

## 02. Gıda Patojenlerinin Analizi (Standart Yöntemler)

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN  
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi  
Gıda Mühendisliği Bölümü  
GDM310 Gıda Mikrobiyolojisi II Ders notu 02.

Gıdalarda bulunan patojen bakterilerin analizi genel olarak var/ yok testleri ile yapılır. Bu testler, analizi yapılacak olan 25 g(mL) gıdada aranan patojenin var olup/olmadığının kontrolüdür. Amaçlanan sonuç patojenin 25 g(mL) gıdada 0 sayıda olmasıdır. Sayı 0 değil ise ne olduğu önemli değildir. Ayrıca, var/ yok testlerinin uygulanış şekli, aranan patojen varsa sayısını ortaya çıkartmaya yönelik değildir. Aranan patojenin sayısının 1 ya da 5.000 ya da çok daha fazla olması var/ yok testleri için önemli değildir. Sonuç "var" olarak verilir.

Var/ yok testlerinde önce bir zenginleştirme, sonra katı besiyerine sürme ve tanımlama aşamaları vardır. Bazı analizlerde zenginleştirme işlemi 2 aşamada yapılır.

Temel olarak 25 g(mL) gıda 225 mL zenginleştirme besiyerinde inkübasyona bırakılır. Eğer varsa, aranan patojenin sayısı bu aşamada artar. Selektif katı besiyerine ekim ve inkübasyon sonunda tipik koloniler biyokimyasal ve/ veya serolojik yöntemlerle tanımlanır. Zenginleştirme işlemi yapıldığı için bu analiz sonunda sayının verilmesi mümkün değildir.

Bu analizler, pek çok uluslararası standartta 25 g(mL) gıdada uygulanır.

Var/ yok testleri sadece patojen bakterilere uygulanmaz. Örneğin bir ihalede 50 g reçelde ozmofilik maya olmaması istenebilir.

Tersine olarak, patojen olmakla beraber, gıdalarda düşük sayılarda bulunmasına izin verilen bakteriler vardır. Gıda/ bakteri ilişkisi dikkate alınarak *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium perfringens* için <100 KOB/ g(mL) ifadesi kullanılır. Buna göre bu bakterilerden, örneğin 90 KOB/ g(mL) sayım sonucu elde edilirse bir sorun yoktur.

Bilinen en tehlikeli 4 gıda patojeninden birisi olan *Listeria monocytogenes* için AB yasalarına göre, "üretici firmanın normal depolama şartlarında sayısının artmayacağını garanti etmesi koşulu ile" gıdalarda 100 KOB/ g(mL) bulunmasına izin verilmektedir. Bu analiz, var yok testleri ile değil, doğrudan standart sayım yöntemi ile yapılmaktadır.

### 02.01. Yok ne Demektir?

Var/ yok testi ile yapılan mikrobiyolojik analizlerde aranan mikroorganizma bulunursa testin geçerliği açısından bir sorun yoktur. Ancak sonuç "yok" olarak elde edilirse; geçekten mi yok sorusu her zaman akla gelir.

Yöntemin kendisinden gelen yetersizlik ya da operatörün hatalı uygulamaları sonunda gerçekte "var" olan bir patojen analiz sonunda "yok" olarak bulunabilir. Bu, sahte (false) negatif sonuçtur. Analiz edilen gıdada 1 KOB/ 100 g *Salmonella* olduğunu varsayalım. Operatörün aldığı 25 g örnekte bu bakterinin olma olasılığı sadece %25'dir ve burada sahte negatif bir sonuç vardır.

Gıdalardaki patojen analizlerinde en büyük sorun, aranan bakterinin stres altında olmasıdır.

Gerek zenginleştirme sıvı besiyerleri gerek zenginleştirme sonrası kullanılan selektif katı besiyerleri, refakatçi floranın gelişmesini baskılayacak çeşitli inhibitör maddeler içerir.

Bu selektif maddeler, hedef mikroorganizmanın gelişmesini minimum düzeyde baskımlarken, refakatçi florayı maksimum düzeyde baskılar. Selektif inhibitör ile kasıt budur. Bir diğer deyiş ile bu kimyasallar geniş spektrumlu antibiyotik değildir. Besiyerlerindeki derişimleri, hedef bakteriye minimum zarar verecek kadardır.

Ancak, eğer hedef bakteri stres altında ise, bu kimyasalların varlığından olumsuz etkilenir ve selektif besiyerinde gelişemez. Sonucun sahte "negatif" olarak alınmasındaki temel nedenlerden birisi budur.

Bu sorundan kurtulmak için patojen analizlerinde bir zenginleştirme ve/ veya canlandırma işleminden sonra selektif katı besiyerine ekim uygulaması vardır.

## 02.02. Zenginleştirme

Bakterinin hassasiyetine, çevresel faktörlerden ve/ veya gıda işlemleri sırasında gördüğü olası zararlara göre selektif olmayan ön zenginleştirme ve arkasından selektif zenginleştirme olabileceği gibi doğrudan selektif zenginleştirme de olabilir.

Selektif olmayan ön zenginleştirmede hiçbir inhibitör olmayan genel sıvı besiyerleri kullanılır. Burada amaç, hedef bakterinin sayısının artırılması değildir. Sadece, selektif olmayan bu ortamda bakterinin "eğer stres altında ise" kendine gelmesi amaçlanır. Sonraki selektif zenginleştirme aşamasında hedef bakteri sayısının artması amaçlanır.

Zenginleştirme aşaması/ aşamaları çok genel olarak 24 saat sürer. Selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasının 24 saat sürmesi koşulunda bir takım sakıncalara aşağıda *Salmonella* analiz örneği konusunda değinilecektir.

## 02.03. Canlandırma

Canlandırma, kısa süreli bir selektif olmayan ön zenginleştirme olarak da tanımlanabilir. Çok genel olarak 4 saatlik bir uygulamadır. Amaç, hasar görmüş olması beklenen hedef bakterinin bu hasarını onarması işlemidir. Selektif inhibitörler, zenginleştirme besiyerine katılmadan önce 4 saat süre ile optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılan kültürde, hedef bakterinin kendisini toparladığı kabul edilir.

Canlandırma, sadece selektif inhibitör katkılarının bazal besiyerine ilave edilmeden 4 saatlik bir inkübasyonu içermez. Tipik bir örnek olmak üzere; tarafımızca geliştirilen *E. coli* O157:H7 analizinde, zenginleştirme için selektif katkı ilavesi ve 42 °C inkübasyon önerilmektedir. Bu zenginleştirme öncesinde (selektif katkı ilavesi ve yükseltilmiş inkübasyon sıcaklığı), selektif katkı ilave edilmeden ve hedef bakterinin optimum gelişme sıcaklığı olan 37 °C'ta 4 saat süreli bir inkübasyon, zenginleştirme olarak değil ama canlandırma olarak değerlendirilmelidir.

## 02.04. *Salmonella* Analiz Örneği

Standart analizde 5 aşamalı bir uygulama vardır:

- Selektif olmayan besiyerinde ön zenginleştirme,
- Selektif besiyerinde zenginleştirme,
- Selektif katı besiyerine ekim,
- Şüpheli/ tipik kolonilerin biyokimyasal olarak tanımlanması,
- Biyokimyasal test sonuçlarına göre *Salmonella* olduğu kanısına varılan izolatlarda serolojik doğrulama.

Selektif olmayan ön zenginleştirmede Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS) besiyeri kullanılır. 25 g(mL) gıda örneği 225 mL TPS besiyerinde 37 °C'ta 16-20 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Gıdada *Salmonella* kontaminasyonu varsa, fekal kontaminasyonun da çok yoğun olması beklenir ve fekal kontaminantlar arasında *E. coli* gibi *Salmonella*'ya kıyasla olumsuz çevresel koşullara çok daha dirençli bakteriler de vardır. Bu refakatçi flora, selektif olmayan ön zenginleştirme sırasında çok hızlı bir şekilde gelişerek ortamda baskın hale gelir.

Bu durum, *Salmonella* analizini hiç etkilemez. Amaç, sadece hasar görmüş olması muhtemel olan *Salmonella*'nın aktif duruma gelmesidir.

TPS besiyeri, tampon içerdiği için refakatçi flora tarafından oluşturulan asitlikten etkilenmez. Bu besiyeri ISO 6579'e uygun olarak standart analizi içinde kullanılır.

ABD kaynaklı *Salmonella* analiz yöntemlerinde ise TPS yanında Laktoz Broth besiyeri de kullanılır. Ancak;

-*Salmonella*, laktoz negatif bir bakteridir oysa refakatçi florada bulunması olası *E. coli* laktoz pozitifdir. Dolayısı ile bu besiyerinde *E. coli*, enerji kaynağını kolayca laktozdan sağlarken, *Salmonella* daha zor olarak enerji kaynağını besiyerindeki peptondan sağlayabilmektedir.

-Besiyerinde tampon olmadığı için, refakatçi floranın laktozdan oluşturacağı asit, duyarlı bir bakteri olan *Salmonella*'nın aktif formunu dahi strese sokabilir.

Dolayısı ile bu besiyerinde uzun inkübasyon süresi, sahte negatif sonuç almak için yeterli koşulları sağlamaktadır.

Selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasını selektif zenginleştirme izler. Bu amaçla geliştirilmiş çok sayıda selektif zenginleştirme besiyeri varsa da ISO 6579'e uygun olarak standart analizde kullanılan 2 selektif besiyeri vardır: Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTTn) Broth ve Rappaport-Vassiliadis (RVS) Broth. Selektif olmayan ön zenginleştirme kültüründen bu besiyerlerine ekim yapılır, tüpler 24 saat süre ile inkübasyona bırakılır. Buradaki önemli bir ayrıntı; RVS Broth besiyerinin 41,5 °C'ta inkübe edilmesidir. Burada yüksek inkübasyon sıcaklığı, refakatçi floraya bir baskılama yapar.

Daha sonra her 2 selektif zenginleştirme besiyerinden 2'şer adet selektif katı besiyerine sürme yapılır. Bu besiyerlerinden birisi XLD Agar olmak zorundadır. Diğeri kullanıcının tercihine bırakılır.

Ekimi yapılmış 4 selektif katı besiyerinin herhangi birinde 1 adet *Salmonella* varlığının tespiti koşulunda sonuç "var" olarak verilir.

Gıda analizlerinden çok farklı olmak üzere *Salmonella* enfeksiyonuna maruz kaldığı düşünülen bir kişinin dışkısı, doğrudan selektif katı besiyerine sürülerek tipik koloni elde edilmeye çalışılır. Burada, tüm zenginleştirme aşamalarının hastanın bağırsağında tamamlanmış olduğuna dikkat çekilmektedir. Dolayısı ile dışkı örneği, doğrudan selektif katı besiyerine sürülmektedir.

## 02.05. *E. coli* O157:H7 Analiz Örneği

*E. coli* O157:H7 analizinde doğrudan selektif zenginleştirme ve katı besiyerine ekim ile biyokimyasal/ serolojik tanımlama işlemleri vardır. Bu bakterinin analizinde selektif olmayan ön zenginleştirme aşamasına gerek duyulmaz.

*Salmonella*'tan farklı olarak *E. coli* O157:H7, çevresel stres faktörlerine daha dirençlidir. Ayrıca; stres altında olsa bile kullanılan selektif inhibitörlere olan direnci (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) refakatçi flora ile kıyaslandığında yeterlidir.

Bu durumda analizin doğrudan selektif zenginleştirme ile başlamasında bir sakınca yoktur.

### 02.06. *Listeria monocytogenes* Analiz Örneği

Bu analizde, 2 aşamalı bir zenginleştirme vardır ama *Salmonella* analizinde olduğu gibi selektif olmayan bir ön zenginleştirme değil, daha farklı bir uygulama vardır.

İlk aşamada selektif inhibitörler, zenginleştirme besiyeri bileşimine asıl zenginleştirme besiyeri bileşimindeki derişimin yarısı kadar olacak şekilde katılır (1/2 Fraser Broth). Buradan yapılan yarı selektif ön zenginleştirme sonrasında selektif zenginleştirme ve oradan katı besiyerine ekim aşaması vardır. ISO 11290, Fraser Broth zenginleştirme aşamalarını tanımlamaktadır. Selektif katı besiyeri olarak biri kromojenik karakterli "Ottoviani and Agosti Agar", diğeri kullanıcının tercihine bırakılmış bir diğere selektif katı besiyeri kullanılır.

*Listeria monocytogenes* analizinde, diğere patojenlerin analizinden farklı olmak üzere bir diğere önemli uygulama, yarı selektif zenginleştirme aşaması sonunda da yukarıda adı geçen 2 selektif katı besiyerine ekimdir. Ayrıca selektif zenginleştirme aşamasında inkübasyonun 24 ve 48. saatlerinde adı geçen 2 selektif katı besiyerine ekim vardır.

*Salmonella* analizinde 1 adet selektif olmayan ön zenginleştirme besiyerinden 2 adet selektif zenginleştirme sıvı besiyeri, 2 selektif zenginleştirme ve 4 adet selektif katı besiyeri; *E. coli* O157:H7 analizinde 1 selektif zenginleştirme besiyeri ve 1 selektif katı besiyeri vardır.

*Listeria monocytogenes* analizinde ise, durum çok farklıdır. Yarı selektif zenginleştirme sonunda 2, selektif zenginleştirme 24. saat inkübasyonu sonrasında 2 ve selektif zenginleştirme 48. saat inkübasyonu sonrasında 2 olmak üzere toplam 6 selektif katı besiyerine ekim yapılır. Bu 6 selektif katı besiyerinin herhangi birisinden *Listeria monocytogenes* izole edilirse analiz edilen örnekte *Listeria monocytogenes* olduğuna karar verilir ve parti reddedilir.

*Listeria monocytogenes* analizi, uluslararası kabule göre bu denli tehlikeli bir bakteri olması ile ilişkilendirilerek, diğere gıda kaynaklı patojenlere kıyasla çok daha duyarlı var/ yok analizi ile kontrol edilirken, öte yandan gıdanın hiçbir zenginleştirme aşamasından geçmeden doğrudan selektif katı besiyerine ekimi ile 100 KOB/g düzeyinde bulunmasına izin verilmesi Risk Analizi genel kuralları ile asla bağdaşmamaktadır.

Canlandırma işlemi için tipik örneklerden birisi de *Listeria monocytogenes* analizidir. Analize başlarken önce 25 g(mL) gıda, selektif inhibitör katkısı henüz eklenmemiş ve asıl olarak genel besiyeri bileşiminde olan 225 ml Fraser Broth bazal besiyerine eklenir. Bu şekilde 4 saat inkübe edilir. Hasar görmüş (stres altında) olması beklenen *Listeria monocytogenes*'in, bu aşamada hasarını tam olarak gidermesi beklenir.

Bu süre sonunda yarı selektif konsantrasyonda olmak üzere selektif inhibitörler bazal besiyerine eklenir ve inkübasyona devam edilir.

Görüldüğü gibi burada selektif olmayan bir ön zenginleştirme yoktur. Sadece hasar görmüş olması muhtemel olan hedef bakterinin kendini toparlaması (stresten kurtulması) için bir bekleme süresidir.

## 02.07. Canlandırma/ Selektif olmayan Ön Zenginleştirme Farkı

Yukarıda verilen bilgilere göre; selektif olmayan bir besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklığında 4 saat bekletme: canlandırma, ama yine selektif olmayan bir besiyerinde ve uygun inkübasyon sıcaklığında 16-24 saat süreli inkübasyon: ön zenginleştirme olarak tanımlanmaktadır. Bu ikisi arasındaki fark, bakterinin genel olumsuz çevresel faktörlere karşı direnci/ duyarlılığı ve bakterinin özel olumsuz çevresel faktörlere karşı özel direnci/ duyarlılığıdır.

Buna göre klinik mikrobiyoloji uygulamasında olduğu gibi dışkı, *Salmonella* açısından doğrudan selektif katı besiyerine sürülebilir. *E. coli* O157:H7 analizinde standartlarda doğrudan selektif besiyerinde zenginleştirme gösterilir ancak gerekirse (laboratuvar mühendisi şüpheye düşerse), analize canlandırma ya da selektif olmayan ön zenginleştirme ile başlanabilir.

### Yararlanılan ve Okunması Önerilen Kaynaklar

Andrews WH, Hammack TS. 2003. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. in; Bacteriological Analytical Manual; BAM.

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>

Anon 1984. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 6<sup>th</sup> Ed. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by Association of Official Analytical Chemist (AOAC), Virginia. 31 Bölüm + 3 Ek.

Anon 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. Eds. C Bell, P. Neaves, AP Williams. Blacwell Science 324 s

Anon 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: AK Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.

Anon 2010. Mikrobiyoloji El Kitabı (Hızlı Erişim). Editörler: AK Halkman, ÖE Sağdaş, Arkadaş Matbaacılık, Ankara, 234 s.

Benson HJ. 1998. Microbiological Applications; Laboratory Manual in General Microbiology. 7th Edition. Complete version. McGraw-Hill, Quebecor Printing Book Group/ Dubuque IA, USA. 468 p

Frazier WC, Marth EH, Deibel RH. 1968. Laboratory Manual For Food Microbiology, 4<sup>th</sup> edition. Burgess Publ Comp, Minneapolis, 122 s.

Halkman AK. 2005. Besiyerleri. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: AK Halkman. S 10-56. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.

Halkman AK. 2005. Mikroorganizma Analiz Yöntemleri. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: AK Halkman. S 89-124. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.

Harrigan WF. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. Academic Press, California. 532 p.

MacFaddin JF. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA, 912 p

Özçelik S. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulama Kılavuzu. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın no 7. 135 s.

Sekin Y, Karagözlü N. 2004. Gıda Mikrobiyolojisi; Gıda Endüstrisi için Temel Esaslar ve Uygulamalar. 4. Basımdan Çeviri. Yazan Klaus Pichhardt. Literatür Yayınları no 115. İstanbul, 358 s.

Topal, Ş. R. 2004. Hücre Kültür Teknikleri I. Cemturan Ofset, İstanbul, 231 s.

Topal, Ş. R. 2004. Hücre Kültür Teknikleri II. Cemturan Ofset, İstanbul, 190 s.

Ünlütürk A, Turantaş F. 2002. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 2. Baskı. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 186 s.