşumu ile ilişkili genin (*icaA*, *icaD* ve *bap*) varlığını araştırdıkları çalışmalarında mastitisli süt örneklerinden izole edilen 192 adet izolatın %75'inde ve 52 adet referans suşun %79.6'sında *eno* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada mastitisli sütlerden izole edilen *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus* izolatlarının tamamının *eno* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada ise *S. epidermidis* izolatlarının %40'ının *eno* geni içerdiği belirlenmiştir. Darwish ve Asfour (2013), mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 40 adet *S. aureus* ve 68 adet KNS izolatının biyofilm oluşturma yetenekleri ve biyofilm ilişkili genlerin (*icaA*, *icaD*, *bap* ve *eno*) varlığını araştırdıkları çalışmalarında *S. aureus* izolatlarının %75'inde, KNS izolatlarının ise %92.6'sında *eno* geni tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bizim çalışmamıza benzer olarak *eno* geninin *icaA*, *icaD* ve *bap* gibi biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu bilinen genlere oranla daha sık görüldüğünü rapor etmişlerdir. Azara vd. (2017), Sardunya/İtalya'da klinik koyun mastitis örneklerinden izole ettikleri 258 *S. aureus* suşunun 228 adedinin (%88.7) *eno* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Srednik vd.

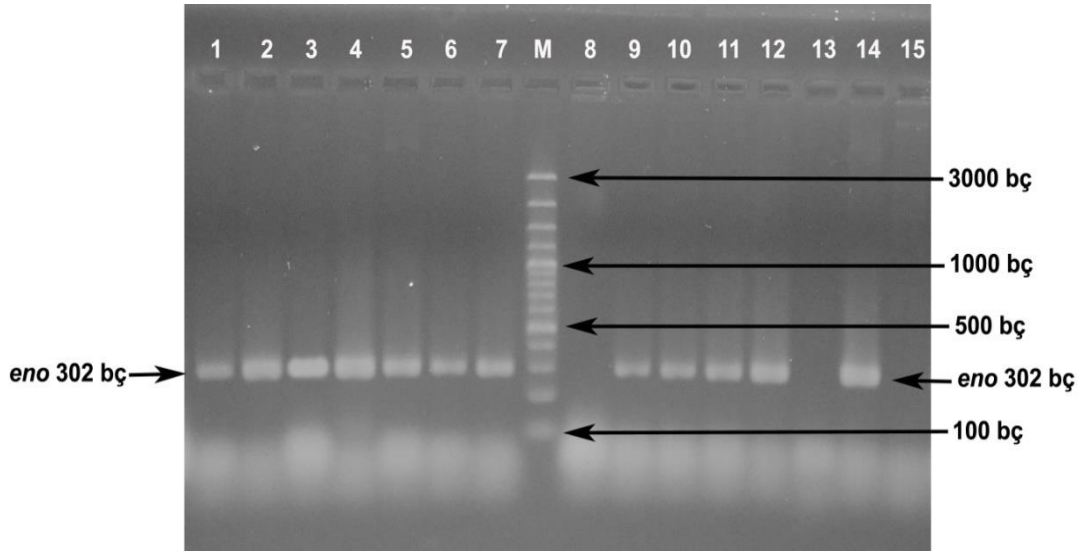
(2017) yaptıkları bir çalışmada, süt kaynaklı 90 adet KNS izolatında araştırılan 7 biyofilm oluşumu ile ilişkili gen (*icaA*, *bap*, *aap*, *fbe*, *atlE*, *embP* ve *eno*) arasında en sık rastlanan genin %87.7 ile *eno* geni olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar *eno* geninin türden ve biyofilm oluşturma yeteneğinden bağımsız olarak gıda kaynaklı KNS suşlarında oldukça yaygın olarak bulunduğunu bildirmiştir. Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska (2020), 12 *S. aureus* ve 42 KNS suşlarında %50 ile en sık rastlanan genin *eno* geni olduğunu rapor etmişlerdir.

Araştırma kapsamında sucuktan izole edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşları arasında *eno* geninden sonra en sık tespit edilen genin *icaA* geni olduğu belirlenmiştir. *icaA* geni KNS suşlarının %15.69'unda tespit edilirken, *M. caseolyticus* suşlarının hiçbirinde tespit edilmemiştir. *S. xylosus* BYS14, *S. epidermidis* BYS17, BYS24, BYS30 BYS43, BYS44, BYS46, BYS47, *S. saprophyticus* BYS18, BYS64 ve *S. sciuri* BYS20 suşlarında *icaA* geninin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu çalışmada elde edilen bulgunun aksine, Darwish ve Asfour (2013) tarafından yapılan çalışmada *eno* geninden sonra en sık rastlanan genin *icaD* geni olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 40 adet *S. aureus* ve 68 adet KNS izolatının sırasıyla %62.5'inin ve %47.1'inin *icaD* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Ancak bu çalışma kapsamında kullanılan KNS izolatlarının hiçbirinde *icaD* geni tespit edilmemiştir. Diğer taraftan araştırmacılar, *S. aureus* izolatlarının %15'inde, KNS izolatlarının ise %5.9'unda *icaA* geninin varlığını saptamışlardır. Azara vd. (2017) de çalışmalarında kullandıkları 258 adet *S. aureus* suşunun yüksek oranda *eno* geni içermelerine rağmen hiçbirinin *icaA/icaD* geni içermediğini rapor etmişlerdir.

PZR denemeleri sonucu, KNS izolatlarının %12'sinde (*S. xylosus* BYS14, *S. saprophyticus* BYS18, *S. sciuri* BYS20, *S. epidermidis* BYS24, *S. epidermidis* BYS30 ve *S. saprophyticus* BYS64) *eno* ve *icaA* genlerinin birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Khoramian vd. (2015), virülens faktör ve biyofilm özelliklerini araştırdıkları toplam 215 adet *S. aureus* izolatının 162 adedinde *eno* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı

zamanda izolatların yüksek oranda *icaA* ve *icaD* genlerini de içerdiğini belirlemişlerdir. Test edilen izolatların 189 adedinin (%87.9) *icaA*, 190 adedinin de (%88.4) *icaD* geni içerdiğini

bildirmişlerdir. Benzer olarak, Srednik vd. (2017) de süt kaynaklı 90 adet KNS izolatının %6.2'sinde *eno* ve *icaA* genlerinin birlikte bulunduğunu rapor etmişlerdir.



Şekil 1. Bazı KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında set 2 (*cna-eno-bap*) primer karışımı kullanılarak yapılan mPZR denemesinin agarozel elektrophores görüntüsü

1: *S. saprophyticus* BYS1; 2: *S. saprophyticus* BYS2; 3: *S. saprophyticus* BYS4; 4: *M. caseolyticus* BYS4; 5: *S. saprophyticus* BYS7; 6: *S. saprophyticus* BYS8; 7: *S. cohnii* BYS9; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 8: *S. sciuri* BYS10; 9: *S. saprophyticus* BYS11; 10: *S. vitulinus* BYS12; 11: *S. saprophyticus* BYS13; 12: *S. xylosum* BYS14; 13: *S. saprophyticus* BYS15; 14: *M. caseolyticus* BYS16; 15: negatif kontrol (su)

Figure 1. Image of agarose gel electrophoresis of mPCR test used set 2 (*cna-eno-bap*) primer mix in some CNS and *M. caseolyticus* strains

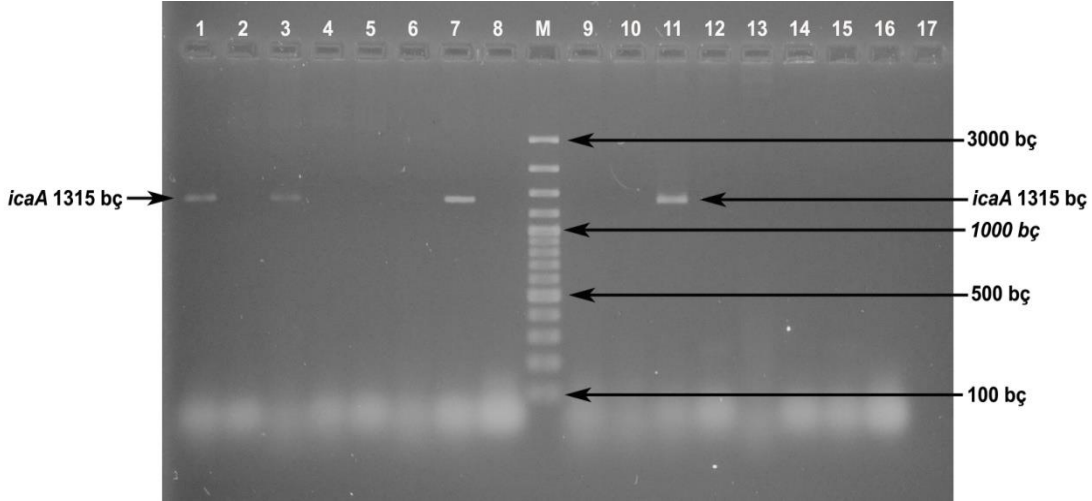
1: *S. saprophyticus* BYS1; 2: *S. saprophyticus* BYS2; 3: *S. saprophyticus* BYS4; 4: *M. caseolyticus* BYS4; 5: *S. saprophyticus* BYS7; 6: *S. saprophyticus* BYS8; 7: *S. cohnii* BYS9; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 8: *S. sciuri* BYS10; 9: *S. saprophyticus* BYS11; 10: *S. vitulinus* BYS12; 11: *S. saprophyticus* BYS13; 12: *S. xylosum* BYS14; 13: *S. saprophyticus* BYS15; 14: *M. caseolyticus* BYS16; 15: negative control (water)

Çalışma kapsamında araştırılan diğer biyofilm oluşumu ile ilişkili genler (*icaD* ve *bap*) ve adezyon genlerinin (*fnbA*, *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebpS* ve *bbp*) varlığı hiçbir suşta tespit edilmemiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara benzer olarak Seo vd. (2008), araştırdıkları 71 adet (36 hayvan ve 35 hava kaynaklı) *Staphylococcus* spp. izolatından hiçbirinde *bap*, *fnbA* ve *fnbB* geni varlığını tespit etmemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda sadece 1 adet hayvansal izolatın *bbp* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Vautor vd. (2008) de 262 adet *S. aureus* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların hiçbirinde *bap* geninin varlığını tespit etmemişlerdir. Bir başka çalışmada Simojoki vd.

(2012), mastitisli sığır sütü örneklerinden izole edilen KNS suşlarının hiçbirinin *bap* ve *cna* geni içermediğini, *bbp* (%1.2), *fnbB* (%2.4), *fnbA* (%3.6), *clfB* (%3.6), *clfA* (%4.8), *ebpS* (%4.8) ve *fib* (%4.8) genlerini ise düşük sıklıkla içerdiklerini bildirmişlerdir. Darwish ve Asfour (2013), 40 adet *S. aureus* suşundan sadece 1 adedinin (%2.5), 68 adet KNS izolatının ise 3 adedinin (%4.4) *bap* genine sahip olduğunu bildirmiştir. Khoramian vd. (2015), insan ve inek enfeksiyonlarından izole ettikleri 215 adet *S. aureus* izolatından hiçbirinin *bap* geni içermediğini tespit etmişlerdir. Azara vd. (2017), ise bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak 258 adet *S. aureus* izolatının

hiçbirinin *fnbB* geni içermediğini 1 adedinin ise *bbp* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Ancak araştırmacılar bizim çalışmamızda elde edilen

bulgunun aksine suşların yüksek oranda *fib* (%92.2), *clfA/clfB* (%82.5), *ebps* (%80.6) ve *fnbA* (%72.8) geni içerdiğini tespit etmişlerdir.



Şekil 2. Bazı KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında set 1 (*fnbB-fib-clfA-clfB-ebpS-bbp-icaA-icaD*) primer karışımı kullanılarak yapılan multiplerks-PZR denemesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

1: *S. saprophyticus* BYS18; 2: *M. caseolyticus* BYS19; 3: *S. sciuri* BYS20; 4: *M. caseolyticus* BYS21; 5: *M. caseolyticus* BYS22; 6: *S. epidermidis* BYS23; 7: *S. epidermidis* BYS24; 8: *S. hominis* BYS27; M: O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Thermo); 9: *S. epidermidis* BYS28; 10: *M. caseolyticus* BYS29; 11: *S. epidermidis* BYS30; 12: *S. saprophyticus* BYS32; 13: *S. saprophyticus* BYS34; 14: *S. xylosus* BYS35; 15: *S. xylosus* BYS36; 16: *S. xylosus* BYS37; 17: negatif kontrol (su)

Figure 2. Image of agarose gel electrophoresis of multiplex-PCR test used set 1 (*fnbB-fib-clfA-clfB-ebpS-bbp-icaA-icaD*) primer mix in some CNS and *M. caseolyticus* strains

1: *S. saprophyticus* BYS18; 2: *M. caseolyticus* BYS19; 3: *S. sciuri* BYS20; 4: *M. caseolyticus* BYS21; 5: *M. caseolyticus* BYS22; 6: *S. epidermidis* BYS23; 7: *S. epidermidis* BYS24; 8: *S. hominis* BYS27; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 9: *S. epidermidis* BYS28; 10: *M. caseolyticus* BYS29; 11: *S. epidermidis* BYS30; 12: *S. saprophyticus* BYS32; 13: *S. saprophyticus* BYS34; 14: *S. xylosus* BYS35; 15: *S. xylosus* BYS36; 16: *S. xylosus* BYS37; 17: negative control (water)

Stafilokoklarda poli-N-süksinil-β-1-6 glikozamin polisakkarit tutunma matriksinin üretiminden *icaADBC* gen kümesinin sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Bu matriksin hücrelerin birbirine yapışmasında etkin rol aldığı varsayılmaktadır. Bu nedenle *icaADBC* gen kümesini içeren stafilokok suşlarının potansiyel biyofilm üreticisi olduğu kabul edilmektedir (Cramton vd., 1999; Götz, 2002; Szweda vd., 2012; Yüksekdağ ve Baltacı, 2013). Yapılan farklı çalışmalarda fenotipik olarak CRA'da siyah koloni veren suşların genotipik olarak da *icaA* veya *icaD* veya her iki geni birlikte içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca *icaA* ve *icaD* genlerinin bir arada bulunduğu ve ifade edildiği suşlarda söz konusu genlerin tek tek yer aldığı suşlara kıyasla biyofilm üretiminin daha fazla

olduğu bildirilmiştir (Atshan vd., 2012; Zhou vd., 2013). Bu bulguların aksine araştırma kapsamında *icaA* geni içerdiği tespit edilen *S. epidermidis* BYS46 suşunun CRA besiyerinde fenotipik olarak slaym üretim özelliğinin test edildiği denemelerde pembe koloni verdiği tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bu bulgulara benzer olarak çeşitli çalışmalarda da farklı kaynaklardan izole edilen *S. aureus* ve KNS izolatlarında biyofilm oluşumunun *ica* genleri varlığında olabileceği gibi bu genlerden bağımsız olarak da biyofilm üretilebileceği bildirilmiştir (Vasudevand vd., 2002; Şahin, 2007; Mariana vd., 2009; Szweda vd., 2012; Oniciuc vd., 2016; Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020). Vasudevand vd. (2002), izole ettikleri 35 adet metisilin dirençli *S.*

aureus (MRSA) suşunda biyofilm oluşturma özelliklerini CRA besiyerinde fenotipik olarak araştırmış biyofilm pozitif suşların *ica* lokusu, *icaA* ve *icaD* genleri ile ilişkilerini *in vitro* ortamda incelemişlerdir. Araştırmacılar CRA besiyerinde 35 MRSA izolatından 24'ünün siyah koloni oluşturduğunu yani biyofilm ürettiğini gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan izolatların tamamında *icaA* ve *icaD* geni varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *ica* genleri varlığının CRA besiyerinde fenotipik olarak tespit edilen biyofilm oluşumu ile her zaman ilişkilendirilemeyeceğini ve biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılmasında fenotipik ve genotipik testlerin bir arada kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır. Şahin (2007), tarafından yapılan çalışmada CRA ortamlarında tespit edilen 66 biyofilm pozitif izolatın 65'inde (%98.5) *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisi de pozitif saptanmış, 1'inde (%1,5) her iki gen de negatif bulunmuştur. Biyofilm negatif olarak değerlendirdiği 86 örneğin ise 71'inde (%82.6) *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisi de pozitif saptanmış, 15'inde (%17.4) her iki gen de negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında iyi derecede ilişki bulunmuştur fakat *ica* genlerinin varlığının her zaman biyofilm oluşumuyla sonuçlanmadığı gösterilmiştir. Benzer olarak Mariana vd. (2009), 100 MRSA izolatının biyofilm oluşturma özelliklerini fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak araştırmışlardır. CRA besiyerinde izolatların %78'inin biyofilm oluşturduğunu (siyah koloni), %22'sinin ise biyofilm oluşturmadığını (pembe koloni) tespit etmişler ve biyofilm oluşturan izolatların tamamında *icaA* ve *icaD* geni varlığını saptamışlardır. Benzer sonucun tespit edildiği bir başka çalışmada Polonya'daki mastitisli ineklerden izole edilen 132 *S. aureus* suşunun hepsinde *icaA* ve *icaD* geni tespit edilmesine rağmen fenotipik ifadeye dayalı deneyler sonucunda 76'sı (%57,6) biyofilm üretimi pozitif olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu suşların hepsinde *icaA* ve *icaD* genleri bulunmasına rağmen hiçbirinde *bap* geninin bulunmadığı tespit edilmiştir (Szweda vd., 2012). Benzer olarak bizim çalışmamızda da *icaA* geni taşıdığı tespit edilen *S. xylosus* BYS14, *S. epidermidis* BYS17, BYS24, BYS30, BYS43, BYS44, BYS46,

BYS47, *S. saprophyticus* BYS18, BYS64 ve *S. sciuri* BYS20 suşlarının da *bap* geni içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3).

SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, sucuğun biyofilm oluşturabilen KNS ve *M. caseolyticus* kaynağı olduğunu göstermiştir. İzolatların yarısından fazlasının slaym ve biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Biyofilmlerin oluşumundan sorumlu olan mekanizmaları ve genetik temelleri anlamak, biyofilm oluşumunu önlemek ve uygun önlemlerin alınmasını sağlamak için önemli bir unsurdur. PZR tekniği biyofilm üretiminin genetik temelinin değerlendirmek için tek başına yetersiz olabilir. Bir genin varlığı ya da yokluğu, kodlanmış proteinin, stafilokokların biyofilm oluşturma yeteneğinde rol oynadığını doğrudan göstermez. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalar ile biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen ancak gen içermeyen 8 KNS suşunda biyofilm üretme yeteneğinin genetik yapısını daha iyi anlamak için gelişmiş moleküler biyoloji tekniklerinin kullanılması gerekmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yazarların, başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Bu çalışma BÖT tarafından tasarlanmış, analizler BÖT ve GAY tarafından gerçekleştirilmiştir. Yazarlar makalenin yazımına katkıda bulunmuş, BÖT son halini okuyarak onaylamıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 4204-YL1-14 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Sekawi, Z., Lung, L.T.T., Hamat, R.A., Karunanidhi, A., Ali, A.M., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Seng, J.S.C., Nathan, J.J., Pei, C.P. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol*, 976-972.

- Azara, E., Longheu, C., Sanna, G., Tola, S. 2017. Biofilm formation and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* isolates collected from ovine mastitis. *J Appl Microbiol*, 123: 372-379.
- Brooks, J.D. and Flint, S.H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int J Food Sci Technol*, 43: 2163–2176.
- Busconi, M., Zacconi, C., Scolari, G. (2014). Bacterial ecology of PDO copa and pancetta piancentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product. *Int J Food Microbiol*, 172: 13-20.
- Cancilla, M.R., Powell, L.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58: 1772-1775.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 54:27-5433.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Microbiology*, 183: 2888-2896.
- Darwish, S.F., Asfour, H.A.E. (2013). Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci World J*, 378-492.
- Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase-negative *staphylococci*. *J Clin Path*, 42: 872-874.
- Gajewska, J. Chajęcka-Wierzckowska, W. (2020). Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk. *Pathogens*, 9:654.
- Geniş, B., Tuncer, Y. (2018). Determination of antibiotic susceptibility and decarboxylase activity of coagulase-negative *Staphylococcus* and *Micrococcus caseolyticus* strains isolated from fermented Turkish sausage (Sucuk). *J Food Process and Preserv*, 42: e13329.
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, 43(6): 1367-1378.
- 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.
- Kesmen, Z., Yarimcan, B., Aslan, H., Yetim, H. (2014). Application of different molecular techniques for characterization of catalase-positive cocci isolated from sucuk. *J Food Sci*, 79 (2): 222-228.
- Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., Emaneini, M. (2015). Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial Patho*, 88: 73-77.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase- negative 573 staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 7: 117-140
- Kong, C., Chee, C.F., Richter, K., Thomas, N., Rahman, N.A., Nathan, S. (2018). Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Sci. Rep*, 8: 1-16.
- Leroy, F., Giammarino, P., Chacornac, J.P., Lebert, I., Talon, R. (2010). Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small scale processing units. *Food Microbiol*, 27 (2): 294-301.
- Los R., Sawicki R., Juda M., Stankevic M., Rybojad P., Sawicki M., Malm A., Ginalska G., (2010). A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 310: 97-103.
- Melo, P.D.C., Ferreira, L.M., Filho, A.N., Zafalon, L.F., Vicente, H.I.G., de Souza, V. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus*

- isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J Microbiol*, 44, 119–124.
- Mariana, N. S., Salman S. A., Neela V., Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolated of meticillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African J Microbiol Res*, 3(6): 330-338.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*, 118, 133–140.
- Oniciuc, E.A., Cerca, N., Nicolau, A.I. (2016). Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. *Front Microbiol*, 7: 390.
- Piette, A., Verschraegen, G. (2009) Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*, 134 (1-2): 45.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S., Talona, R. (2007) Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiol*, 24: 44-51.
- Ramos, G.L.P.A., Vigoder, H.C., Nascimento, J.S. (2021). Technological applications of *Macrocooccus caseolyticus* and its impact on food safety. *Curr Microbiol*, 78: 11-16.
- Rogers, K. L., Fey, P. D., Rupp, M. E. (2009). Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin N Am*, 23: 73-98.
- Schlegelova J., Babak V., Holasova M., Konstantinova L., Necidova L., Šišák F., Vlkova H., Roubal P., Jaglic Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci*, 28: 450–461.
- Seo, Y.S., Lee, D.Y., Rayamahji, N., Kang, M.L., Yoo, H.S. (2008). Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristic of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Vet Microbiol*, 92: 179-185.
- Simojoki, H., Hyvönen, P., Plumed Ferrer, C., Taponen, S., Pyörälä, S. (2012). Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Res*, 158: 344-352.
- Srednik, M.E., Tremblay, Y.D.N., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Cirelli, A.F., Gentilini, E.R. (2017). Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiol Lett*, 364: 1-8.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Čircović, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates. *Apmis*, 115: 891-899.
- Szweda P., Schielmann M., Milewski S., Frankowska A., Jalcubezak A. (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland. *Pol J Microbiol*. 61: 65-9.
- Şahin. R. (2007). *Staphylococcus aureus* suşlarında biofilm üretimi, biofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması, Pamukkale Üniveritesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Talon, R., Leroy, S. (2011). Diversity and Safety Hazards of Bacteria Involved in Meat Fermentations. *Meat Science*, 89, 303–309.
- Toledo Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R., Lasa, I. (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4538-4545.
- Vasudevan, P., Nair M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92: 179-185.
- Vautor E, Abadie G, Pont A, Thierry R. (2008) Evaluation of the presence of the *bap* gene in

Staphylococcus aureus isolates recovered from human and animals species. *Vet Microbiol*, 127:407-11.

Yüksekdağ, Z.N., Baltacı, N. (2013). *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 43(3): 77-83.

Zhou, S., Chao, X., Fei, M., Dai, Y., Liu, B. (2013). Analysis of *S. epidermidis icaA* and *icaD* genes by polymerase chain Reaction and slime production: a case control study, *BMC Infec Dis*, 13: 242.