

PASTIRMALARDAN İZOLE EDİLEN MİKROKOK VE STAFİLOKOKLARIN KLASİK YÖNTEM VE API-ID 32 STAPH SİSTEMİ İLE KARŞILAŞTIRMALI İDENTİFİKASYONU

İrfan EROL¹

Haydar ÖZDEMİR²

Özgül KISA³

Identification of Micrococci and Staphylococci Isolated from Pastrami in Comprasion with Conventional Method and API-ID 32 Staph System

Summary: *The aim of this study is the comparative identification of micrococci and staphylococci present in the microflora of pastrami manufactured experimentally by using conventional method and the commercial system of API-ID 32 Staph.*

Seventyfive (97.4 %) of 77 isolates from pastrami samples were identified by conventional method, which 55 (73.3 %) of them were staphylococci and the rest 20 (26.6 %) were micrococci, but 2 isolates could not be identified. By using API-ID 32 Staph system, 53 isolates (70.6 %) were determined as staphylococci and 11 (14.6 %) were as micrococci, but 11 of isolates could not be identified. In addition to that, it was found that *S.saprophyticus*, *S. xylosus* and *M. varians* were revealed as predominant species by using both methods, and *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *M. luteus*, *M. nishinomiyaensis*, *M. lylae* and *M. roseus* existed in microflora.

At the result, the identification of 54 isolates (72 %) were similar while there is differents in determining 21 isolates (28 %) by both methods. One of different isolates (1.3 %) was found in genus level and 9 of them (12 %) were in species level, but 11 (14.6 %) could not be identified.

As a consequence, in order that the difference between two methods could be recovered and the frequency for the precise identification could be increased, it might be recommended that some tests, which could provide more reliable identification of important species with respect to food hygiene and technology be added to the system of API-ID 32 Staph.

Key words: Pastrami, micrococci, staphylococci, conventional method, API-ID 32 Staph.

Özet: *Bu çalışma, deneysel olarak yapılan pastirmaların mikroflorasında bulunan mikrokok ve stafilocokların klasik metot ve ticari API-ID 32 Staph sistemi ile karşılaştırmalı identifikasyonu amacıyla yapıldı.*

Örneklere izole edilen toplam 77 izolattan 75'i (97.4) klasik yöntemle identifiye edilirken, bunlardan 55'i (% 73.3) stafilocok, 20'si (% 26.6) mikrokok olarak saptanmış, 2 izolat identifiye edilememiştir. API-ID 32 Staph sistemiyle ise, izolatların 53'ü (% 70.6) stafilocok, 11'i (% 14.6) mikrokok olarak tanımlanırken, 11 izolat tanımlanamamıştır. Ayrıca *S. saprophyticus*, *S. xylosus* ve *M. varians* türlerinin her iki yöntemle de predominant olduğu, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. auricularis* ile *M. luteus*, *M. nishinomiyaensis*, *M. lylae* ve *M. roseus*'un mikroflorada temsil edildiği saptanmıştır.

¹ Prof. Dr., AÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Dışkapı-Ankara.

² Dr., AÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Dışkapı-Ankara.

³ Dr., GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Etlik-Ankara.

Klasik yöntemle identifikasyonu yapılan mikrokok ve stafilokokların, API-ID 32 Staph sistemi ile tiplendirilmesi sonucunda, 54 izolat (% 72) her iki yöntemle de benzer şekilde tanımlanırken, 21 izolatın (% 28) tanımlanmasında farklılık saptanmıştır. Farklılık gösteren izolatlardan 1'i (% 1.3) soy. 9'u (% 12) tür düzeyinde bulunurken, 11'i (% 14.6) tanımlanamamıştır.

Sonuç olarak, iki yöntem arasındaki farklılığın giderilebilmesi ve hızlı teknikte doğru tanımlama oranının artırılabilmesi için, API-ID 32 Staph sistemine gıda hijyeni ve teknolojisi açısından önem taşıyan türlerin daha güvenli identifikasyonunu sağlayacak bazı testlerin ilave edilmesi önerilir.

Anahtar Kelimeler: Pastırma, mikrokok, stafilokok, klasik yöntem, API-ID 32 Staph.

Giriş

Türkiye'de üretilen et ürünleri içerisinde önemli bir yere sahip olan pastırma, kendine özgü lezzet ve aroması nedeniyle beğenilerek tüketilen ulusal et ürünlerinden biridir. Fermente ve salamura et ürünlerinin üretiminde Micrococcaceae familyasında yer alan bazı stafilokok ve mikrokok türleri, sahip oldukları spesifik enzimatik ve teknolojik özellikleriyle ürünlerde renk ve aroma oluşumunda etkin rol oynamakta ve bu özelliklerinden dolayı *S. carnosus*, *S. xylosus* ve *M. varians* gibi türler et ürünleri üretiminde starter kültür olarak kullanılmaktadır (7, 13, 31).

Stafilokok ve mikrokokların morfolojik ve fizyolojik özelliklerinin birbirine benzemelerinden dolayı bu bakterilerin rutin olarak ayırımlarında zaman içerisinde çeşitli zorluklar ortaya çıkmış ve bu sorunun çözümüne yönelik identifikasyon teknikleri üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar içerisinde önemli bir yere sahip olan klasik metot ile identifikasyonda uygulanan işlemlerin uzun zaman alması nedeniyle, değişik firmalarca API (Analytical Profil Index) ve benzeri hızlı, otomatize sistemler geliştirilerek piyasaya sunulmuştur. API sistemlerinden biri olan, API-ID 32 Staph test sistemi (Bio Merieux, 30243-FD-07/93) ile 24 stafilokok ve 6 mikrokok türü 26 değişik reaksiyona karşı test edilerek 24 saat gibi kısa zamanda identifiye edilebilmektedir (16, 29).

Yapılan literatür taramalarında ulusal et ürünlerinden biri olan pastırmanın mikroflorasında bulunan mikrokok ve stafilokokların izolasyon ve identifikasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Dolayısıyla bu çalışma kapsamında, hem pastırma mikroflorasında bulunan mikrokok ve stafilokok türlerinin izolasyon ve identifikasyonu, hem de identifikasyonda kullanılan klasik metot ile hızlı API-ID 32 Staph sistemini karşılaştırarak, gıda kaynaklı mikrokok ve stafilokok türlerinin API-ID 32 Staph metoduyla identifikasyon düzeyini saptamak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Üç aşamalı olarak gerçekleştirilen bu çalışmanın I. aşamasında klasik yöntem ve API-ID 32 Staph sisteminin test edilmesi amacıyla *S. aureus*, *S. carnosus* ve *M. varians* referans suşlarının her iki yöntemle identifikasyonları yapıldı. II. aşamada, deneysel pastırma üretiminin değişik aşamalarında alınan örneklerden izole edilen mikrokok ve stafilokoklar klasik yöntemle identifiye edildi. III. aşamada ise, klasik yöntemle identifikasyonu yapılan izolatlar API-ID 32 Staph sistemi ile test edilerek identifikasyonları ve klasik yöntemle karşılaştırmaları yapıldı.

Referans suşlar: Kullanılan yöntemlerin test edilmesi amacıyla, ön çalışmalar çerçevesinde, *S. aureus* (ATCC 25923), *S. carnosus* (DSM 1952) ve *M. varians* (DSM 20033) referans suş olarak kullanıldı.

Deneysel Pastırma Üretimi: Bu amaçla, AÜ Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Et Ünitesinde, deneysel olarak 5 kez pastırma üretimi gerçekleştirildi. Her üretim periyodu sonunda alet ve ekipmanın sistemik temizlik ve

dezenfeksiyonu yapılarak, bir sonraki üretim periyodunda işletme florasına ait kontaminasyon riskinin minimal düzeye indirilmesi sağlandı.

Pastırma yapımında, EBK (1) tarafından önerilen geleneksel Türk pastırma yapım tekniği modifiye edilerek kullanıldı. Bu amaçla Ankara piyasasından sağlanan 2-2.5 kg ağırlığında ve yaklaşık 35x10x8 cm ölçülerinde olan 5 adet kontrfile, yüzeylerindeki kalın kabuk yağları, sinir ve tendoları uzaklaştırıldıktan sonra üretimde kullanıldı. Bu kapsamda pastırmalık etlerin bir yüzeylerinden şaklar açılarak, % 0.8-0.9 düzeyinde potasyum nitrat içeren kristal tuz ile 24 ve 16 saat süreyle 1. ve 2. tuzlama işlemleri yapıldı. Daha sonra yıkama işlemi yapılan numunelere 24 saat süreyle baskılama işlemi uygulandı. Bunu takiben örnekler oda sıcaklığında (16 ±2 °C) 5 gün süreyle kurumaya bırakılarak, hazırlanan çemen karışımı (% 55 buy otu, % 35 sarımsak, % 15 kırmızı biber) ile yaklaşık 0.2 mm kalınlığında çemenlenerek, 3 gün süreyle oda sıcaklığında kurutmaya bırakıldı. Daha sonra örnekler buzdolabı sıcaklığında muhafaza edildi.

Örneklerin Alınması ve Mikrobiyolojik Analizlere Hazırlanması: Deneysel olarak üretilen pastırma örneklerinden sırasıyla; a) pastırmalık etten (0. gün), b) tuzlama işlemi sonrasında (2. gün), c) kurutma işlemi sonrasında (9. gün) ve d) çemenleme işleminin 10. gününde (20. gün) olmak üzere üretimin 4 farklı aşamasında örnekler alındı. Bu amaçla uzunlamasına ve enine yapılan kesitlerin karışımından oluşan 20'şer g'lık örnekler 180'er ml steril peptonlu su (% 0.1) ilave edilerek, stomacherde (Lab Blender 400) 3-5 dakika süreyle homojenize edildi ve steril peptonlu su ile 10⁻⁶'ya kadar desimal dilüsyonları hazırlanarak ekime hazır hale getirildi (25).

Mikrokok ve Stafilocokların İzolasyonu: Örneklerin desimal dilüsyonlarından, P agara (15) yayma plak yöntemiyle (3) ekim yapıldı ve plaklar 34°C'de 4 gün süreyle aerob ortamda inkübasyona bırakıldı.

Seçilen Kolonilerin Genel Ayırımı: P agarda üreyen kolonilerden örnekleme yoluyla seçilen 3-5 tanesi öncelikle, oluşturdukları renk ve görünüşleri, Gram özellikleri, hücre morfolojileri ve katalaz reaksiyonu yönünden test edilerek genel ayrımları yapıldı.

Mikrokok ve Stafilocokların Ayırımı: Test amacıyla seçilen koloniler, önce Brain Heart Infusion (BHI, Difco 0037-17-8) brotha geçilerek, 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra Gram boyama yapılarak faz kontrast mikroskopta Gram özellikleri ve kolonilerin saflıkları yönünden kontrol edildi. Saf olmayan kolonilerden P agara çizme yöntemiyle tekrar geçilerek koloniler saflaştırıldı. Gram (+), katalaz (+) ve kok formundaki koloniler; glikozdan anaerob ortamda asit oluşturma (O/F), SK agarda (stafilocok selektif agar) üreme (23), FP agarda (mikrokok selektif agar) üreme (18) ve gliserolden asit oluşturma (G/F) (22) özellikleri yönünden test edilerek, mikrokok ve stafilocok olarak soy düzeyinde ayrıldı.

Klasik Yöntemle Mikrokok ve Stafilocokların İdentifikasyonu: Mikrokok ve stafilocokların klasik yöntemle identifikasyonunda, değişik araştırmacıların (2, 11, 21) bildirdiği farklı karbonhidratlardan (riboz, rafinoz, arabinoz, melibiyoz, mannoz, ramnoz, ksilit, salisin, maltoz, sellobiyoz, ksiloz, mannitol, sorbitol, laktoz, sukroz, galaktoz, fruktoz, trehaloz, melesitoz) asit oluşturma, novobiosine (5 µg/ml) duyarlılık, jelatin test, üreaz test, Simons sitrat agarda üreme, nitrat indirgeme ile % 7.5, 10 ve 15'lik tuz konsantrasyonunda üreme özellikleri yönünden test edilerek identifikasyonları yapıldı.

API-ID 32 Staph Sistemi ile Mikrokok ve Stafilocokların İdentifikasyonu: Bu sistem ile mikrokok ve stafilocokların identifikasyonunda, klasik yöntemle izole edilen koloniler önce koyun kanlı agara geçilerek pasajları yapıldı. Daha sonra kanlı agarda üretilen saf bakteri izolatları ATB1550 dansitometre ile 0.5 Mc Farland standardına göre süspansiyon edildi. Üretilen koloniler serum fizyolojik içerisinde

ATB elektronik pipet yardımıyla homojenize edildikten sonra, ID 32 Staph striplerinin her kuyucuğuna 55'er µl ilave edildi ve 37°C'de aerob koşullarda 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bundan sonra nitrat redüktazı için, 0.0 kuyucuğuna NİT 1 ve NİT 2 reaktifleri, asetoin üretimi için, 0.1 kuyucuğuna VPA ve VPB reaktifleri, β-galaktozidaz, arjinin-arylamidaz, alkalın fosfataz ve pirolidolin-arylamidaz reaksiyonları için, 0.2-0.5 arasındaki kuyucuklara FB reaktifinden birer damla ilave

edilip, 5 dakika sonra otomatik okuyucuda değerlendirilerek identifikasyonları yapıldı. API-ID 32 Staph sisteminde uygulanan testler topluca Tablo 1'de verilmiştir.

API sistemi ile yapılan identifikasyonlar sonucu % 70 ve üzerindeki tanımlamalar kabul edilebilir tanımlama olarak değerlendirilirken (4), bu değer in altında tanımlanan izolatlar ID 32 Staph test sistemi ile yeniden test edildi.

Tablo 1: API- ID 32 STAPH sisteminin içerdiği tes
Table 1: Test of API-ID 32 Staph system

1- Üreaz	10- Mannit ferm.	19- Pirolidonil-Arylamidaz
2- Arjinin hidrolizi	11- Rafinoz ferm.	20- Novobiosine duyarlılık
3- Galaktozidaz	12- Riboz ferm.	21- Sakkaroz ferm.
4-Eskulin hidrolizi	13- Sellobiyoz ferm.	22- N-Asetilglukozamin
5- Glikoz ferm.	14- Mannoz ferm.	23- Turanoz ferm.
6- Fruktoz ferm.	15- Asetoin oluşumu	24- Arabinoz ferm.
7- Maltoz ferm.	16- Nitrat redüksiyonu	25- β-Glukronidaz
8- Laktoz ferm.	17- Arjinin-Arylamidaz	26- Ornitindekarboksilaz
9- Trehaloz ferm.	18- Alkalın fosfataz	

Bulgular

Çalışmanın I. aşamasında test edilen referans suşlar her iki yöntemle de doğru olarak tanımlanmıştır.

Deney sel pastırma üretim inin de ğiş ik aş amalarında alınan örneklerden izole edilen toplam 77 izolat tan, 75'i (% 97.4) klasik yöntemle identifiye edilirken, bunlardan 55'i (% 73.3) staf ilokok, 20's i (% 26.6) mikrok ok olarak saptanmıştır. API-ID 32 Staph sistemiyle ise, izolatların 53'ü (% 70.6) staf ilokok, 11'i (% 14.6) mikrok ok olarak tanımlanmış ve 11'i (% 14.6) kabul edilemez profil gösterdiğ inden tanımlanamamıştır. Klasik yöntemle izole edilen suş ların, 44'ü (% 58.6) *S. saprophyticus*, 16's ı (% 21.3) *M. varians*, 7's i (% 9.3) *S. xylosus*, 3'ü (% 4) *S. epidermidis*, 2's i (% 2.6) *M. nishinomiyaensis*, 2's i (% 2.6) *M. luteus*, 1'i (% 1.3) *S. simulans* olarak identifiye edilmesine karş ın, aynı suş ların API-ID 32 Staph sisteminde, 44'ü (% 58.6) *S. saprophyticus*, 7's i (% 9.3) *M. varians*, 6's ı

(% 8) *S. xylosus*, 1'i (% 1.3) *S. auricularis*, 1'i (% 1.3) *S. simulans*, 1'i (% 1.3) *S. intermedius*, 1'i (% 1.3) *M. nishinomiyaensis*, 1'i (% 1.3) *M. roseus*, 1'i (% 1.3) *M. luteus*, 1'i (% 1.3) *M. lylae* olarak identifiye edilmiştir.

Tablo 2 ve 3' de görüldüğü gibi, klasik yöntemle izole ve identifiye edilen toplam 75 staf ilokok ve mikrok ok izolatından, 54'ünün (% 72) her iki yöntemle de benzer şekilde tanımlanmasına karş ın, 21 izolatın (% 28) tanımlanmasında farklılık saptanmıştır. Genelde API-ID 32 Staph test sistemi ile staf ilokokların daha iyi tanımlandığı ve toplam 55 staf ilokok izolatından 45'i (% 81.8) uyumlu tanımlanırken, toplam 20 mikrok ok izolatından yalnızca 9'u (% 45) uyumlu olarak tanımlanabilmiştir. API-ID 32 Staph test sistemi ile farklı tanımlanan mikrok ok ve staf ilokok izolatlarından 1'i (% 1.3) soy düzeyinde, 9'u (% 12) tür düzeyinde bulunurken, 11 izolat (% 14.6) tanımlanamamıştır (Tablo 4).

Tablo 2: Klasik yöntem ile identifiye edilen staf ilokok ve mikrok ok türlerinin API-ID 32 Staph sistemi ile tanımlanabilme oranı

Table 2: The definition rate of staphylococci and micrococci species with API- ID 32 Staph system, identified by conventional method

	İzolat Sayısı	Uyumlu Tanımlama	Farklı Tanımlama	Tanımlana - mayan	Uyumlu tanımlama Oranı (%)
Stafilokok	55	45	7	3	81.8
Mikrokok	20	9	3	8	45
Toplam	75	54	10	11	72

Tablo 3: Klasik yöntem ve API-ID 32 Staph sistemi ile benzer şekilde tanımlanan izolatlar ve sayısal dağılımları

Table 3: Smilar defined isolates with conventional method and API-ID 32 Staph system and numeric dispersion

Klasik Yöntem	API-ID 32 Staph	Suş Sayısı
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	41
<i>S. xylosus</i>	<i>S. xylosus</i>	4
<i>M. varians</i>	<i>M. varians</i>	7
<i>M. luteus</i>	<i>M. luteus</i>	1
<i>M. nishinomiyaensis</i>	<i>M. nishinomiyaensis</i>	1

Toplam: 54/75 (% 72)

Tablo 4: Klasik yöntem ve API-ID 32 Staph sistemi ile farklı tanımlanan veya tanımlanamayan izolatlar ve sayısal dağılımları

Table 4: The isolates of different defined or undefined with conventional method and API-ID 32 Staph system and numeric dispersion

Klasik Yöntem	API-ID 32 Staph	Suş Sayısı
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. xylosus</i>	2
<i>S. saprophyticus</i>	Tanımlanamadı	1
<i>S. simulans</i>	<i>S. saprophyticus</i>	1
<i>S. xylosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	2
<i>S. xylosus</i>	Tanımlanamadı	1
<i>S.epidermidis</i>	<i>S. simulans</i>	1
<i>S. epidermidis</i>	<i>S.intermedius</i>	1
<i>S. epidermidis</i>	Tanımlanamadı	1
<i>M. varians</i>	<i>S. auricularis</i>	1
<i>M. varians</i>	Tanımlanamadı	8
<i>M. luteus</i>	<i>M. lylae</i>	1
<i>M. nishinomiyaensis</i>	<i>M. roseus</i>	1

Toplam: 21/75 (% 28)

Tablo 5'de görüldüğü üzere, klasik yöntemle tanımlanan stafilokokların tamamı yalnızca SK agarda üremelerine karşın, mikrokoklar SK agarda ürememişlerdir. Yine tanımlanan stafilokok türlerinin tümü anaerob ortamda glikozu fermente etmelerine karşın, mikrokok türlerinden sadece 8'i glikozu fermente etmiştir. Aynı şekilde stafilokok türlerinin hepsi de, gliserolden asit oluşturmalarına karşın, mikrokok türleri asit oluşturmamıştır. Ayrıca tanımlanan stafilokokların tamamı % 7.5, 10 ve 15 tuz içeren besiyerinde üremişlerdir. Mikrokokların tümü % 7.5 tuz içeren besiyerinde üremelerine karşın, 6'sı % 10'luk tuz ortamında zayıf üremiş, 14'ü ürememiş ve % 15' lik tuz içeren ortamda ise tüm mikrokoklar ürememişlerdir. Yine

identifiye edilen stafilocoklardan 51'i novobiosine dirençli bulunurken, 4'ü duyarlılık göstermiş, mikrokoklardan ise 9'u duyarlı bulunmasına karşın, 11'i dirençli bulunmuştur. Bu çalışmada klasik yöntemle identifiye edilen stafilocok ve mikrokok türlerinin biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri topluca tablo 5 de gösterilmiştir.

Tablo 5: Klasik metot ile pastırmalardan izole ve identifiye edilen mikrokok ve stafilocok türlerinin bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri
Table 5: Some physiological and biochemical characteristics of micrococci and staphylococci isolated from pastrami by conventional method

Testler	<i>S.saprophyticus</i> 44 (% 58.6)	<i>S. epidermidis</i> 3 (% 4)	<i>S. simulans</i> 1 (% 1.3)	<i>S. xylosus</i> 7 (% 9.3)	<i>M. varians</i> 16 (% 21.3)	<i>M.nishinomiyaensis</i> 2 (% 2.6)	<i>M. luteus</i> 2 (% 2.6)
Riboz	-	D	+	d	d	-	+
Rafinoz	-	-	-	-	-	-	+
Arabinoz	-	-	-	+	-	-	+
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-	-
Mannoz	-	D	d	+	-	-	-
Ramnoz	-	-	-	-	-	-	+
Ksilit	d	-	-	-	-	-	-
Salisin	-	-	-	d	-	-	-
Maltoz	+	+	-	+	d	-	-
Sellobiyoz	-	-	-	-	-	-	+
Ksiloz	-	-	-	+	d	-	+
Mannitol	d	-	d	d	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Laktoz	d	+	+	d	d	-	-
Sukroz	+	+	+	+	d	-	+
Galaktoz	d	+	d	d	+	-	-
Fruktoz	+	+	+	+	+	-	+
Trehaloz	+	D	+	+	-	+	+
Melesitoz	-	D	-	-	-	-	-
Nitrat red.	+	+	+	d	+	-	-
Üreaz	+	+	+	+	+	+	+
Jelatin hid	d	D	-	+	d	+	+
% 7.5 tuz	+	+	+	+	+	+	+
% 10 tuz	+	+	+	+	d	-	-
% 15 tuz	+	+	+	+	-	-	-
O/F test	+	+	+	+	d	-	-
G/F test	+	+	+	+	-	-	-
SK agarda üreme	+	+	+	+	-	-	-
FP agarda üreme	-	-	-	-	+	+	+
Simmons Sit. Agarda üreme	-	-	-	-	+	-	-
Novobiosin rez. (5µg/ml)	+	-	-	+	d	-	+

d: değişken

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada pastırmalardan izole edilen 75 adet Gram (+), katalaz (+) kokdan, klasik metotla 55'i (% 73.3) stafilocok, 20'si

(% 26.6) mikrokok olarak identifiye edilirken, API-ID 32 Staph sistemiyle 53'ü (% 70.6) stafilocok, 11'i (% 14.6) mikrokok olarak tanımlanmıştır. Ayrıca her iki yöntemle de *S. saprophyticus*, *S. xylosus* ve *M. varians*

türlerinin predominat olduğu, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. auricularis* ile *M. luteus*, *M. nishinomiyaensis*, *M. lylae* ve *M. roseus*'un mikroflorada temsil edildiği saptanmıştır. Bu çalışma bulgularına benzer şekilde Yağlı'da (30) Türk fermente sucuklarında stafilocokların mikrokoklardan daha fazla bulunduğunu, stafilocoklardan *S. xylosus* ve *S. saprophyticus*'un, mikrokoklardan ise *M. lylae* ve *M. varians*'ın predominant olduğunu bildirmiştir.

Değişik ülkelerde pastırma ile kürlenmiş ve fermente et ürünlerinde mikrokok ve stafilocokların varlığı ve tür düzeyinde dağılımı yönünden yapılan çalışmalarda da, bu çalışma bulgularına paralel olarak stafilocokların (% 64-94), mikrokoklardan (% 4.8-36) daha yüksek oranlarda mikroflorada bulunduğu ve *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* ile *M. varians* ve *M. kristinae*'nin dominant olduğu bildirilmiştir (5, 6, 8, 11, 14, 17, 19, 20, 24, 27).

Gerek bu çalışmada, gerekse diğer araştırmacıların çalışmalarında pastırmalarda stafilocokların predominant olarak bulunması; stafilocokların oksijen gereksinmelerinin daha düşük olması ve daha yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyebilmeleri ile açıklanabilir. Özellikle pastırma üretimi sırasında kaslara uygulanan baskılama ve kurutma işlemleri ile düşük redoks potansiyeli muhtemelen mikrokokları baskılamak, fakültatif anaerob özellikteki stafilocokların daha iyi gelişmesini sağlamaktadır (14). İdentifiye edilen mikrokok türleri içerisinde *M. varians*'ın predominant olması da, yine bu türün fakültatif anaerob özelliğine bağlanabilir. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* insanların normal deri florasında sıklıkla bulunan türler olup, zaman zaman evcil hayvanların derilerinden de izole ve identifiye edilmektedir (21).

Bu çalışmada klasik yöntemle identifikasyonu yapılan toplam 75 izolatdan 54'ü (% 72) API-ID 32 Staph sistemi ile uyumlu tanımlanırken, 21'i (% 28) farklılık göstermiştir. Genelde referans, klinik ve nadiren gıda kaynaklı stafilocokların

tiplendirilmesinde kullanılan API-Staph, API-Staph-Ident, API-20GP, Staph-Track, DMS-Staph-Trac, Staph-Zym ile API-ID 32 Staph gibi hızlı ve otomatize identifikasyon test sistemleri ile özellikle stafilocokların % 45-100 arasında doğru tiplendirilebildiği (2, 9, 10, 12, 16, 26, 29), identifikasyonda doğruluk yüzdelerinin klinik izolatlarda ve öncelikle *S. aureus*'un tanımlanmasında yüksek olduğu (10, 28) bildirilmiştir. Renneberg et al. (16) API-ID 32 Staph sistemi ile test ettikleri 89 klinik izolatin % 82.1'ini, Wübbeke ve Hadlok (29) klasik yöntemle kürlenmiş çiğ et ürünlerinden izole ve identifiye ettikleri 73 izolattan 65'ini (% 89) API-ID 32 Staph ile doğru tiplendirmişlerdir. Bu çalışmada da stafilocokların API-ID 32 Staph test sistemi ile klasik yöntemle karşılaştırmalı identifikasyonu sonucu ortaya çıkan % 81.8'lik tanımlama oranı, Renneberg et al. (16) ile Wübbeke ve Hadlok'un (29) bulgularıyla uyum göstermektedir. Yine bu çalışmada da saptandığı üzere mikrokokların doğru tanımlama oranlarının, stafilocoklardan düşük olması Baker (2) tarafından da bildirilmiştir.

Bu çalışmada klasik yöntemden farklı tanımlanan izolatlardan 1'i (1.3) soy, 9'u (%12) tür düzeyinde bulunmuş, 11 izolat (% 14.6) ise kabul edilebilir profil indeksi (>%70) göstermediğinden tanımlanamamıştır. Değişik araştırmacılar tarafından yapılan klasik ve API yöntemleriyle ilgili çalışmalarda da, referans suşlar ile klinik ve et ürünlerinden saptanan izolatların identifikasyonunda bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde soy ve özellikle tür düzeyinde farklı tanımlamaların ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu çalışmada klasik yöntemle *M. varians* olarak identifiye edilen 1 izolat API-ID 32 Staph sistemi ile *S. auricularis* olarak tiplendirilmiştir. Soy düzeyinde farklı tanımlamaya ilişkin olarak Gahrn-Hansen et al. (9) 2 kez tanımlama yaptıkları kan izolatlarında; 1. ve 2. identifikasyonlar arasında % 8.6'lık farklı tanımlamanın ortaya çıktığını, bu çerçevede 1. tanımlamada mikrokok olarak tiplendirilen 3 izolatdan 2. tanımlamada 1'i *S. haemolyticus*, 1'i *S. cohnii* olarak tanımlanırken, 1'inin tanımlanamadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Baker (2) Staph-Ident ve diğer tamamlayıcı testlerle klinik

kaynaklı 6 mikrokok izolatından 3'ünün *S. hominis*, 3'ünün de *S. saprophyticus* olarak soy düzeyinde hatalı identifiye edildiğini bildirmiştir.

Diğer taraftan bu çalışmada API-ID 32 Staph ile tiplendirilen izolatların 9'u (% 12) tür düzeyinde farklı tanımlanmıştır. Stafilocokların API ve diğer hızlı sistemlerle tanımlanmasında tür düzeyinde gözlenen farklılığın klinik izolatlar ile sınırlı kalmayıp referans suşları da içerdiği diğer araştırmacılar tarafından da saptanmıştır (9, 28). Bu çalışmada API-ID 32 Staph test sistemi ile farklı tiplendirilen stafilocok izolatlarının *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. xylosus* ve *S. epidermidis* olduğu görülmektedir. Aynı bu çalışmada olduğu gibi, Watts et al. (28) API 20GP ile 2 *S. epidermidis* suşundan 1'ini *S. intermedius*, 1'ini *S. simulans* olarak; Jasper et al. (10) ise 3 *S. xylosus* suşunu negatif fosfataz ve β -galaktozidaz reaksiyonları sonucu *S. saprophyticus* olarak tiplendirdiklerini, ayrıca 3 *S. xylosus* suşunu *S. warneri* olarak tanımladıklarını ve en fazla probleme *S. epidermidis* ve *S. hyicus*'un tiplendirilmesinde rastladıklarını bildirmişlerdir. Watts et al. (28) ile Wübbeke ve Hadlok (29) API sistemlerinin hızlı sonuç vermesi ve uygulama kolaylığı yönünden büyük yarar sağladığını, ancak bu tekniklerin daha çok insan kaynaklı izolatların tiplendirilmesine yönelik olarak hazırlandığı için sistemin profil indeksinde veteriner ve gıda orijinli suşların sınırlı sayıda bulunduğunu ve bu durumun da tanımlama sorunlarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada izolatların % 2.6'sı (75/77) klasik yöntemle tiplendirilemezken, %14.6'sı API-ID 32 Staph ile tanımlanamamıştır. Gahrn-Hansen et al. (9) klasik metotla izolatların % 7.5'inin, API-Staph ile % 10.7'sinin ve API-Staph-Ident ile % 2.5'inin identifikasyonun yapılamadığını, Rosa et al. (20) İspanya'da üretilen işlem görmüş et ürünlerinin mikroflorasında bulunan Micrococcaceae'lerin klasik yöntemle yapılan tiplendirme çalışmalarında stafilocok izolatlarının %17.5'inin, mikrokok izolatlarının % 27.3'ünün tiplendirilemediğini, Wübbeke ve Hadlok (29) ise API-ID 32 Staph

ile test edilen stafilocok izolatlarından %16.7'sinin tiplendirilemediğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada, pastirmaların mikroflorasında stafilocokların predominant olduğu ve *S. saprophyticus* ile *S. xylosus* ve *M. varians*'ın her iki soy içerisinde en sıklıkla identifiye edilen türler olduğu saptanmış, ayrıca klasik yöntem ve API-ID 32 Staph sistemi ile mikrokok ve stafilocokların tanımlanmasında % 28 düzeyinde uyumsuzluk bulunmuştur. İki yöntem arasındaki bu farklılığın giderilebilmesi ve hızlı teknikle doğru tanımlama oranının artırılabilmesi için, gıda hijyeni ve teknolojisi açısından önem taşıyan türlerin daha güvenli identifikasyonunu sağlayacak bazı testlerin API-ID 32 Staph sistemine ilave edilmesi önerilir.

Kaynaklar

1. **Anonim.** (1989) *Pastırma Yapımı ve Üretim Yönetmeliği*. Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü. Yönetmelik sıra no: 202.
2. **Baker, S. J.** (1984) *Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci*. J Clin Microbiol, 19 (6), 875-879.
3. **Baumgart, J.** (1997) *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*. Behrs Verlag, Hamburg.
4. **Colton, T.** (1985) *Statistics in Medicine*. Little, Brown Co.
5. **Comi, G., Citterio, B., Manzona, M., Cantoni, C., Bertoldi, M.** (1992) *Evaluation and characterization of Micrococcaceae strains in Italian dry fermented sausages*. Fleischwirtsch, 72 (12), 1679-1683.
6. **Cornejo, I., Carrascosa, A. V.** (1991) *Charakterisierung der Micrococcaceae-Stämme, die als potentielle Starterkulturen bei spanischen trocken gepökelt Schinkenverfahren ausgewählt wurden. I. Schnellverfahren*. Fleischwirtsch, 71 (1), 99-101.

7. **Erol, İ., Hildebrandt, G.** (1992) *Einfluß von Starterkulturen auf das Wachstum pathogener Keime in türkischer Rohwurst.* Fleischwirtsch, 72 (10), 90-97.
8. **Fischer, U., Schleifer, K. H.** (1980) *Vorkommen von Staphylokokken und Mikrokokken in Rohwurst.* Fleischwirtsch, 60 (5), 1046-1051.
9. **Gahrn-Hansen, B., Heltberg, O., Rosdahl, V. T., Sogaard, P.** (1987) *Evaluation of a conventional routine method for identification of clinical isolates of coagulase-negative Staphylococcus and Micrococcus species.* Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect (B), 95, 283-292.
10. **Jasper, D. E., Infante, F. M., Dellinger, J. D.** (1985) *Efficacy of the API Staph-Ident system for identification of Staphylococcus species from milk.* Am J Vet Res, 46 (6), 1263-1267.
11. **Kotzekidou, P.** (1992) *Identification of staphylococci and micrococci isolated from an intermediate moisture meat product.* J Food Sci, 57 (1), 249-251.
12. **Langlois, B. E., Harmon, R. J., Akers, K.** (1984) *Identification of Staphylococcus species of bovine origin with the DMS Staph-Trac system.* J Clin Microbiol, (20) 2, 227- 230.
13. **Lücke, F. K., Hechelmann, H.** (1986) *Starterkulturen für Rohwurst und Rohschinken-Zusammensetzung und Wirkung.* Fleischwirtsch, 66 (2), 154-166.
14. **Molina, I., Silla, H., Flores, J., Monzo, J. L.** (1989) *Studie über die Keimflora in trocken gepökelttem Schinken. 2. Micrococcaceae.* Fleischwirtsch, 69 (9), 1488-1490.
15. **Naylor, H. B., Burgi, E.** (1956) *Observations on abortive infections of Micrococcus lysodeikticus with bacteriophage.* Virology, 2, 577-593.
16. **Renneberg, J., Rieneck, K., Gutschik, F.** (1995) *Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci.* J Clin Microbiol, 33 (5), 1150-1153.
17. **Rheinbaben, K. E., Hadlok, R.** (1979) *Gattungsdifferenzierung von Mikroorganismen der Familie Micrococcaceae aus Rohwürsten.* Fleischwirtsch, 59 (9), 1321-1324.
18. **Rheinbaben, K. E., Hadlok, R. M.** (1981) *Rapid distinction between micrococci and staphylococci with furazolidone agars.* Antonie van Leeuwenhoek, 47, 41-51.
19. **Rheinbaben, K. E., Scipp, H.** (1986) *Untersuchungen zur Mikroflora roher, stückiger Pökelfleischerzeugnisse unter besonderer Berücksichtigung der Familie Micrococcaceae.* Chem Mikrobiol Technol Lebensm, 9, 152-161.
20. **Rosa, M. C., Mohino, M. R., Mohino, M., Mosso, M. A.** (1990) *Characteristics of micrococci and staphylococci isolated from semi-preserved meat products.* Food Microbiol, 7, 207-215.
21. **Schleifer, K. H.** (1986) *Family I. Micrococcaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2, Ed: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E and Holt, J. G. p. 1003, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.*
22. **Schleifer, K. H., Kloos, W. E.** (1975) *A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci.* J Clin Microbiol, 1: 337-338.
23. **Schleifer, K. H., Krämer, E.** (1980) *Selective medium for isolating staphylococci.* Zbl Bakt Hyg I. Abt Originale CI, 270-280.
24. **Seager, M. S., Banks, J. G., Blackburn, C. W., Board, R. G.** (1986) *A taxonomic study of Staphylococcus spp. isolated from fermented sausages.* J Food Sci, 51 (2), 295-297.
25. **Silla, H., Molina, I., Flores, J., Silvestre, D.** (1989) *Studie über die Keimflora trocken gepökelter Schinken. 1. Isolierung und Wachstum.* Fleischwirtsch, 69 (7), 1177-1181.
26. **Stein, T., Schütz, M., Wiesner, H.U.** (1990) *Pathogenitätsfaktoren Koagulase-*

- negativer Staphylokokken aus Milchproben des Rindes, identifiziert mit dem API-Staph-System.* Arch Lebensmittelhyg, 41, 90-92.
27. **Vignola, M. G., Ruiz, H., Oliver, G.** (1988) *Some physiological, biochemical and technological characteristics of Gram positive cocci isolated from cured meat products.* Microbiologie Aliments Nutrition, 6, 323-327.
28. **Watts, J. L., Owens, W. E., Nickerson, S. C.** (1986) *Identification of staphylococci from bovine udders: evaluation of the API 20GP system.* Can J Microbiol, 32, 359-361.
29. **Wübbeke, E., Hadlok, R. M.** (1993) *Vergleichende Untersuchungen zur Differenzierung von Staphylococcus carnosus und Staphylococcus xylosus unter Anwendung herkömmlicher und kommerzieller Methoden.* Arch Lebensmittelhyg, 44 (5), 118-123.
30. **Yağlı, Ö.** (1995) *Türk Fermente Sucuğundan İzole Edilen Mikrokokların Bazı Fizyolojik, Biyokimyasal ve Teknolojik Özellikleri.* Doktora Tezi. A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
31. **Yurtyeri, A., Mutluer, B., Erol, İ., Hildebrandt, G.** (1993) *Beschaffenheit und Technologie von türkischer Rohwurst.* Fleischerei, (9), 725-730.