

Gıda mikrobiyolojisinde *Enterobacteriaceae* üyeleri için kromojenik ve florojenik besiyerleri

Chromogenic and fluorogenic media for members of *Enterobacteriaceae* in food microbiology

Emrah TORLAK¹

ÖZET

Gıda endüstrisinde kalite güvencenin sağlanmasında ve halk sağlığının korunmasında mikrobiyolojik risklerin hızlı tespiti önemlidir. Bu nedenle gıda mikrobiyolojisinde analiz sürelerini kısaltmak amacıyla birçok alternatif metot geliştirilmiştir. Bu metotların birçoğu mikroorganizmaların spesifik enzim aktivitelerini tespit etmeye yönelik kromojenik ve florojenik substratların kullanımı esasına dayalıdır. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarında iş gücü ve zamandan tasarruf sağladıklarından dolayı kromojenik ve florojenik substratlar içeren besiyerlerinin kullanımı artarak devam etmektedir. Bu derlemede, gıda mikrobiyolojisi bakımından en önemli familya olan *Enterobacteriaceae* familyası üyesi bakterilerin tespit edilmesi ve sayılmasına yönelik kromojenik ve florojenik besiyerleri son gelişmeler doğrultusunda kapsamlı olarak ele alınmıştır.

Anahtar Sözcükler: Kromojenik besiyeri, florojenik besiyeri, *Enterobacteriaceae*, gıda mikrobiyolojisi

ABSTRACT

Fast detection of microbiological risks is important for quality assurance in the food industry and public health. For this reason, several alternative methods have been developed to reduce the analysis period in food microbiology. Most of these methods are based on the utilization of chromogenic or fluorogenic substrates for the detection of specific enzyme activities of microorganisms. In food microbiology laboratories, use of media with chromogenic and fluorogenic substrates has continually increased due to cost, labor, and time savings features. This review discusses chromogenic and fluorogenic media for analysing members of *Enterobacteriaceae*, the most important family in food microbiology, in respect of recent developments. According to results of the latest studies, performance, advantage and disadvantage of chromogenic and fluorogenic media were evaluated.

Key Words: Chromogenic medium, fluorogenic medium, *Enterobacteriaceae*, food microbiology

¹ İl Kontrol Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KONYA

İletişim / Corresponding Author : Emrah TORLAK

İl Kontrol Laboratuvarı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, KONYA

Tel : +90 332 322 34 24

E-posta / E-mail : torlakemrah@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 02.10.2010

Kabul Tarihi / Accepted : 07.02.2011

GİRİŞ

Gıda mikrobiyolojisinde kromojenik ve florojenik substrat içeren besiyerlerinin kullanımı analizlerin identifikasyon aşamalarında sağladıkları kolaylıklar nedeni ile hızla artmaktadır.

Florojenik substratlar mikroorganizmalar tarafından üretilen spesifik enzimlerin aktiviteleri sonucu UV ışığı floresan ışığa çeviren alt birimlere parçalanırlar. Kromojenik substratlar ise spesifik enzim aktiviteleri sonucunda renk değiştiren kimyasal bileşiklerdir (1).

Mikrobiyolojide kullanılan kromojenik ve florojenik reaksiyonlar üç farklı yolla gerçekleşmektedir. Birincisi, ya sentetik substratların enzimatik aktivite ile hidrolizleri sonucu floresans meydana gelmesi veya hidroliz ürünlerinin bakteri hücrelerine absorpsiyonu ile olur. İkincisi, substratın floresan özelliğinde, spesifik enzim aktivitesine bağlı olarak değişen pH ile birlikte meydana gelen artış ile olur. Üçüncüsü ise floresan özellikteki boyanın bakteri hücrelerinin bazı komponentlerine bağlanması ile olur. Bu tip reaksiyonlara acridine orange boyasının DNA'ya bağlanmasını ve 8-anilino-1-naphtlane sulfanic asit'in proteinlere bağlanması örnek verilebilir. Bu reaksiyonlar bakteri hücrelerinin bir besiyerinde çoğaltılmasına gerek kalmadan, doğrudan epifluorescence gibi mikroskopik metotlar yardımı ile incelenmesine imkan sağlar (2).

Gıda mikrobiyolojisinde besiyerlerine ilave edilen kromojenik ve florojenik substratlar ile genel olarak birinci tip reaksiyonlar amaçlanmaktadır. Kromojenik ve florojenik substratların besiyerlerine ilavesinde iki önemli husus vardır. Bunlardan birincisi enzim aktivitesi sonucu yeterli ayrımı sağlayacak ölçüde renk ve floresans vermelidirler. İkincisi ise reaksiyon sonucunun kalıcı olmasıdır. Bu nedenle kalıcı renk değişimi ve floresan oluşturan substratlar her zaman tercih edilirler (1,2).

Bu derlemede, *Enterobacteriaceae* familyası üyesi bakterilerin tespit edilmesi ve sayılmasına yönelik

kromojenik ve florojenik besiyerleri son gelişmeler doğrultusunda ele alınmıştır.

Escherichia coli

Escherichia coli, gıdalarda önemli kalite indikatörlerindedir. Bir gıda ürünüde *E. coli*'nin varlığı doğrudan veya dolaylı bir fekal kontaminasyonun ve gıdanın üretim ve depolama aşamalarındaki yetersiz hijyen uygulamalarının bir göstergesidir (3).

Gıdalarda *E. coli* varlığının saptanması ve sayılması amacıyla günümüzde en çok kullanılan kromojenik ve florojenik substratlar β -D-glucuronidase (GUD) aktivitesine yönelik olanlardır. Yapılan birçok çalışmada *E. coli* suşlarının % 96 ile % 97 oranında β -D-glucuronidase aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir (4). Bununla birlikte bazı *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* türlerinin de β -D-glucuronidase aktivitesine sahip oldukları bildirilmektedir (5). *E. coli* dışında diğer *Escherichia* türleri β -D-glucuronidase aktivitesine sahip değildir (6). Ayrıca *E. coli*'nin *E. coli* O157:H7 gibi bazı patojenik serotipleri de β -D-glucuronidase aktivitesi göstermezler (7).

β -D-glucuronidase aktivitesini saptamak için en yaygın olarak kullanılan substratlar, p-nitrophenol- β -D-glucorinide (PNPG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucorinide (XGLUC) ve 4-methylumbelliferly- β -D-glucorinide (MUG)'dir (1). Bugün ticari ürünlerde en yaygın kullanılan substrat ise MUG'tur. β -D-glucuronidase enzimi MUG'u hidrolizasyon ile parçalar. Parçalanma ürünlerinden olan 4-methylumbelliferly (4-MU) 366 nm dalga boyunda UV ışığa maruz kalırsa mavi floresans verir (8). MUG, birçok sıvı (Laurly sulfate broth, m-Endo broth, EC broth, Brilla-broth, DEV-lactose peptone broth, LMX broth) ve katı (Violet red bile agar, *E. coli* direct agar, MacConkey agar, m-FC agar) besiyeri bileşimine eklenerek kullanılabilir (1).

Florojenik bir substrat olarak MUG'un en önemli avantajları; diğer besiyeri bileşenleri ile

beraber aktivitesinde bir azalma olmadan steril edilebilmesi ve *E. coli*'nin gelişmesi üzerine inhibe edici etkisinin olmamasıdır (9, 10). MUG ilaveli besiyerlerinde floresan ışımının verimli bir şekilde gözlemlenebilmesi için besiyeri pH'sı önemlidir. MUG ilaveli besiyerlerinin pH'sı hafif alkali olmalıdır. Bunun sağlanmadığı durumlarda floresan ışımayı görmek için besiyerine alkali çözeltisi ilave edilmelidir (2). Bununla beraber bazı *E. coli* suşlarının MUG reaksiyonu inkübasyon sıcaklığı ile yakından ilgilidir. 37°C'de inkübasyon sonunda zayıf pozitiflik gösteren bazı suşlar 44°C'de inkübasyon sonunda güçlü pozitif sonuç verebilmektedir (10).

Doğan ve ark (2002) 500 örnek ile yaptıkları çalışmada LST+MUG ve klasik EMS metodu arasında yüksek korelasyon olduğunu saptamışlardır. Peterson ve ark (11) LST+MUG'un recovery oranını klasik EMS metoduna göre daha yüksek olarak bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar ile MUG ilaveli besiyerlerinin güvenilir, hızlı, pratik ve ekonomik oldukları bildirilmiştir (9,12-14). Günümüzde katı veya sıvı birçok MUG ilaveli besiyeri ISO ve DIN gibi birçok ulusal ve uluslararası organizasyon tarafından kabul görmüş ve gıda mikrobiyolojisi metotlarının kapsamına alınmıştır (1).

Gıda mikrobiyolojisinde *E. coli* sayımında ilave bir identifikasyon aşaması gerektirmediği için kullanımı hızla yaygınlaşan diğer bir substrat ise 5-bromo-3-chloro-3-indoly-β-D-glucuronide'dir. 5-bromo-3-chloro-3-indoly-β-D-glucuronide'in X-GLUC ile beraber yaygın olarak kullanılan diğer kısaltılmış ismi ise BCIG (5-bromo-3-chloro-3-indoly-β-D-glucuronide)'dir. Bu substrat Tryptone bile agara ilave edilerek modifiye bir besiyeri olan Tryptone bile X-glucuronide (TBX) agar elde edilir (1). TBX agar bileşimindeki BCIG, β-D-glucuronidase aktivitesi sonucu parçalanır. Serbest kalan kromoforun bakteri hücresi içinde birikmesi sonucu *E. coli* kolonileri mavi-yeşil renkli görünürken β-D-glucuronidase negatif bakteriler besiyeri üzerinde renksiz koloniler oluştururlar (15). ISO'nun 2001

yılında TBX agarı gıda mikrobiyolojisi metot kapsamı içine alması ile birlikte besiyeri uluslararası düzeyde kabul görmüştür.

E. coli analizlerinde β-D-glucuronidase aktivitesini saptamak üzere kullanılan diğer bir kromojenik substrat ise 8-hydroxyquinoline-β-D-glucuronide (HQG)'dir. HQG çeşitli katı besiyerlerine eklenerek kullanılabilir. HQG, enzim aktivitesi sonucu parçalanarak β-D-glucuronidase pozitif olan kolonilerin siyah renkli görünmesine neden olur (Manafi, 2000). HQG'nin, kromojenik bir substrat olan BCIG'ye nazaran maliyetinin düşük olması ve florojenik bir substrat olan MUG'a göre katı besiyerinde daha az difüze olması gibi avantajları vardır (16).

Escherichia coli O157:H7

Escherichia coli O157:H7, insanlarda yüksek ölüm oranı ile seyreden kanlı diyare, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendroma neden olabilen gıda kaynaklı önemli bir patojen bakteridir (17).

E. coli O157:H7 serotipi diğer *E. coli* serotiplerinin çoğunluğundan farklı olarak 24 saat içinde sorbitolü fermente edemez ve β-D-glucuronidase negatiftir (18). Günümüzde gıdalardan *E. coli* O157:H7 izolasyonunda kullanılan referans besiyeri, bileşimine eklenen cefixime ve potasyum tellurit ile selektifliği artırılan Sorbitol MacConkey agar (SMAC)'dır (19). *E. coli* O157:H7 dışında bazı *E. coli* serotipleri ve *Proteus* türlerinin de sorbitolü fermente etme yeteneğine sahip olmadıklarından dolayı SMAC agar üzerinde *E. coli* O157:H7 ile benzer renksiz koloniler oluşturabilmektedirler. Ancak *E. coli* O157:H7 serotipi, bu bakterilerden farklı olarak ramnozu fermente etme yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle seçiciliğini arttırmak için cefixime-potasyum tellurit (CT)'e alternatif olarak cefixime-ramnoz (CR) besiyerine ilave edilebilir. Ayrıca SMAC agara MUG veya BCIG ilavesi ile de besiyerinin seçiciliği arttırılabilir. Böylece, besiyerinde koloni oluşturan

β -D-glucorinidase pozitif bakterilerin ayrımı kromojenik veya florojenik reaksiyon ile kolaylıkla sağlanır (1).

Önemli bir gıda kaynaklı patojen olması nedeniyle gıdalarda *E. coli* O157:H7 aranmasına yönelik, referans metotlara alternatif olarak çeşitli ticari kromojenik ve florojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri; Rainbow agar O157 (Biolog, Hayward, ABD), BCM O157:H7 (Biosynth AG, Staad, İsviçre), CHROMagar O157 (Chromagar, Paris, Fransa) ve Fluorocult O157:H7 (Merck, Darmstat, Almanya)'dir (1, 20).

Rainbow agar O157 üzerinde *E. coli*'nin farklı serotipleri pembeden siyaha kadar farklı renklerde koloniler oluştururlar. Besiyerinde glucorinidase pozitif serotiplerden farklı olarak *E. coli* O157:H7 kolonileri siyah renkli koloniler oluştururlar (18). *E. coli* serotiplerinin gösterdiği çeşitli koloni renklerinin nedeni besiyerine galactosidase ve glucorinidase aktivitesine yönelik iki ayrı kromojenik substratın ilave edilmesidir. Besiyerinde glucorinidase aktivitesi kırmızı renge neden olurken, galactosidase aktivitesi siyah renge neden olmaktadır. Böylece yalnızca galactosidase pozitif olan *E. coli* O157:H7 kolonileri siyah renkli koloniler oluştururken, diğer *E. coli* serotipleri iki enzimin üretim oranlarına bağlı olarak farklı birçok renkte koloni oluşturabilmektedir. *E. coli* dışındaki birçok tür besiyeri bileşiminde bulunan potasyum tellürit ve novobiocin nedeniyle inhibe olmaktadır. İnhibe olmayanlar ise renksiz koloniler oluşturmaktadırlar (21).

Fluorocult O157:H7, sorbitolün fermentasyon yoluyla kullanımı ve glucorinidase aktivitesine yönelik ayırım sağlayan selektif bir besiyeridir. Besiyerinde, sodyum deoxycholate gram pozitif rekabetçi floranın önemli ölçüde inhibe olmasını sağlar. Sorbitolü fermente etme yeteneğine sahip bakteriler asit oluşumunu nedeniyle sarı koloniler oluştururken, sorbitol negatif olanlar renksiz koloniler oluştururlar. Besiyeri bileşiminde bulunan sodyum tiyosülfat ve

amonyum demir (III) sitrat *Proteus mirabilis* gibi hidrojen sülfür oluşturan türlerin kahverengi koloniler oluşturmalarına neden olur. *E. coli* O157:H7'nin *Shigella sonnei* gibi renksiz koloni oluşturan türlerden ayrımı ise glucorinidase aktivitesi ile sağlanır. Besiyeri bileşiminde bulunan MUG, glucorinidase aktivitesinin florojenik olarak gözlenmesini sağlar (22).

E. coli O157:H7 serotipi BCM (Biosynth Culture Medium) agar O157:H7 üzerinde mavi-siyah, 1,5-2 mm çapında, konveks ve çevresinde siyah presipitat olan koloniler, CHROMagar O157 besiyerinde ise pembe renkli koloniler oluştururlar (1).

Manafi ve Kremsmaier (18) sığır eti ve çiğ süt örnekleri ile yaptıkları çalışmada *E. coli* O157:H7 izolasyonu için kullanılan besiyerleri için yanlış pozitif oranlarını; Rainbow agar O157 (% 2,1), BCM O157:H7 (% 3,3) ve SMAC (% 57,3) olarak bulmuşlardır. Restaino ve ark (23) sığır eti örneklerinden izole ettikleri kültürler ile yaptıkları çalışmada, BCM O157:H7 besiyerinin hassasiyet ve spesiflik değerlerini SMAC-BCIG besiyerine nazaran oldukça yüksek olarak saptamışlardır.

Koliform Bakteriler

Koliform grubu bakteriler *Enterobacteriaceae* familyası içinde yer alan, fakültatif anaerob, gram negatif, sporsuz ve laktozdan asit ve gaz oluşturan bakterilerdir. Bu grupta yer alan ve gıda mikrobiyolojisi açısından önemli olan mikroorganizmalar; *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* ve *Klebsiella pneumoniae*'dir. Gıdalarda koliform bakteri varlığı yetersiz ve yanlış pastörizasyon ve pişirme uygulamalarının veya yetersiz sanitasyon uygulamalarının bir göstergesidir (24).

Günümüzde gıdalarda koliform bakteri sayımı için kullanılan kromojenik ve florojenik besiyerleri genellikle aynı besiyerinde birden fazla substrat yardımıyla aynı zamanda *E. coli* varlığının ve sayısının

belirlenmesine de olanak sağlamaktadır. Böylece bir besiyeri ile iki farklı analiz gerçekleştirirken zaman, iş gücü ve paradan tasarruf edilmektedir.

Koliform varlığının tespiti ve sayımı için β - D - galactosidase aktivitesine yönelik substratlar kullanılmaktadır. β - D - galactosidase, diğer ismiyle laktaz, laktozu glukoz ve galaktoza parçalar. Günümüzde mikrobiyolojide β - D - galactosidase aktivitesine yönelik o - nitro - phenyl - β - D - galactopyranoside (ONPG), p - nitro-phenyl - β - D - galactopyranoside (PNPG), 6 - bromo - 3 - indolyl - β - galactopyranoside (SalmonGal), 5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - β - D - galactopyranoside (XGAL), 6 - bromo - 2 - naphthyl - β - D - galactopyranoside (BNGAL), chlorophenol red b-galactopyranoside (CRPG) ve 8 - hydroxychinoline - β - D - galactoside gibi kromojenik substratlar ve florojenik substrat olarak 4 - methylumbelliferyl - β - D - galactopyranoside (MUGAL) kullanılmaktadır (1,10). Nitrofenolik

bileşikler olan ONPG ve PNPG, katı besiyerinde yüksek difüze olma özelliklerinden dolayı agarlı besiyerleri ile kullanılmaları tercih edilmemektedir (10,25).

E. coli ve koliformların aynı zamanda analizi için kullanılan besiyerlerinde farklı kromojenik/florojenik substratların yanında rekabetçi floranın baskılanması ve seçiciliği arttırmak için safra tuzu, propiyonat, tergitol, sodyum lauryl sülfat (SDS) gibi birçok farklı besiyeri bileşeni kullanılmaktadır (22).

Chromocult coliform agar (CCA) SalmonGal ve XGLU substratları ile beraber pepton, piruvat, sorbit ve fosfat buffer içeriği ile zarar görmüş bakteri hücrelerinin geri kazanımını için ideal olması nedeniyle kullanımı yaygın bir besiyeridir. Besiyeri bileşimindeki Tergitol rekabetçi floranın baskılanmasını sağlar (1). Suwansonthichai ve Rengpipat (26) üç farklı düzeyde kontamine edilen 174 gıda örneği ile yaptıkları çalışmada LMX broth ve CCA besiyerlerini klasik üçlü tüp en muhtemel sayı (EMS) metodu ile karşılaştırmışlardır. LMX broth ve

Tablo 1. Gıda ve su mikrobiyolojisinde *E. coli*/koliform tespiti/sayılmasına yönelik ticari besiyerleri, kullanılan substratlar ve üretici firmaları (1).

| Besiyeri | Substrat/renk | | Üretici firma |
|--------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------|
| | Koliform | <i>E. coli</i> | |
| Sıvı besiyerleri | | | |
| Fluorocult LMX broth | XGAL/mavi-yeşil | MUG/mavi floresans | Merck (Almanya) |
| Readycult Coliforms | XGAL/mavi-yeşil | MUG/mavi floresans | Merck (Almanya) |
| Colilert | ONPG/Sarı | MUG/mavi floresans | IDEXX (ABD) |
| Coliquick | ONPG/Sarı | MUG/mavi floresans | Hach (ABD) |
| Colisure | CPRG/Kırmızı | MUG/mavi floresans | IDEXX (ABD) |
| Katı Besiyerleri | | | |
| EMX agar | XGAL/mavi | MUG/mavi floresans | Biotest (Almanya) |
| C-EC-MF agar | XGAL/mavi | MUG/mavi floresans | Biolife (İtalya) |
| Chromocult Coliform | SalmonGal/Kırmızı | XGLUC/mavi-menekşe | Merck (Almanya) |
| Coli ID | XGAL/mavi | SalmonGlu/kırmızı-menekşe | BioMérieux (Fransa) |
| CHROMagar ECC | SalmonGal/Kırmızı | XGLUC/mor | Chromagar (Fransa) |
| Rapid' <i>E. coli</i> 2 | XGAL/mavi | SalmonGlu/mor | Sanofi (Fransa) |
| <i>E. coli</i> /Coliform | SalmonGal/Kırmızı | XGLUC/mor | Oxoid (İngiltere) |
| ColiScan | SalmonGal/Kırmızı | XGLUC/mor | MicrologyLab (ABD) |
| HiCrome ECC | SalmonGal/Kırmızı | XGLUC/mor | Union Carbide (ABD) |

CCA besiyerleri ile EMS metodu arasındaki uyumu sırasıyla; Koliform için % 108, % 91 ve *E. coli* için % 101, % 96,3 olarak bulmuşlardır. Gonzales ve ark (3) CCA ile Violet red bile laktoz agar'ı karşılaştırdıkları çalışmalarında CCA'nın *E. coli* ve koliform sayımında verimliliğinin yeterli olarak saptamışlardır.

Günümüzde gıdalarda *E. coli* ve koliform sayımlarına yönelik kromojenik ve florojenik substratların kullanıldığı modifiye kültürel metotlar mevcuttur. Gıda mikrobiyolojisinde alternatif metotlar arasında yer alan bu metotlar uygulama kolaylığı sağlamak, laboratuvarların iş yükünü azaltmak ve kısıtlı laboratuvar imkanlarında kullanım için tasarlanmış ticari ürünlerdir. Bu ticari ürünlere Petrifilm (3M, St. Paul, ABD), Compact Dry (TCS Biosciences, Buckingham, İngiltere), SimPlate (BioControl Systems, Bellevue, ABD) ve TEMPO (bioMérieux) örnek verilebilir (27,28).

Modifiye kültürel metotların en yenilerinden olan TEMPO sistemi, gıdalarda kalite indikatörlerinin sayımına yönelik en muhtemel sayı prensibine dayalı otomatize bir sistemdir (29). Torlak ve ark (29) TEMPO EC (*Escherichia coli*) ve TBX agarı doğal ve yapay kontamine peynir örneklerinde karşılaştırdıkları çalışmalarında iki metot arasında % 95'in üzerinde korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır.

Salmonella

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyası üyesi, fakültatif anaerob, gram negatif bir basildir. *Salmonella gallinarum* ve *Salmonella pullorum* serotipleri hariç olmak üzere hareketli bir bakteridir. *Salmonella* cinsi somatik, flagellar ve kapsüler antijen tiplendirmesine dayalı olarak belirlenen 3000'e yakın serotipten oluşmaktadır. Günümüzde *Salmonella*'lardan kaynaklanan gıda enfeksiyonları ABD, Almanya, Fransa ve İngiltere başta olmak üzere bir çok ülkede tüm gıda enfeksiyon ve intoksikasyonları arasında ilk veya ikinci sırada yer almaktadır (30).

Brillant green agar (BGA), Xylose lysine desoxycholate agar (XLD), Bismuth sulfite agar (BSA), Hektoen enteric agar (HEA) ve *Salmonella-Shigella* agar (SS) gıdalarda *Salmonella* aranması için referans metotlar ile önerilen klasik besiyerleridir (31-33). Gıdalarda *Salmonella* aranmasına yönelik klasik besiyerlerinin çoğunluğu laktoz fermentasyonu ve hidrojen sülfür oluşumu ile ayırım sağlamaktadırlar. Ancak gıdalarda sıklıkla rastlanan ve *Salmonella* ile aynı familya üyesi olan *Proteus* türleri ve bazı *Citrobacter* türleri, laktozu fermente edememe ve hidrojen sülfür oluşturma gibi *Salmonella* cinsine benzer biyokimyasal özellikler göstermektedir. Bu nedenle klasik besiyerlerinde özellikle bu türlerden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçlar ile sıklıkla karşılaşmaktadır (34). Klasik besiyerlerinde karşılaşılan bu ve benzeri sorunlar ve ilave identifikasyon aşamalarına olan ihtiyacı en aza indirmek için gıdalarda *Salmonella* aranmasına yönelik birçok kromojenik ve florojenik besiyeri mevcuttur: SM-ID agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), Rambach agar (Merck, Darmstadt, Almanya), Chromogenic ABC medium (Lab M, Bury, İngiltere), CHROMagar *Salmonella* (Chromagar, Paris, Fransa), Rainbow agar (Biolog, Hayward, ABD), *Salmonella* chromogenic medium (Oxoid, Basingstoke, İngiltere), Compass *Salmonella* agar (Biokar diagnostics, Beauvais, Fransa), Chromogenic *Salmonella* esterase agar (PPR diagnostics, Londra, İngiltere) ve AES *Salmonella* agar plate (AES, Bruz, Fransa) (1,20,35).

Esteraz, kısa zincirli organik asit esterlerini hidrolize eder ve tüm mikroorganizmalar tarafından farklı oranlarda sentezlenir. Ancak organik asidin zincir uzunluğuna bağlı olarak spesifiklikleri mikroorganizmalar arasında değişiklik gösterir. Chromogenic *Salmonella* esterase agarda besiyerine kromojenik özellik kazandıran bileşen 4-[2-(4-octanoyloxy-3,5-dimethoxyphenyl)-vinyl]-quinolinium-1-(propan-3-yl carboxylic acid) bromide (SLPA-octanoate; bromide form)'dir. Besiyerinde

C8 yağ asidi esteri ve fenolik kromofordan oluşan SLPA-octanoat *Salmonella* tarafından hidrolize edilir ve fenolden kaynaklanan parlak renk oluşur. 24 saat inkübasyon sonunda *Salmonella* kolonileri açık sarı renkli besiyeri üzerinde koyu kırmızı koloniler oluştururlar. *Salmonella* olmayan türler ise besiyerinde krem, sarı veya renksiz koloniler oluştururlar. Chromogenik *Salmonella* esterase agar'da esterase aktivitesi sonucu renk oluşumu düşük pH ile inhibe olmaktadır. Bu nedenle besiyeri bileşiminde bulunan laktozu kullanabilen mikroorganizmalar besiyeri pH'ını düşürdüklerinden dolayı renksiz veya açık renkli koloniler oluştururlar. *Salmonella Indiana* ve *Salmonella Arizona* laktozu fermentasyon yoluyla kullanabildikleri için chromogenik *Salmonella* esterase agar, SM-ID agar ve Rambach agarda yanlış negatif sonuca neden olmaktadır (36). Bununla beraber *S. Indiana* ve *S. Arizona*'nın endüstriyel ve klinik örneklerden izole edilen *Salmonella*'lar içindeki oranları oldukça düşüktür (37).

CHROMA agar *Salmonella* besiyeri de esterase aktivitesine göre ayırım sağlamaktadır. Besiyeri bileşimindeki 5-bromo-6-chloro-3-indolyl-caprylate esterase aktivitesi sonucu pembe-mor renkli kolonilerin oluşmasına neden olur. Diğer *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri β -D-galaktosidase aktivitesine bağlı olarak mavi veya renksiz koloniler oluştururlar. Rall ve ark (34) tavuk karkas örnekleri ile yaptıkları çalışmada CHROMA agar *Salmonella* besiyerinin, Rambach agar, BGA, SS ve XLD'ye göre *Salmonella* pozitif örnekleri tespit etme yeterliliğinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Esteraz aktivitesine bağlı ayırım sağlayan diğer bir besiyeride Compass *Salmonella* agar'dır. Bu besiyerinde, 5-bromo-6-chloro-3-indolyl-caprylate esterase aktivitesi ile pembe-mor koloni rengine neden olur (35).

Chromogenic *Salmonella* Medium iki farklı substrat içeren bir besiyeridir. Bromo-6-Chloro-3-Indolyl caprylate (Magenta-caprylate) laktoz negatif *Salmonella* serotipleri tarafından hidrolize edilerek

pembe-mor kolonilerin oluşmasına neden olur. Diğer substrat olan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (XGAL) ise laktoz pozitif türlerin mavi koloniler oluşturmasını sağlar. Chromogenic *Salmonella* medium besiyerinde *Shigella dysenteriae* gibi bazı *Shigella* türleri de pembe-mor koloni oluşturabilmektedir. Besiyerine eklenen novobiocin *Proteus* türlerinin gelişmelerini inhibe ederken, cefsulodin *Pseudomonas* türlerinin gelişimini inhibe eder (38).

Chromogenic ABC medium ($\alpha\beta$ -chromogenic medium), *Salmonella* izolasyonu için iki farklı kromojenik substrat içermektedir. Galaktosidase aktivitesine yönelik kullanılan substrat 3,4-cyclohexenoesculetin- β -D-galactoside (CHEGAL)'dır ve besiyerindeki demir varlığında siyah koloni renginin oluşmasını sağlar. İkinci substrat ise *Salmonella* serotipleri tarafından hidrolize edilebilen 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside (X- α -GAL)'dır. Bu substratın hidrolizi sonucu *Salmonella* kolonileri yeşil renkli görülürler (39). Böylece besiyerinde α -Galaktosidase aktivitesi ile *Salmonella* serotipleri diğer *Enterobacteriaceae* türlerinden ayırılır (1). Peery ve ark. (36) yaptıkları çalışmada Chromogenic ABC medium üzerinde 1022 *Salmonella* suşundan % 99,7'si yeşil renk verirken, 300 *Salmonella* olmayan gram negatif suştan yalnızca bir tanesi karakteristik yeşil renk oluşturmuştur.

Rambach agar'da *Salmonella* serotipleri besiyeri bileşimindeki propylene glycol'den asit oluşturma yetenekleri sayesinde diğer *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden ayrılırlar. *Salmonella* serotipleri besiyeri bileşimindeki nötral red nedeniyle kırmızı koloniler oluştururlar. Ayrıca besiyeri bileşimindeki 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (XGAL), β -D-galaktosidase pozitif *Enterobacteriaceae* için ayırım sağlar. *E. coli* gibi β -D-galaktosidase pozitif türler besiyerinde mavi koloni oluştururken her iki bileşen için reaksiyon göstermeyen *Proteus* türleri renksiz koloniler oluştururlar. Bazı *Citrobacter*

türleri her iki bileşene karşı reaksiyon gösterdikleri için menekşe renkli koloniler oluştururlar (40). Rambach agarın en önemli dezavantajı *S. typhi* ve *S. paratyphi*'nin diğer *Salmonella* serotiplerinden farklı olarak besiyerinde kırmızı yerine beyaz koloniler oluşturmasıdır (41,42). Bazı *Salmonella* alt türleri (IIIa, IIIb ve V) ve özellikle *S. Indiana* ve *S. Arizona* serotipleri β -D-Galaktosidase pozitiflerdir. Bu nedenle Rambach agarda *E. coli* gibi laktozu fermente edebilen türler ile ayırt edilemezler (36,42). Kühn ve ark. (42) yaptıkları çalışmada IIIa, IIIb ve V alt türleri için ONPG pozitif oranını % 100 olarak bulmuşlardır.

SM-ID agar prensip olarak Rambach agar ile benzerlik gösteren kromojenik bir besiyeridir. Bu nedenle Rambach agarda *S. Indiana* ve *S. Arizona*'nın β -D-Galaktosidase pozitif olmasından kaynaklanan dezavantaj SM-ID agar için de geçerlidir. SM-ID agarda besiyeri bileşiminde Rambach agardan farklı olarak propylene glycol yerine yine nötral red varlığında kırmızı rengin oluşmasına neden olan D-glucuronate vardır (43).

Enterobacter (Cronobacter) sakazakii

Özellikle kontamine bebek mamaları ile prematüre ve bağışıklık sistemi yetersiz yeni doğanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olan *Enterobacter sakazakii* yapılan son çalışmalar sonucunda en az beş türü olan *Cronobacter spp.* olarak yeniden isimlendirilmiştir (44).

Gıdalarda *Enterobacter sakazakii* tespitine yönelik mevcut FDA metodu *E. sakazakii*'nin sarı pigment üretimine dayalıdır. Ancak sarı pigment üretimi *Enterobacteriaceae* familyası içinde yalnızca *E. sakazakii*'ye özgü değildir. Bununla birlikte bazı *E. sakazakii* suşlarının beyaz pigment ürettiği bildirilmiştir (44).

Gıdalardan *E. sakazakii* izolasyonu için kullanılan kromojenik besiyerleri *E. sakazakii*'nin

sahip olduğu α -glucosidase aktivitesine dayalıdır. Kromojenik bir substrat olan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-glucopyranoside (XaGlc) içeren farklı besiyeri formülasyonları geliştirilmiştir. Bu substrat α -glucosidase tarafından hidrolize edildiğinde aglikon ve bromo-4-chloro-3-indolyl ortaya çıkar. Hidrolizasyon ürünlerinden bromo-4-chloro-3-indolyl oksijen varlığında dimerize olarak bir pigment olan bromo-chloro-indigo'ya dönüşür. Bu pigment sayesinde *E. sakazakii* besiyerinde mavi renkli koloniler oluşturur (45).

Günümüzde gıdalardan *E. sakazakii* izolasyonu için XaGlc içeren besiyerlerinden en yaygın kullanılanları Druggan-Forsythe-Iversen agar (DFI agar) ve *Enterobacter sakazakii* isolation agar (ESIA)'dır. ISO tarafından kabul gören ESIA besiyerinin bileşiminde Gram pozitif rekabetçi floranın inhibisyonu için sodium deoxycholate ve crystal violet yer almaktadır. ESIA besiyerine nazaran yüksek sodium deoxycholate konsantrasyonu ve düşük kromojenik substrat konsantrasyonu DFI agarın hassasiyetini olumsuz etkilemektedir. DFI agarda ESIA besiyerinden farklı olarak besiyeri bileşimindeki hidrojen sülfid üretim sistemi ile zayıf α -glucosidase aktivitesine sahip olan *Proteus* türlerinin ayrımı mümkün olmaktadır (46).

Sonuç

Enterobacteriaceae familyası üyesi bakterilerin analizleri gıda mikrobiyolojisi laboratuvarlarının iş yükünün büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu nedenle bu analizlere yönelik zaman ve iş gücünden tasarruf sağlayan alternatif metotlara olan ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır. Kromojenik ve florojenik besiyerleri ilave bir cihaz yatırımı gerektirmemeleri ve diğer alternatif metotlara nazaran maliyetlerinin düşük olması nedeni ile gıda mikrobiyolojisi laboratuvarları için ideal alternatif metotlar olarak ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte bazı kromojenik ve florojenik besiyerleri göstermiş oldukları

performans nedeni ile referans metotlar içinde yerini almıştır.

Laboratuvarlar kromojenik ve florojenik besiyerlerinin seçiminde zaman, maliyet ve iş gücü

gibi kriterlerin yanında doğruluk, kesinlik, spesifiklik ve hassasiyet gibi performans kriterlerini de her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *Int J Food Microbiol*, 2000; 60: 205-18.
- Manafi M. Fluorogenic and chromogenic substrates in culture media and identification tests. *Int J Food Microbiol*, 1996; 31: 45-58.
- Gonzales RD, Tamagnini LM, Olmos PD, de Sousa GB. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiol*, 2002; 20: 601-4.
- Doğan HB, Çakır İ, Başpınar E, Halkman AK. Comparison of LST + MUG broth technique and conventional method for the enumeration of *Escherichia coli* in foods. *Lett Appl Microbiology*, 2002; 34(4): 274-8.
- Godsey JH, Matteo MR, Shen D, Tolman G, Gohike JR. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* with microbial enzyme activity profiles. *J Clin Microbiol*, 1981; 13: 483-90.
- Rice EW, Allen MJ, Brenner DJ, Edberg SC. Assay for β -glucuronidase in species of the genus *Escherichia* and its application for drinking-water analysis. *Appl Environ Microbiol*, 1991; 57: 592-3.
- Frampton EW, Restaino L. Methods for *E. coli* identification in food, water and clinical samples based on β -glucuronidase detection. *J Appl Bacteriol*, 1993; 74: 223-33.
- Feng PCS, Hartman PA. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1982; 43(6): 1320-9.
- Moberg LJ. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in food. *Appl Environ Microbiol*, 1985; 50: 1383-7.
- Manafi M, Kneifel W, Bascomp S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol Rev*, 1991; 55(3): 335-48.
- Peterson EH, Nierman ML, Rude RA, Peeler JT. Comparison of AOAC method and fluorogenic method (MUG) assay for enumeration of *E. coli* in foods. *J Food Sci*, 1987, 52: 409-10.
- Robison BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl Environ Microbiol*, 1984; 48(2): 285-8.
- Moberg LJ, Wagner MK, Kellen LA. Fluorogenic assay for rapid detection of *Escherichia coli* in chilled and frozen foods: collaborative study. *J AOAC Int*, 1988; 71(3): 589-602.
- Poelma PL, Wilson CR, Andrews WH. Rapid fluorogenic enumeration of *Escherichia coli* in selected, naturally contaminated high moisture foods. *J AOAC Int*, 1987; 70: 991-3.
- Health Protection Agency. National Standard Method, MSOP 31: Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) Agar. London, 2004.
- Reinders RD, Bijker PGH, Veld JHJ, van Knapen F. Use of 8-hydroxyquinoline- β -D-glucuronide for presumptive identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Lett Appl Microbiol*, 2000; 30: 411-4.
- Li F, Zhao C, Zhang W, Cui S, Meng J, Wu J, Zhang DY. Use of ramification amplification assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* Shiga toxin-producing strains. *J Clin Microbiol*, 2005; 43(12): 6086-90.
- Manafi M, Kremsmaier B. Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Int J Food Microbiol*, 2001; 71: 257-62.
- Health Protection Agency. National Standard Method MSOP 23: Cefixime tellurite sorbitol MacConkey (SMAC) agar. London, 2005.
- Food and Drug Administration. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. *Bacteriological Analytical Manual*. Maryland, 2001.
- Anonim. Rainbow agar O157 technical information, Biolog Inc. Hayward, 2003.
- Anonim. Microbiology manuel, Merck KGaA, Darmstadt, 2006.
- Restaino L, Frampton EW, Turner KM, Allison DRK. A chromogenic plating medium for isolating *Escherichia coli* O157:H7 from beef. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 29: 26-30
- Çakır İ. Koliform grup bakteriler ve *E. coli*, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayınları. Armoni Matbaacılık: Ankara, 1999.

25. Ley AN, Bowers RJ, Wolfe S. Indoxyl- β -D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of *Escherichia coli* in environmental samples. *Can J Microbiol*, 1988; 34: 690-3.
26. Suwansonthichai H, Rengpipat S. Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *penaeus monodon* by conventional and rapid methods. *Int J Food Microbiol*, 2003, 81(2): 113-21.
27. Orenga S, James AL, Manafi M, Perry JD, Pincus DH. Enzymatic substrates in microbiology. *J Microbiol Methods*, 2009, 79(2): 139-55.
28. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol*, 2010, 27: 710-30.
29. Torlak E, Akan İ, Gökmen M. Comparison of TEMPO EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(6): 566-70.
30. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. 1. Baskı. Pozitif Matbaacılık: Ankara, 2007.
31. Food and Drug Administration. *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manuel, Maryland, 2006.
32. Health Protection Agency. National Standard Method F 13: Detection of *Salmonella* species. London, 2007.
33. International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Cenevre, 2002.
34. Rall VLM, Rall R, Aragon LC, da Silva MG. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Braz J Microbiol*, 2005;36: 147-50.
35. Perez JM, Cavalli P, Roure C, Renac R, Gille Y, Freydiere AM. Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *J Clin Microbiol*, 2003;41(3): 1130-4.
36. Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Richardson AC. A novel chromogenic ester agar medium for detection of *Salmonellae*. *Appl Environ Microbiol*, 1999; 65(2): 807-12.
37. Public Health Laboratory Service. *Salmonella* serotypes recorded in the PHLS *Salmonella* data set: January to December. p. 103, 216, 338, 444. Londra, 1997.
38. Cassar R, Cuschieri P. Comparison of *Salmonella* chromogenic medium with DCLS Agar for isolation of *Salmonella* species from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(7): 3229-32.
39. Peery JD, Ford M, Taylor J, Jones AL, Freeman R, Gould FK. ABC Medium, a new chromogenic agar for selective isolation of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol*, 1999;37(3): 766-8.
40. Pignato S, Mario AM, Emanuele MC, Iannotta V, Caracappa S, Giammanco G. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonella* in foods. *Appl Environ Microbiol*, 1995; 61(5): 19996-9.
41. Gruenewald R, Henderson RW, Yappow S. Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol*, 1991; 29(10): 2354-6.
42. Kühn H, Wonde B, Rabsch W, Reissbrodt R. Evaluation of Rambach agar for detection of *Salmonella* subspecies I to VI. *Appl Environ Microbiol*, 1994;60(2): 749-51.
43. Dusch H, Altwegg M. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *J Clin Microbiol*, 1995;33(4):802-4.
44. Cawthorn DM, Botha S, Witthuhn Rc. Evaluation of different methods for the detection and identification of *Enterobacter sakazakii* isolated from South African infant formula milks and the processing environment. *Int J Food Microbiol*, 2008; 127: 129-38.
45. Iversena C, Drugganb P, Forsythea S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol*, 2004; 96: 133-9.
46. Druggan P, Iversen C. Culture media for the isolation of *Cronobacter* spp. *Int J Food Microbiol*, 2009; 136: 169-78.