

Gıdalarda *Escherichia coli* Olmayan Fekal Koliformlar Üzerine bir Araştırma¹

Hilal B. Doğan Halkman², A. K. Halkman³

Özet

Gıdalarda toplam koliform varlığı gıdanın genel kalitesi hakkında bilgi verirken, *Escherichia coli* başta olmak üzere fekal koliformlar gıdanın fekal kontaminasyon düzeyini gösterir. Bu çalışmada çeşitli gıdaların EMS yöntemi ile yapılan standart fekal koliform analizinde fekal koliform pozitif olarak işaretlenen tüplerden VRB+MUG Agar besiyerine aşılama yapılmış, burada gelişen kolonilerden floresan (β -GUR) negatif 337 koloni izole edilmiştir. Daha sonraki tanımlama çalışmalarında bunlardan 29 adedinin β -GUR pozitif *E. coli* olduğu saptanmıştır. Kalan 308 β -GUR negatif izolatın 267 'sinin *Enterobacter aerogenes* (%86,7), 25 'inin *Klebsiella pneumoniae* (%8,1) ve 16 adedinin β -GUR negatif *E. coli* (%5,2) olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Fekal koliformlar, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*

Giriş

Koliform bakteriler bitki/ toprak ya da dışkı kaynaklı olabilmektedir. 1900 'lü yılların başında Eijkman 'ın çalışmaları ile fekal ve fekal olmayan kökenli koliformların yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı ile ayrılması olanaklı hale gelmiş görülsede Mehlman (1) yükseltilmiş sıcaklıktaki modifikasyonlara rağmen hiçbir yöntemin bu iki grubu kesin olarak ayıramayacağını göstermiştir.

Gerek Amerikan Gıda ve İlaç Örgütü (FDA; Food and Drug Administration) (2) gerek Uluslararası Standartlar Örgütü (International Standards Organization ; ISO) (3) tarafından analiz yöntemlerinde fekal koliformlar toplam koliformların bir bölümü olarak

¹ Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen 97 11 12 01 nolu projenin bir bölümüdür.

² Dr., TAEK ANTHAM Gıda İşinleme ve Sterilizasyon Bölümü, Sarayköy Ankara

³ Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Dışkapı Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: halkman@eng.ankara.edu.tr

gösterilmekte ve buna bağlı olarak analizleri toplam koliformların analizinden sonra devam etmektedir. Her iki kuruluşa göre önce toplam koliformlar standart EMS yöntemi ile Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LSTB) besiyerinde analize alınmakta, buradaki pozitif tüpler toplam koliform grup olarak değerlendirilmekte, bu pozitif tüplerden EC Broth besiyerine geçilmekte, gıdaya ve yönteme göre değişmek üzere 44,5 – 45,5 °C 'daki mikropresör kontrollü su banyosunda yapılan inkübasyon sonunda bu besiyerindeki pozitif tüpler fekal koliform olarak değerlendirilmektedir.

Her ne kadar bu test ile koliform bakterilerin fekal ya da fekal olmayan kökenli olduğuna karar verilebiliyorsa da, fekal koliform olarak belirlenmiş bakterinin cins ya da türü hakkında bir bilgi edinmek mümkün değildir ve sadece fekal kontaminasyonun saptanması esas alındığında cins ve tür bazındaki bu belirleme gerekli değildir. Bir yaklaşıma göre (4) fekal koliform analizi sadece *E. coli* belirlenmesi için önemlidir, bazı *Citrobacter* ve *Klebsiella* suşları da bu testte pozitif sonuç vermektedir. *E. coli*, *Kleb. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Ent. agglomerans*, *Ent. aerogenes* ve *Citrobacter freundii* 'nin fekal koliform bakteri analizi sırasında izole edildiği bildirilmiştir (5-7).

Bu çalışmanın amacı, gıdaların standart fekal koliform ve *E. coli* analizi sırasında *E. coli* olmayan fekal koliformların belirlenmesidir. Çalışma sadece, *E. coli* olmayan fekal koliformların cins ve türlerinin belirlenmesi amacını taşımaktadır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bu çalışmada süpermarketler ve açık pazarlardan sağlanan pastörize süt, yoğurt, peynir, tereyağı, dondurma, salata (yeşil, garnitür vb.), şarküteri ürünleri (İtalyan salatası, Rus Salatası, midye dolma vb.) pasta (kremalı ve kakaolu hazır yaş pasta), baharat (karabiber, kırmızı biber, kimyon, nane vb.) ve yaş meyve – sebzeden dondurulmuş yada taze halde çeşitli meyve – sebze ile soya filizi) oluşan 10 farklı gıdadan 50 'şer adet olmak üzere toplam 500 gıda kullanılmıştır.

Yöntem

Standart homejenizasyon ve seyreltme işlemlerinden sonra ISO (3) tarafından gösterilen EMS yöntemine göre LSTB (Merck) besiyerlerine ekim yapılmış, 37 °C 'da 48 saat süren inkübasyon sonunda gaz pozitif sonuç veren tüplerden EC Broth (Merck) 'a ekim yapılmıştır. Mikropresör kontrollü su banyosunda 44,5 °C da 48 saat süren inkübasyon sonunda gaz pozitif sonuç veren tüpler fekal koliform pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu tüplerin içinde hangi bakterilerin olduğunu saptamak ve fekal olmayan *E. coli* türlerini belirlemek için serinin en konsantre tüp ya da tüplerinden VRB+MUG Agar (Merck) besiyerine ekim yapılmıştır. 37 °C 'da 16 – 18 saat inkübasyondan sonra 366 nm dalga boylu UV el lambası (Merck) ile yapılan kontrolde floresan vermeyen (β -GUR negatif) koloniler seçilerek izolasyonları yapılmıştır.

Her Petri kutusundan en fazla 5 adet β -GUR negatif koloni izole edilmesi ve böylece gıdalardaki *E. coli* olmayan fekal koliform kompozisyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyalin kullanıldığı gıdalarda standart *E. coli* analizi devam ederken, izolatlar bağımsız olarak EC Broth 'da 44,5 °C da gelişme, β -GUR testi, triptofandan indol oluşum testi, hidrojen sülfür oluşturma testi, laktoz ve sakkaroz fermantasyonu, glikozdan asit ve gaz oluşumu, metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri, hareket ve lisin dekarboksilasyon testi (8, 9) uygulanmıştır.

Sonuç ve Tartışma

Bu çalışmada 337 adet β -GUR negatif koloni elde edilmiştir. Her ne kadar 500 gıdadan yöntem bölümünde belirtildiği gibi ekim yapılmış ise de, Petri kutularının çok büyük bir bölümünde β -GUR negatif koloni elde etmek mümkün olmamıştır. Bununla beraber denemelerde kullanılan tüm Petri kutularında floresan pozitif koloniler görülmüştür.

Denemelerin bu çalışmadan bağımsız olarak yürütülen bölümünde, VRB+MUG Agar besiyerinde elde edilen sonuçlarla tam uyum içinde olmak üzere EC pozitif tüplerde *E. coli* olduğu saptanmıştır. Bir diğer deyiş ile pozitif olarak değerlendirilen tüm EC Broth tüplerinde *E. coli* olduğu saptanmış olmakla beraber, bazı tüplerde *E. coli* olmayan fekal koliform varlığı saptanamamıştır. Bu bulgu, söz konusu tüplerde *E. coli* olmayan fekal koliform bakterilerin bulunmadığı anlamına gelebileceği gibi, sayılarının yetersiz olması nedeni ile izolasyonlarının mümkün olmayacağı anlamına gelmektedir. Petri kutularındaki β -GUR pozitif *E. coli* kolonilerine bağlı floresan ışığa yayılması nedeni ile floresan negatif olan kolonilerin gözden kaçırılmış olma olasılığı da vardır.

İdentifikasyon çalışmalarında elde edilen 337 izolatın 29 adedinin floresan pozitif olduğu görülmüştür. Diğer testler ile birlikte *E. coli* olduğu saptanan bu izolatlar çalışma kapsamı dışında bırakılmış ve bunların hatalı olarak izole edildiği kanısına varılmıştır. Bu izolatlar daha sonradan VRB+MUG Agar besiyerinde 18 saat inkübasyondan sonra uygulanan floresan testinde açık bir floresan pozitif sonuç elde edilmiştir.

Bu bulgu ile floresanın yayılma nedeni ile floresan negatif kolonilerin gözden kaçırılmış olma olasılığı floresan reaksiyonu üzerinden yapılan izolasyonlarda dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir.

İdentifikasyon bulgularına göre, 308 koloninin 267 'si ile (%86,7) *Ent. aerogenes* *E. coli* olmayan fekal koliformlar arasında en yaygın tür olarak belirlenmiştir. *Kleb. pneumoniae* (25/ 308 ; %8,1) ve β -GUR negatif *E. coli* 'nin (16/ 308 ; %5,2) *Ent. aerogenes* 'e göre oldukça düşük oranda olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile benzer çalışmalarda elde edilenler arasında muhtemelen materyalden kaynaklanan farklar göze çarpmaktadır. Deniz ürünleri ile yapılan benzer çalışmalarda *E. coli* fekal floranın dominant üyesi olarak saptanırken,

Ent. cloacae, *Ent. aerogenes*, *Ent. agglomerans*, *Kleb. pneumoniae* ve *Citr. freundii* diğer fekal koliformlar olarak belirlenmişlerdir (6, 10)

Su örneklerindeki fekal koliformların araştırıldığı bir çalışmada (7) izolatlar *E. coli* (%96,69), *Ent. cloacae* (%2,32), *Kleb. pneumoniae* (%0,66) ve *Citr. freundii* (%0,33) olarak saptanmıştır.

Bir başka kaynağa göre ise (11) istiridye ve deniz tarağından izole edilen *E. coli* olmayan fekal koliformlar yaygın olarak *Klebsiella* türleri olarak tanımlanmış, bunların %80 kadarının *Kleb. pneumoniae* olduğu belirlenmiştir.

Deniz suyu örnekleri ile yapılan bir başka çalışmada ise (12) bütün β -GUR pozitif kolonilerin *E. coli* olduğu, *E. coli* 'ler içinde %10 kadar β -GUR negatif olduğu belirlenmiştir. Bu değer *E. coli* 'ler içinde β -GUR negatif olanların %3-4 kadar olduğu şeklindeki genel kabul ile (13) bağdaşmamaktadır.

Her ne kadar bu çalışmada izole edilen β -GUR negatif *E. coli* sayısı 16 ve tüm β -GUR izolatlar içindeki oranı sadece %5,2 ise de bu değer *E. coli* izolatları içindeki oranı bilinmemektedir, çünkü deneme kapsamında bu oranının belirlenmesi yoktur.

β -GUR negatif *E. coli* 'lerin *E. coli* O157:H7 serotipi olup olmadıkları ayrıca araştırılmış, ancak bunların *E. coli* 'nin diğer serotipleri olduğu belirlenmiştir.

Gıda ve çevresel örneklerde fekal koliform analizi tartışma konusudur. Her ne kadar bazı örneklerde *E. coli* bulunmamasına karşın, fekal koliformlar bulunabiliyor ve bu bulgu fekal kontaminasyonu gösteriyorsa da fekal koliformlar ve *E. coli* arasındaki yüksek korelasyon sadece *E. coli* analizi yapılmasını yeterli kılmaktadır (10–12, 14). Tersine olarak, bazı fekal olmayan *Enterobacter* ve *Klebsiella* suşlarının fekal koliform analizinde pozitif sonuç verdiği de gösterilmiştir (15)

Bu çalışmada elde edilen bulgular gıdalardaki *E. coli* olmayan fekal koliformların değil, sadece izolatların %86,7 'sinin *Ent. aerogenes* olduğunu göstermektedir. Bununla beraber, analizi yapılan gıdalar içinde *Ent. aerogenes* 'in *E. coli* olmayan fekal koliformlar içinde kayda değer bir ağırlığı olduğu söylenebilir.

Teşekkür

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu 97 11 12 01 nolu ve "Gıdalarda Fekal Koliform Aranması" adlı projenin bir bölümüdür. Yazarlar katkı ve desteklerinden ötürü Ankara Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ederler.

Kaynaklar

- (1) Mehlman IJ (1984) Coliforms, Fecal Coliforms, *Escherichia coli* and Enteropathogenic *E. coli*. In Speck MC (ed) Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods, APHA, Washington D. C., pp 265-285
- (2) Hitchins AD, Feng P, Watkins WD, Rippey SC, Chandler LA (1998) *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Bacterial Analytical Manual, 8th Edn, Revision A Published and Distributed by AOAC International, Gaithersburg, pp 4.01-4.29
- (3) Anonymous (1993) Microbiology-General Guidance for Enumeration of Presumptive *Escherichia coli* - Most Probable Number. International Standards Organization, ISO 7251
- (4) Jay JM 1996. Modern Food Microbiology. 5th Edition. Chapman & Hall, New York 661 p.
- (5) Paille D, Hackney C, Reily L, Cole M, Kilgen M (1987) Seasonal Variation in the Fecal Coliform Population of Louisiana Oysters and its relationship to Microbial Quality. J Food Protect. 50:545-549
- (6) Splittstoesser DF (1983) Indicator Organisms on Frozen Blanched Vegetables Food Techn. June: 105-106
- (7) Warren LS, Benoit RE, Jessee JA (1987) Rapid Enumeration of Fecal Coliforms in Water by a Colorimetric beta-galactosidase Assay. Appl Environ Microbiol 35:136-141
- (8) Anonymous (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds. J. Holt et al. Williams & Wilkins Co., Maryland, 787 p.
- (9) Halkman AK, Dogan HB (1996) *Enterobacteriaceae* Familyası Üyelerinin İdentifikasyonu Üzerine Bir Araştırma. XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi Cilt II Biyoteknoloji, Mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji Genetik Sektörünü pp. 187-96. Final Copy Center, İstanbul 562 s.
- (10) Harwood VJ, Butler J, Parrish D, Wagner V (1999) Isolation of Fecal Coliform Bacteria from the Diamondback Terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). Appl Environ Microbiol. 65:865-867.
- (11) Hood MA, Ness GE, Blake NJ (1983) Relationship Among Fecal Coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Shellfish. Appl. Environ Microbiol. 45:122-126
- (12) Mates A, Schaffer M (1992) Quantitative Determination of *Escherichia coli* from Coliforms and Faecal Coliforms in Sea Water Microbios. 71:27-32.
- (13) Robison BJ (1984) Evaluation of a Fluorogenic Assay for Detection of *E. coli* in Foods. Appl. Environ. Microbiol. 48:285-288.
- (14) Bueschkens DH, Stiles ME (1984) *E. coli* Variants for Gas and Indol Production at Elevated Incubation Temperatures. Appl. Envr. Micr. 48:601-605.