

GIDA MADDELERİNDE *E.coli* SAYIMINDA MUG'LU BESİYERİ KULLANIMI¹**MUG BASED MEDIUM FOR ENUMERATING *E.coli* IN FOODS**

Melihe R.NOVEIR, A.Kadir HALKMAN, Hilal B.DOĞAN

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, ANKARA

ÖZET: Bu çalışmada 10 farklı gıdanın 4'er örneğinde MUG esaslı besiyerleri olan VRB Agar + MUG ve Lauril Sülfat Broth + MUG kullanılmıştır. Katı besiyerinde yayma yöntemi ile *E.coli* sayısı, damlatma yöntemi ile *E.coli* titresi belirlenmiş, sıvı besiyerlerinde 5 tüp ve 3 tüp ile EMS yöntemine göre *E.coli* sayısı saptanmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre fluorejenik yöntemin kolay ve çabuk bir yöntem olduğu, EMS yönteminde her diyüsyondan 3 tüpe ekim yapmanın yeterli olduğu damlatma yönteminin tatmin edici sonuçlar verdiği görülmüştür.

SUMMARY: 40 samples of 10 different food were investigated for *E.coli* by MUG based media, VRB Agar + MUG and Lauril Sulphate Broth + MUG. Standard cultural enumeration technique and dropping technique for determining *E.coli* titer were applied on VRB Agar + MUG. 5 and 3 tubes methods for MPN technique was also investigated.

Results showed that fluoregenic determination of *E.coli* is a easy and quick method. Inoculation of 3 tubes from each dilution is adequate at MPN enumerations. Dropping method for *E.coli* titer determination gave satisfactory results.

GİRİŞ

Gıda maddelerinde kalitenin yükseltilebilmesi için öncelikle kalite kriterlerinin doğru bir şekilde saptanması ve mevcut kalite ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılması gereklidir. Ancak bu aşamadan sonra kalitenin yükseltilmesine yönelik çalışmalar yapılabilir. Benzer şekilde geleneksel gıdalarımızın envanter çalışmaları yapılırken kalite ölçümleri doğru yöntemler ile belirlenmelidir.

Gelişen bilim ve teknoloji çerçevesinde bir yandan gıdaların daha besleyici, daha uzun ömürlü, doğala daha yakın, üretimi ve pazarlamasının daha kolay olmasını amaçlayan teknolojiler geliştirilirken, diğer yandan gıdaya yönelik analizlerin daha çabuk ve daha duyarlı olan yöntemlerle ölçülmesine çalışılmaktadır.

Bugün için gıda mikrobiyolojisi alanında en çok tartışılan konulardan birisi de, büyük çoğunluğu son 6-7 yıl içinde ortaya konulmuş olan yeni yöntemlerdir. Analiz yöntemleri konusunda Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO), Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC) gibi önemli kuruluşların farklı yöntemler göstermeleri, uygulayıcıların kişisel deneyimleri, yöntemlerin maliyetleri gibi faktörler sonucu, gerek Türkiye'de gerek dış ülkelerde uygulayıcı ve araştırmacılar arasında yöntem birlikteliği olmamaktadır.

Gıda mikrobiyolojisinde üzerinde en çok çalışılan mikroorganizma grubu tartışmasız bir şekilde *Enterobacteriaceae* familyasının üyeleri olan *E.coli* ve *Salmonella*'dır. Bu bakterilerin gıda maddelerinde bulunmalarına izin verilmez.

Özellikle *E.coli*'nin dünya üzerinde en çok çalışılan canlı olması, hemen hemen tüm gelişme parametrelerinin bilinmesi, bakterinin çabuk gelişmesi vb. nedenler ile *E.coli* fekal kirlenmenin göstergesi olarak pek çok gıdada aranır.

Bu çalışmanın amacı *E.coli* aranmasında yaklaşık 10 yıldan beri uygulanmakta olan fluorejenik yöntemin ülkemiz koşullarında denenmesidir.

LİTERATÜR ÖZETİ

E. coli, bütün dünyada üzerinde en çok çalışılan canlı türlerinden biridir. İlk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından izole edilmiştir. Önemi, sadece gıda mikrobiyolojisinde lokal kirliliğin belirlenmesindeki kullanımından değil, bundan daha önemli olarak genetik yapısı en iyi bilinen canlı türü olmasından dolayı genetik araştırmalarda kullanılmasından gelmektedir (HOFSTRA ve VELD, 1988).

¹ Bu araştırma M.R.NOVEIR'in master tezinin bir bölümünden alınmıştır (Ankara Üniversitesi Araştırma fonu 92-11-12-01 nolu proje)

Başta gıda maddeleri olmak üzere insanların kullanımına açık olan materyalde *E.coli* bulunmasına izin verilmez. Bunun başlıca nedeni, *E.coli*'nin patojenite gösterebileceğinden ziyade, bu bakterinin doğrudan barsak kökenli olması ve bir yerde *E.coli* bulunur ise orada yine barsak kökenli *Salmoneella*, *Shigella* gibi primer patojenlerin olabileceğinin göstergesidir. Bir diğer deyiş ile *E.coli*, fekal kirlilik indikatörü olarak aranır.

Bu çerçevede *E.coli* aranmasına ve sayılmasına yönelik çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler en muhtemel sayım tekniği ile yapılan sayımlar, katı besiyeri kullanılan yöntemler, membran filtrasyon tekniği ve hızlı sayım yöntemleri olarak gruplandırılabilir (GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988).

En Muhtemel Sayı Tekniği

Tüp dilüsyon sayım yönteminin geliştirilmiş şekli olan EMS tekniğinde sayım sonuçları istatistik olarak hesaplanmış çizelgelerden bulunur. Katı besiyerinde bir canlı hücrenin 1 koloni oluşturması üzerinden sayım yapılırken EMS yönteminde inokülasyon yapılan tüpe en az 1 canlı hücrenin geçmesi esas alınır. Katı besiyerinde yapılan sayımlar matematik bazda daha doğru sonuç verirken EMS yönteminin pekçok yasal kuruluş tarafından analiz yöntemleri olarak verilmesindeki neden EMS'nin pekçok avantajı olmasıdır (ANONYMOUS, 1965; BANWART, 1983; COSTILOW, 1981; GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988).

Bu üstünlükleri nedeni ile EMS tekniği yasal kontrol yöntemleri arasında yer almıştır. Bununla beraber EMS tekniğinde uygulanış konusunda yine pek çok farklı görüşler vardır. EMS tekniğinde üzerinde en çok durulan konu her dilüsyondan kaç tüpe ekim yapılacağıdır. Kuşkusuz ekim yapılan tüplerin sayısı arttıkça daha doğru bir sayım sonucu alınacaktır. Ancak bu kez de maliyet, zaman, emek unsurları olumsuzluk yaratmaktadır. EMS yönteminde her dilüsyondan 3; 5; 10 tüpe ekim yapılan sistemler ve bunlara uygun EMS çizelgeleri geliştirilmiştir. Bunların yanında ardışık 2 dilüsyonun 1.sinden 2, 2.sinden 5 tüpe ekim yapılan modeller de bulunmaktadır (GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988).

Amerikan Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC)'nın koliform grup/*E.coli* aranma yöntemi EMS tekniğidir. AOAC'ya göre materyal hazırlanıp dilüsyonları yapıldıktan sonra ardışık 3 dilüsyondan 3'er Lauril Sülfat broth besiyerine 1'er ml ekim yapılmakta, 35°C'da 48 saate kadar çıkan inkübasyondan sonra (+) sonuç veren tüpler muhtemel koliform grup olarak değerlendirilmekte, bu tüplerden Brilliant Green Bile Broth tüplerine ve EC Broth tüplerine ekim yapılmakta 35°C'da 48 saat inkübe edilen Brilliant Green Laktöz Bile Broth tüplerindeki (+) sonuçlar koliform grup olarak doğrulanmakta ve değerlendirilmekte, 45,5°C'da 48 saate kadar inkübe edilen EC Broth besiyerindeki (+) sonuçlar ise *E.coli* olarak sayılmakta, bu kültürlerden Eosin Metilen Blue Agar besiyerine sürme yapılarak, ayrıca gram boyama ve IMViC testleri uygulanarak *E.coli* doğrulanmaktadır (ANONYMOUS, 1984).

Amerikan Mikrobiyoloji Derneği (ASM) ise EMS yönteminde her dilüsyondan 10'ar tüpe ekim yapılmasını önermektedir (COSTILOW, 1988).

Türk Standartları Enstitüsü (ANONYMOUS, 1988b) ile Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü (ANONYMOUS, 1988a) her dilüsyondan 3'er tüpe ekim yapılmasını yeterli görürlerken Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri adlı kitapta (GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988) her dilüsyondan 5'er tüpe ekim yapılması gerektiğini belirtmektedirler.

Çeşitli gıdalarda *E.coli* sayım yöntemlerinin kıyaslandığı bir çalışmada (ÖZBAŞ, 1987) EMS yönteminde her dilüsyondan 3'er tüpe ekim yapılmıştır.

İlk kez FENG ve HARTMAN (1982) tarafından ortaya konulan bir teknik ise son yıllarda *E.coli* sayım yöntemlerine yeni bir yaklaşım getirmiştir. Bu teknik ile 4-methylumbelliferone glucuronide (MUG) *E.coli* tarafından oluşturulan glucuronidase ile fluorojenik bir ürüne parçalanmakta, bu fluorojenik bileşik ise UV ışığında fluoresans vermektedir. Bu ilk çalışmada MUG tekniği EMS tekniği ile sayımda, membran filtrasyon tekniğinde ve katı besiyerlerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu araştırmacılar Lauril Triptoz Broth + MUG ortamların Violet Red Bile Agar + MUG'dan hasar görmüş *E.coli* için daha iyi sonuç verdiğini, yüksek sayıda rekabetçi bakteri olmasına karşın az sayıda bulunan *E.coli*'nin bu yöntemle belirlenebildiğini, MUG ilave edilmiş membran filtrasyon besiyerlerinde ve Violet Red Bile Agar besiyerinde 20 saat sonra *E.coli* kolonilerinin ayırt edilebildiği ve selektif olmayan ortamlarda dahi *E.coli*'nin rahatlıkla belirlendiğini göstermişlerdir.

Bu ilk çalışmadan sonra EMS tekniğinde kullanılan sıvı besiyerlerine MUG ilave edilerek kıyaslamalı çalışmalar yapılmıştır.

ROBISON (1984) 270 gıda örneğinde Lauril Sülfat Broth ve Lauril Sülfat Broth+MUG besiyerlerini EMS tekniği ile *E.coli* aranmasında denemiş, sonuçta iki yöntem arasında % 94,8 uyum bulmuştur. Araştırmacı MUG tekniğinde % 4,8 sahte (+) sonuç alırken, sahte (-) olmadığına değinmiş, MUG tekniğinde fluoresans kontrolünün yeterli olduğunu, ilave biyokimyasal testlere gerek olmadığını belirtmiştir.

MOBERG (1985) ise Lauril Sülfat Broth ile Lauril Triptoz Broth+MUG besiyerlerini 1400 gıda örneğinde *E.coli* sayımı için karşılaştırmış, sonuçta MUG'lu besiyerlerinde MUG'suzlara göre daha fazla *E.coli* saymış, sahte (+) reaksiyonun % 1,4 gibi çok az olduğunu sahte (-) sonuç alınmadığını, sahte (+) sonuçların β -glucuronidase üreten stafilokoklardan kaynaklandığını belirtmiş ve MUG'lu besiyerinde alınan sonucun yeterli olduğunu, ilave testlere gerek olmadığını böylece analiz süresinden 2 gün kazanıldığını göstermiştir.

25 istiridye örneğinde *E.coli* sayımına yönelik bir araştırmada EC Broth+MUG besiyerinin Lauril Sülfat+MUG'dan daha iyi sonuç verdiği, MUG yönteminin klasik EMS yöntemine göre 4 gün kazandırdığı belirtilmiştir (KOBURGER ve MILLER, 1985)

Bir başka araştırmada ise 762 klinik ve 228 çevre suşu ile çalışılmış, *E.coli* suşlarının % 95'inden fazlası β -glucuronidase (β -GUR) pozitif bulunmuş, bunlara ilaveten 31 *Shigella sonnei*, 10 *Enterobacter cloacae*, 8 *Enterobacter aerogenes*, 9 *Citrobacter freundii* ve 1 *Salmonella* enteritidis klinik izolatu ile 2 *Enterobacter cloacae* ve 1 *Citrobacter freundii* çevre izolatu (+) sonuç vermiştir. β -GUR testi ile geleneksel identifikasyon testi 233 Laktöz (+) enterobakter suşunda kıyaslanmış, 190 adedi *E.coli* olmak üzere 223 suşta her iki yöntem aynı sonucu vermiştir. Farklı sonuç veren 10 suşun 9 adedi β -GUR (-) *E.coli*, 1 adedi β -GUR (+) *Citrobacter freundii*'dir. Tüm suşlar içinde β -GUR (+) ve indol (+) olan tek türün *E.coli* olduğu saptanmıştır (PEREZ ve ark., 1986).

Farklı 101 gıda örneğinde AOAC tarafından gösterilen EMS tekniği ile *E.coli* sayım yöntemi aynı teknik ile ancak Lauril Triptoz Broth+MUG kullanılarak kıyaslanmış, Lauril Triptoz Broth besiyerlerinde % 81, Lauril Triptoz+MUG besiyerlerinde ise % 91 (+) sonuç alınmıştır. MUG yönteminin analiz süresini 3 gün kadar kısalttığı, sahte (+) ve (-) sonuçlara karşın MUG tekniğinin çok daha duyarlı ve çabuk bir yöntem olduğu belirtilmiştir (SINGH ve NG, 1986).

Çeşitli gıda maddelerine düşük, orta ve yüksek düzeyde (15-300 adet/gr) *E.coli* ilave edilip geri alma denemesi yapılan bir çalışmada her gıdadan her ilave konsantrasyonu için 12 örnek üzerinde analiz yapılmış ve yine AOAC tarafından gösterilen EMS tekniği ile Lauril Triptoz Broth+MUG tekniği kıyaslanmıştır. Sonuç olarak MUG tekniğinin analiz süresi, işçiliği ve besiyeri kullanımını azalttığı bulunmuştur (PETERSON ve ark., 1987).

RIPPEY ve ark. (1987) tarafından Molluscan Shellfish'de *E.coli* sayımına yönelik olarak yapılan bir çalışmada EC Broth besiyerlerine MUG ilave edilmiş ve EMS yöntemiyle sayım yapılmıştır. Kullanılan 1151 EC Broth tüpünde % 11 düzeyinde sahte (-) reaksiyon alınmıştır. 500'den fazla *E.coli* ve *E.coli* olmayan suş β -glucuronidase aktivitesi bakımından teste alınmış, *E.coli*'lerin % 95'i (+) sonuç verirken sadece 1 *Shigella* suşu (+) sonuç vermiştir.

MUG üzerinde yapılan ve MUG tekniğinin geleneksel *E.coli* sayım yönteminden daha iyi sonuçlar verdiğini gösteren araştırmalara Amerikan Resmî Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC) örgütü duyarlı kalmamış ve kendi yasal yöntemlerini 5 gıda maddesinde Lauril sülfat+MUG besiyeri kullanarak kıyaslamışlardır. 17 araştırmacının ortaklaşa katıldığı bu kollaboratif çalışma sonucunda MUG tekniğinin yasal AOAC yöntemine en azından eşdeğer ya da MUG tekniğinin daha iyi olduğu yargısına varılmıştır (MOBERG ve ark., 1988).

ANDREWS ve ark. (1987) Lauril Sülfat Broth ve EC Broth tüplerine farklı konsantrasyonlarda MUG ilave ederek AOAC'nın yasal EMS yöntemiyle kıyaslamalı olarak çeşitli gıdalarda *E.coli* saymışlardır. Araştırma sonuçlarına göre 25 $\mu\text{g/ml}$ MUG konsantrasyonunun pozitif fluoresans reaksiyonunu azalttığı, 50 $\mu\text{g/ml}$ ve 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda ise sonuçların tatmin edici olduğunu göstermişlerdir.

MUG ve özel bir indikatör boya içeren petrifilm yöntemi ile klasik EMS ve Violet Red Bile Agar besiyerinin *E.coli* sayımında karşılaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada süpermarketlerden sağlanan toplam 309 adet peynir, donmuş sebze ve kümes hayvanları çiğ eti kullanılmıştır. EMS gerek FDA

tarafından gösterilen 3 tıplı ekim yontemi, gerek 9 tıplı ekim yontemi ile denenmiş, sonuçta petrifilm *E.coli* sayım yonteminin EMS yontemine eşit ya da ondan daha iyi olduğu, Violet Red Bile Agar sayımlarına ise eşdeğer olduğu bulunmuştur. Dışuk sayıda *E.coli* içeren örneklerde bile 9 tıplı EMS yontemine göre petrifilm yonteminin daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (MATNER ve ark., 1990).

Bugün, EMS tekniğinde kullanılan MUG'lu sıvı besiyerleri ticari firmalar tarafından toz preparatlar olarak satılmaktadır. Kuşkusuz, bu besiyerlerinin başında Lauril Sulfat Broth gelmektedir (ANONYMOUS, 1991).

Katı Besiyeri Kullanımı

Pek çok kuruluş tarafından *E.coli* aranmasında yasal yontem olarak EMS tekniği gösterilir iken, özellikle izolasyon amaçlı sayım çalışmalarında katı besiyeri kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan katı besiyeri Violet Red Bile Agar'dır. Bu besiyerinde yayma, dökme ve dökme+2.tabaka yontemleri uygulanmaktadır. Geleneksel EMS yontemi ile katı besiyeri sayımlarının kıyaslandığı bir çalışmada her iki yontem arasında istatistik bakımdan önemli fark olmadığı bulunmuştur. Anderson ve Baird-Parker adlı araştırıcılar ise EMS yonteminin katı besiyeri kullanılanlara göre daha zahmetli ve sonuçların daha az güvenilir olduğunu belirtmişlerdir (ÖZBAŞ, 1987).

E.coli sayımında katı besiyeri olarak Triptik Soy Agar da kullanılmaktadır. Dökme plaka yontemi ile hazırlanan petri kutularına 35°C'da 2 saat inkubasyondan sonra besiyeri Violet Red Bile Agar ile kaplanmakta, inkübasyona 45,5°C'da 24 saat devam edilmektedir. Stres altında olmayan ve dondurularak strese uğratılan *E.coli* hücrelerinde katı besiyeri kullanılarak yapılan sayım kıyaslaması denemelerinde ise Triptik Soy Agar'ın üstünlüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada stres altındaki *E.coli* sayımında Violet Red Bile Agar besiyerinde alınan sonuçların Triptik Soy Agar besiyerinde alınanların % 4,3'üne kadar dıştüğü, besiyerlerinin 35°C'daki inkübasyonunun 45,5°C'a oranla daha dışuk geri alma sonucu verdiği gösterilmiştir (ÖZBAŞ, 1987).

Plate Count-Monensin-KCl (PMK) Agar adlı bir katı besiyerine gram (-) bakteriler ve *E.coli* sayımında kullanılması üzerine yapılan bir çalışmada bu besiyerinden elde edilen 535 izolatın % 96'sının gram (-) olduğu, selektif olmayan besiyerlerinden izole edilenlerde ise bu oranın % 68'e dıştüğü, dondurulmuş karışık sebzeerde *E.coli* aranmasında flavobakterilerin varlığı ve sahte (+) sonuç vermeleri nedeniyle MUG'un katı besiyeri bünyesine girmemesi gerektiği belirtilmiştir (PETZEL ve HARTMAN, 1985).

MUG'un katı besiyerlerinde kullanımına yönelik olarak yapılan bir çalışmada Pepton Tergitol Glucuronide Agar, Tripton Bile Agar, Triptik Soy Agar, Violet Red Bile Agar besiyerlerinde *E.coli* sayılmış, sonuçta MUG'lu besiyeri olan pepton Tergitol Glucuronide Agar besiyerinin hem güvenilir sonuçlara sahip olduğu hem de kullanım kolaylığı olduğu belirtilmiştir (DAMARE ve ark., 1985).

Gıdalarda, *E.coli* sayım yontemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada çiğ süt ve dondurulmuş et materyal olarak kullanılmış, sayımlar standart EMS yontemi, Modifiye Direkt Plaka yontemi, Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar (st tabaka) yontemi, Violet Red Bile Agar/Violet Red Bile Agar (st tabaka) yontemi ile araştırıcı tarafından tasarlanan Modifiye Violet Red Bile Agar yontemi ve Modifiye EMS yontemi ile yapılmış, süt örneklerindeki sayımların yontemlere göre istatistik bakımdan önemli olmadığı, et örneklerinde ise Modifiye Direkt Plaka yontemi, Standart EMS yontemi ve Modifiye EMS yonteminin diğerlerine göre daha yüksek *E.coli* sayım sonucu verdiği belirlenmiştir. Stres altında olan ve olmayan *E.coli* formlarının sayım sonuçlarından yararlanılarak her bir yontemin geri kazanma oranları referans Triptik Soy Agar'daki değerlere göre hesaplanmış ve Modifiye Direkt Plaka yontemleri ile Triptik Soy Agar/Violet Red Bile Agar yonteminin diğer yontemlere oranla daha yüksek bağlı geri kazanma oranları verdiği bulunmuştur (ÖZBAŞ, 1987).

MUG'lu besiyerleri bugün besiyeri üreten ticari firmalar tarafından pazarlanmaktadır (ANONYMOUS, 1991).

Membran Filtre Tekniği

Hidrofobik grid membran filitre ilk kez 1974 yılında Sharpe ve Michaud tarafından ortaya konulmuştur. Bu teknikte mikroorganizmalar bir membran filitre üzerinde tutulmakta, uygun bir katı

besiyerine yerleştirilen filtrede mikroorganizmalar koloni oluşturmakta ve koloni sayısından materyaldeki mikroorganizma sayısı hesaplanmaktadır. Gıdalarda membran filtrasyon tekniği ile *E.coli* sayımı AOAC tarafından yasal analiz yöntemi olarak gösterilmektedir (ANONYMOUS, 1984; ENTIS, 1983).

Membran filtrasyon tekniğinin çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. Bu üstünlükler arasında az sayıda mikroorganizmanın bulunması durumunda bile belirleme imkanı, inkübasyon sonrası filtrelerin kurutularak saklanabilmesi ilk akla gelenlerdir. Filtreler ya klasik katı besiyerleri üzerinde ya da ticari firmalar tarafından geliştirilmiş özel besi ortamları üzerinde inkübasyona bırakılmaktadır (ANONYMOUS c, GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988).

Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'daki 14 laboratuvarın kollaboratif katılımı ile gerçekleştirilmiş 12 gıda örneğinde membran filtrasyon tekniği ile koliform grup bakteri sayımı yapılmış bir araştırma sonucunda membran filtrasyon tekniği AOAC tarafından resmi yöntem olarak benimsenmiştir (ENTIS, 1983).

Kümes hayvanları etinden 10 örnek ile yapılan ve toplam koliform, fekal koliform ve *E.coli*'nin membran filtrasyon yöntemi ile sayımının yapıldığı bir başka çalışmada izole edilen kolonilerde doğrulama oranının toplam koliformda % 100, fekal koliformda % 98, *E.coli*'de % 97-99 olduğu bulunmuştur (ENTIS, 1984).

MUG, membran filtrasyon tekniğinde kullanılan besiyerlerinde de denenmiştir. MUG ilave edilmiş Tamponlanmış Tripton Bile Agar besiyerinin 44,5°C'da *E.coli* sayımına elverişlilik düzeyinin kullanılan membran filtre tipine bağlı olduğu gösterilmiştir (DAMARE, 1985; FARBER, 1986).

E.coli İdentifikasyonu

E.coli'nin doğrulanması IMViC testleri ile yapılmaktadır (I: İndol testi; M: Metil red testi; V: Voges-Proskauer Testi; C: Sitrat testi). IMViC testi hemen tüm yasal kontrol örgütleri tarafından *E.coli* doğrulama testleri olarak gösterilmektedir (ANONYMOUS, 1984; ANONYMOUS, 1988 a; ANONYMOUS, 1988 b). IMViC testlerine ilaveten HOMoC testleri de yapılmaktadır (H: Hidrojen sülfür oluşum testi; O: Ornitin Dekarboksilaz testi; Mo: Hareketlilik; C: Sitrat Testi). Ayrıca glukoz, laktoz, mannit fermentasyon testleri, üreaz testi, KCN testi ve Fenil Deaminaz testi uygulanarak koliform grup içinde identifikasyon yapılabilir.

Norveç 3'lü tüp sistemi (BEKAR, 1990), enterobakterler için geliştirilmiş hazır ticari identifikasyon kitleri (ANONYMOUS a; ANONYMOUS b; HILL, 1983) yine bu amaçla kullanılmaktadır.

E.coli'nin hızlı identifikasyonu için MUG esaslı sistemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile bir koloninin *E.coli* olup olmadığı izolatin elde edildiği besiyerine göre değişmek üzere 30-120 dakika sürmektedir (ANONYMOUS, 1991).

MATERYAL VE METOT

Materyal

Tavuklu hazır sandviç, arnavut ciğeri, kıyma, kokoreç, domates-yumurta-maydanozlu sandviç (gobit), dondurma, kremalı pasta, çiğ krema, garnitür salata ve mayonezli rus salatası Ankara piyasasından sağlanmıştır. Her gıda maddesi için 4'er adet örnek toplanırken bunların düşük kalitede olduğu bilinen/tahmin edilen gıdalar olmasına dikkat edilmiştir.

Metot

Laboratuvara getirilen örnekler tamponlanmış peptonlu su (TPS) ile 1:9 oranında karıştırılmış, gerekli ise blenderde homojenize edilmiş ve buradan standart 1:9 dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonlardan Violet Red Bile Agar + MUG (VRBAM; Merck) ve Lauril Sülfat Broth + MUG (LSBM; Merck) besiyerlerine ekim yapılmıştır.

VRBAM besiyerinde yayma ve damlatma yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan besiyerlerine 0,1 ml (yayma yöntemi) ve 0,01 ml (damlatma yöntemi) ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında 366 nm dalga boyundaki UV lambası (Merck) ile fluoresans kontrolü yapılmıştır. Yayma yönteminde fluoresans veren koloniler doğrudan *E.coli* olarak sayılırken damlatma yönteminde damlatma yapılan yerdeki yoğun kolonizasyon içinde fluoresans verenlerin olup olmadığı kontrol edilmiş, bir diğer deyiş ile bu yöntemde *E.coli* sayılı değil *E.coli* titresi belirlenmiştir (GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988).

LSBM sıvı besiyerlerinde ise En Muhtemel Sayı Yöntemiyle sayım yapılmıştır. Bu amaçla her dilüsyondan 5'er tüpe ekim yapılmış, inkübasyondan sonra gaz oluşan tüplerde fluoresans kontrolü yapılmıştır. Sayımlar doğrudan 5 tüp üzerinden yapıldığı gibi tesadüf sayıları çerçevesinde 5 tüpten 3 adedi seçilmiş, böylece sanki her dilüsyondan 3 tüpe ekim yapılmış gibi 3 tüp üzerinden değerlendirme yapılmıştır. LSBM tüplerinde fluoresans verenlere ayrıca indol testi uygulanmıştır (ANONYMOUS, 1984; ANONYMOUS, 1991; GÜRGÜN ve HALKMAN, 1988).

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Materyal olarak kullanılan 10 çeşit gıda maddesinde bulunan *E.coli* sayıları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1'in incelenmesi ile analiz edilen gıdalar arasında en temizlerinin dondurma ve kremalı yaş pasta, en kirlisinin çiğ kıyma olduğu, doğrudan tüketilen gıdalar arasında en yüksek sayıda *E.coli*'ye garnitür salata örneklerinde rastlandığı görülmektedir.

Çizelge 1. Çeşitli Gıda Maddelerinde *E.coli* Sayısı (log adet/g)

BESİYERİ	Çiğ Krema				Mayonezli Rus salatası			
	1	2	3	4	1	2	3	4
VRBAM Yayma	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	3,079	3,000	<2,000	4,435
VRBAM Damlatma	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	2,699	2,699	<3,000	5,000
LSBM 5 Tüp	0,301	0,301	0,301	2,544	3,230	2,964	0,301	2,544
LSBM 3 Tüp	0,602	0,477	<0,477	2,380	2,968	2,968	0,602	2,663
BESİYERİ	Garnitür Salata				Çiğ Kıyma			
	1	2	3	4	1	2	3	4
VRBAM Yayma	2,778	2,477	4,267	2,000	4,942	4,881	3,061	4,217
VRBAM Damlatma	3,699	2,699	3,699	2,400	4,301	<3,000	2,699	4,000
LSBM 5 Tüp	2,732	2,114	3,964	1,362	4,663	4,964	3,146	4,544
LSBM 3 Tüp	3,041	2,380	3,663	1,362	4,875	5,041	3,176	4,663
BESİYERİ	Kokoreç				Dondurma			
	1	2	3	4	1	2	3	4
VRBAM Yayma	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000
VRBAM Damlatma	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000
LSBM 5 Tüp	1,114	1,519	<0,301	1,519	<0,301	<0,301	<0,301	<0,301
LSBM 3 Tüp	1,176	1,633	<0,477	1,362	<0,477	<0,477	<0,477	<0,477
BESİYERİ	Kremalı Yaş Pasta				Tavuklu Sandviç			
	1	2	3	4	1	2	3	4
VRBAM Yayma	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	3,954	2,000	2,000	<2,000
VRBAM Damlatma	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	2,699	<3,000	2,699	<3,000
LSBM 5 Tüp	<0,301	<0,301	<0,301	<0,301	1,362	2,964	1,519	0,699
LSBM 3 Tüp	<0,477	<0,477	<0,477	<0,477	1,362	3,380	1,633	0,602
BESİYERİ	Gobit				Arnavut Ciğeri			
	1	2	3	4	1	2	3	4
VRBAM Yayma	2,602	<2,000	4,929	<2,000	<2,000	<2,000	<2,000	4,398
VRBAM Damlatma	2,699	<3,000	5,000	<3,000	<3,000	<3,000	<3,000	4,699
LSBM 5 Tüp	2,114	0,301	3,041	1,362	2,114	1,973	0,301	4,207
LSBM 3 Tüp	1,968	0,602	3,633	1,362	1,954	2,079	0,602	>4,041

40 gıda örneğinin 34 adedinde 4 yöntemle yapılan sayım sonuçları birbirlerine yakın olarak alınmış iken, çiğ krema 4 nolu örnekte sıvı besiyerleri sayım sonuçları katı besiyerlerindekiilerden yüksek; mayonezli rus salatası 4 nolu örnekte katı besiyerlerindeki sayım sonuçları sıvı besiyerlerindekiilerden yüksek; çiğ kıyma 3 nolu örnekte damlatma yöndemindeki sayım sonucu diğerlerindekiilerden düşük; tavuklu sandviç 1 nolu örnekte katı besiyerlerindeki sayım sonuçları sıvı besiyerlerindekiilerden yüksek, tavuklu sandviç 2 nolu örnekte sıvı besiyerlerindeki sayım sonuçları katı besiyerlerindekiilerden yüksek ve gobit 3 nolu örnekte damlatma yöntemindeki sayım sonuçları diğerlerindekiilerden yüksek bulunmuştur.

Sayım sonuçlarının istatistiksel olarak incelenebileceği örneklerde yayma, 3 tüp ve 5 tüp yöntemleri arasındaki korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Buna göre VRBAM'da yayma yöntemi ile LSBM'da 3 tüp üzerinden yapılan değerlendirme arasında $r=0,66$ (16 örnek); VRBAM'da yayma yöntemi ile LSBM'da 5 tüp üzerinden yapılan değerlendirme arasında $r=0,68$ (17 örnek); LSBM'da 3 tüp ve 5 tüp üzerinden yapılan değerlendirmeler arasında $r=0,99$ (28 örnek) düzeyinde ilişki bulunmuştur. Damlatma yöntemi ile titre belirlendiği için istatistik analiz yapılmıştır.

VRBAM'daki değerler ile LSBM'daki değerler arasında yüksek bir korelasyon olduğu söylenemez iken LSBM'da 3 ve 5 tüp üzerinden yapılan sayım sonuçları arasında $r=0,99$ bulunması bu iki sayım sonucu arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde göstermektedir. Bu değerlendirmeden EMS yönteminde 5 tüp yerine 3 tüp kullanmanın yeterli olacağı, böylece analizde besiyeri maliyeti ve emeğin % 40 azaltılacağı tartışmasız bir şekilde görülmektedir.

Besiyerlerinin kıyaslanmasına yönelik çalışmalarda genel kanı "hangi besiyerinde daha yüksek sayım sonucu alındı ise o besiyerinin daha doğru sonucu verdiği" şeklindedir. Bu araştırmada sıvı ve katı besiyerleri arasında 40 örnekten 34'ünde benzer sonuçlar alınırken (% 85), 6 örnekte farklı sonuç alınmıştır. Ancak, yukarıda da belirtildiği gibi bunların kimilerinde sıvı besiyerleri, kimilerinde ise katı besiyerleri daha yüksek sonuçlar vermiştir. Genel olarak yaralanmış hücrelerin, sıvı besiyerinde katı besiyerlerine oranla daha iyi gelişebilmeleri nedeniyle EMS yöntemi katı besiyerinde sayımlara göre daha yüksek sayım sonuçları vermekle beraber bu araştırmada bu yargıyı doğrulayacak açık bulgular elde edilmemiştir.

Bu çalışmada elde edilen bir diğer önemli bulgu katı besiyerinde *E.coli* titresinin belirlenmesidir. Bu belirleme bir anlamda MUG kullanımı ile gerçekleştirilebilmiştir. Uygulamanın en önemli avantajı bir petri kutusunda 4 dilüsyondan 2'şer paralel ekimin rahatlıkla yapılabilmesi bir diğer deyiş ile analiz maliyetinin 8 misli azaltılabilmesidir. Yöntemin en önemli dezavantajı ise 10^2 adet/ml veya 10^3 adet/gr'dan daha az sayıdaki *E.coli* yükünün bu yöntemle tespit edilememesidir.

MUG'un kullanıldığı besiyerleri ile çalışmanın kolay ve çabuk bir yöntem olduğu bu araştırmada da saptanmıştır. Özellikle sıvı besiyerlerinde fluoresans veren tüm tüplerde indol (+) bulunması EMS yönteminde sahte (+) reaksiyon olmadığını göstermiştir.

MUG ilave edilmemiş VRB Agar ile Lauril Sülfat Broth besiyerlerinde *E.coli* sayım sonuçları ile MUG'lu besiyerlerinde sahte (+) ve sahte (-) sonuçların kontrolü bu çalışmanın yayına hazırlandığı tarihte henüz devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- ANDREWS, W.H., C.R. WILSON, P.L. POELMA 1987. Glucuronidase Assay in a Rapid MPN Determination for Recovery of *E. coli* from Selected Foods. J Assoc Off Anal Chem 70(1) 31-34.
- ANONYMOUS, 1965. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th edition. APHA, AWWA, WPCF Publication Office. American Public Health Association Inc, Newyork, 769 s.
- ANONYMOUS, 1984. Bacteriological Analytical Manual. 6th Edition. US Food and Drug Administration. Published and Distributed by Association of Official Analytical Chemist (AOAC), Virginia. 31 Bölüm Dondurma 3 Ek.
- ANONYMOUS 1988 a. Gıda Maddeleri Muayene ve Analiz Metodları. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Bursa 883 s.
- ANONYMOUS 1988 b. Mikrobiyoloji-Muhtemel *E. coli* Sayımı İçin Genel Kurallar; En Muhtemel Sayı Tekniği. Türk Standardları Enstitüsü TS 6063. Ankara, 11 s.
- ANONYMOUS 1991. Merck, Microbiology Manual. Darmstadt, 326 s.
- ANONYMOUS (a). API System Handbook. Vercieu, 42 s.
- ANONYMOUS (b). BBL Minitek System Handbook. Wieblingen.
- ANONYMOUS (c). Process Filtration. Sartorius. Publication no: F 0007 e 12/87. 128 s.
- BANWART, G.J., 1983. Basic Food Microbiology. Avi Publishing Comp. Westport, Connecticut, 781 s.

- BAUMGART, J. 1990. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag Hamburg, 477 s.
- BEKAR, M. 1990. *Enterobacteriaceae* Sınıfı Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri Seminer Notları. Etilik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Ankara. 49 s + ekler, teksir.
- COSTILOW, R.N. 1981. Growth. "Alınmıştır, Manual of Methods for General Bacteriology, Ed P. Gerharat", American Society for Microbiology, Washington DC, 524 s.
- DAMARE, J.M., D.F. CAMPBELL, R.W. JOHNSTON 1985. Simplified Direct Plating Method for Enhanced Recovery of *E. coli* in Food. J Food Sci 50: 1736-1737; 1746.
- ENTIS, P. 1983. Enumeration of Coliform in Nonfat Dry Milk and Canned Custard by Hydrophobic Grid Membrane Filter Method: Collaborative Study. J. Assoc Off Anal Chem AOAC 66(4) 897-904.
- ENTIS, P. 1984. Enumeration of Total Coliforms, Fecal Coliforms, and *Escherichia coli* in Foods by Hydrophobic Grid Membrane Filter: Supplementary Report. J. Assoc Off Anal Chem AOAC 67(4) 811-815.
- FARBER, J.M. 1986. Potential Use of Membrane Filters and a Fluorogenic Reagent-Based Solid Medium for the Enumeration of *E. coli* in Foods. Can Inst Food Sci Tech J 19(1) 34-37.
- FENG, P.C.S., P.A. HARTMAN 1982. Fluorogenic Assays for Immediate Confirmation of *Escherichia coli*. Appl Envr Micr 43(6) 1320-1329.
- GÜRGÜN, V., A.K. HALKMAN 1988. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no: 7. San Matbaası. Ankara, 146 s.
- HILL, L.R. 1983. Identification of *Enterobacteriaceae*: Conventional and Kit Systems. UNESCO/UNEP/ICRO Regional Training Course Ders Notları. Basılmamış.
- HOFSTRA, H., J.H.J. HUISINNT VELD 1988. Methods for the Detection and Isolation of *E. coli* Including Pathogenic Strains. J Appl Bact Sym Suppl 1988: 197-212.
- KOBURGER, J.A., M.L. MILLER 1985. Evaluation of a Fluorogenic MPN Procedure for Determining *Escherichia coli* in Oysters. J Food Prot 48(3) 244-245.
- MATNER, R.R., T.L. FOX, D.E. MCIVER, M.S. CURIALE 1990. Efficacy of Petrifilm *E. coli* Count Plates for *E. coli* and Coliform Enumeration. J Food Prot 53(2) 145-150.
- MOBERG, L.J. 1985. Fluorogenic Assay for Rapid Detection of *Escherichia coli* in Food. Appl Envr Micr 50(6) 1383-1387.
- MOBERG, L.J., M.K. WAGNER, L.A. KELLEN 1988. Fluorogenic Assay for Rapid Detection of *Escherichia coli* in Chilled and Frozen Foods: Collaborative Study. J Assoc Off Anal Chem. AOAC 71(3) 589-602.
- ÖZBAŞ, Y. 1987. Çeşitli Gıdalarda *Escherichia coli* Sayımında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması Üzerinde Bir Araştırma. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara, basılmamış 145 s.
- PEREZ, J.L., C.I. BERROCAL, L. BERROCAL, 1986. Evaluation of a Commercial β -glucuronidase Test for the Rapid and Economical Identification of *Escherichia coli*. J Appl Bact 61(5) 541-545.
- PETERSON, E.H., M.L. NIERMAN, R.A. RUDE, J.T. PEELER 1987. Comparison of AOAC Method and Fluorogenic (MUG) Assay for Enumerating *E. coli* in Foods. J Food Sci. 52(2) 409-410.
- PETZEL, J.P., P.A. HARTMAN. 1985. Monensin Based Medium for Determination of Total Gram Negative Bacteria and *Escherichia coli*. Appl Envr Micr 49 (4) 925-933.
- RIPPEY, S.R., L.A. CHANDLER, W.D. WATKINS. 1987. Fluorometric Method for Enumeration of *Escherichia coli* in Molluscan Shellfish. J Food Prot 50(8) 685-690.
- REFAI, M.K., 1979. Manuals of Food Quality Control, 4. Microbiological Analyses. Food and Agriculture Organisation of the United States, FAO, Roma.
- ROBISON, B.J. 1984. Evaluation of a Fluorogenic Assay for Detection of *E. coli* in Foods. Appl Envr Micr 48(2) 285-288.
- SINGH, D., H.H. NG. 1986. Evaluation of a Rapid Detection Method for *Escherichia coli* in Foods Using Fluorogenic Assay. Food Micr 3: 373-377.