

Araştırma Makalesi

VAKUM PAKETLİ SIĞIR ETLERİNİN BOZULMA ETKENİ
Clostridium Estertheticum YÖNÜNDE PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Aysun YILMAZ*
Gözde KAYA*

Christopher HELPS**
Erkan KIRAT***

Geliş Tarihi : 24.11.2008
Kabul Tarihi : 21.01.2009

Investigation on the Presence of Spoilage Bacteria *Clostridium estertheticum* in
Vacuum-Packed Beef by PCR

Abstract: One of the psychrophilic Clostridia , *Clostridium estertheticum* has been recognized as causative agents of "blown pack" spoilage of vacuum-packed chilled (0-4°C) meats indicative of odor and vacuum pack distension. Therefore, this study was planned to investigate the presence of potential spoilage bacteria, *Clostridium estertheticum* in vacuum-packed beef. For this, DNA samples from 70 vacuum-packed beef from Istanbul, Turkey were analysed for the presence of *Clostridium estertheticum* DNA by PCR. No targeted *Clostridium estertheticum* DNA was found in the samples. In conclusion, although no positivity for *Clostridium estertheticum* found in this study, it should be monitored in meat sector whether this bacteria causes spoilage in vacuum-packed beef in Turkey or not. In this study, presence of *Clostridium estertheticum* was investigated by PCR for the first time in Turkey and the results will aid scientific information and background to meat sector.

Key Words: *Clostridium estertheticum*, beef, vacuum-packed, PCR

Özet: Psikrofil klostridiumlardan *Clostridium estertheticum* vakum paketli soğukta (0-4°C) tutulan etlerde bozulmalara ve dolayısıyla koku ve bombaja (blown pack) neden olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, vakum paketli etlerde potansiyel bozulmaya neden olabilecek *Clostridium estertheticum* varlığının araştırılması amaçlandı. Bu amaca yönelik olarak, değişik firmalardan temin edilen 70 vakum paketli sığır eti *Clostridium estertheticum* DNA'sı yönünden PCR ile incelendi. İncelenen DNA örneklerinde hedeflenen *Clostridium estertheticum* DNA'sı saptanmadı. Sonuç olarak çalışmada vakum paketli sığır etlerinde *Clostridium estertheticum* saptanmamış olsa da etkenin ülkemizde et sektöründe problem oluşturup oluşturmadığı izlenmelidir. Bu çalışma ile etkenin PCR ile ülkemizde ilk kez araştırılarak sektöre ve araştırmacılara bilimsel katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium estertheticum*, sığır eti, vakum paket, PCR

Giriş

* Çevre Endüstriyel Analiz Laboratuvarı, Merkez Mahallesi, Ceylan Sokak, No 24, Mart Plaza, Kat 2, Kağıthane, İstanbul, Türkiye, Tel: 212 3210900, Fax: 212 3210975, Email: aysunyilmaz@cevreanaliz.com

** University of Bristol, Department of Clinical Veterinary Science, Langford House, Langford, Bristol UK.

*** TÜV, Rheinland, Kavacık, İstanbul

Psikrofil klostridumlardan *Clostridium estertheticum* ve daha az oranda *Clostridium gasigenes* vakum paketli soğukta (0-4 °C) tutulan kırmızı etlerde bozulmalara ve dolayısıyla koku ve bombaja (blown pack) neden olmaktadır (2, 6, 8, 9). Her ne kadar psikrofil mikroorganizmalar 22 °C nin üzerindeki sıcaklıklarda üreme imkanına sahip olmasalar da, sporları kötü koşullara ve yüksek ısıya dayanıklıdır (11). Bu nedenle sığır gaitası ve toprak parçalarıyla sığırların derisi veya ayaklarına yapışan sporlar mezbaha ortamına taşınarak, uygun koşullar bulunduğu (soğuk, nem ve diğer faktörler) vejetatif hale dönüşüp çoğalarak mezbahalardaki psikrofil bakteri sayısının artmasına neden olmaktadır (1, 5, 7, 10, 12). Etkenin vakum paketli etlere kesim ve paketlenmeyi de içeren üretim aşamalarında bulaşabileceği bildirilmiştir (3, 6, 9). Hayvanların ayakları ve dış derilerine bulaşmadaki başlıca kaynağın yaşam alanlarında yani çevrelerinde bulunan etken olduğu bildirilmiştir (3, 7, 10). Hayvanların dışkısı, derileri ve ortamda bulunan bakteriler kesim sırasında etlerine yapışmakta ve buradan paketlere kadar ilerleyebilen bir zincirle bulaşma şekillenmektedir (1, 10). Ayrıca çok az oranda da olsa, konveyör ve vakumlama sırasında da bulaşmaların olabileceği bildirilmiştir (9).

Vakum paketli kırmızı etlerde bozulmalar gözleendiğinde, mezbahaların ve soğukta tutulan vakum paketlerin *Clostridium estertheticum* yönünden araştırılmasında yarar vardır. Etken standart izolasyon yöntemleri ile zor ürettiği için, saptama amacıyla moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (3, 5). Bu amaçla PCR en sık kullanılan yöntemdir (3, 4, 8). PCR, spesifiklik ve duyarlılığının yüksek olması ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir.

Bu çalışmanın amacı, vakum paketli etlerde potansiyel bozulmaya neden olabilecek *Clostridium estertheticum* varlığını PCR ile araştırmak ve bulunma sıklığı hakkında bilgi edinmektir.

Materyal ve Metot

Örnekler ve DNA ekstraksiyonu

Çalışmada, değişik firmalara ait vakum paketli sığır etleri piyasadan (satış noktalarından) 2008 yılında temin edildi. Toplam 70 adet vakum paketin içinde biriken sıvı ayrı ependorflara aseptik koşullarda alınarak DNA ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Ekstraksiyon DNA kan kiti (Macherey-Nagel, NucleoSpin Blood, 740951.50) kullanılarak, firmanın bildirdiği yönteme göre yapıldı. Özetle, proteinaz-K ile yapılan inkübasyondan sonra gerekli çözeltiler eklenerek ve yıkanarak DNA ekstraksiyonu tamamlandı. DNA örnekleri PCR aşamasına kadar -20°C de tutuldu. Ekstraksiyon sonucu elde edilen üründeki DNA miktarı, Nanodrop cihazı ile ölçüldü.

PCR

Çalışmada kullanılan primerler MACVECTOR ver. 5 programı kullanılarak hazırlandı ve *Clostridium estertheticum* 16S ribosomal DNA (rDNA) geni hedeflendi (NCIMB 12511, Accession No. S46734). Primerlerin sırasıyla 173-197 ve 813-792 pozisyonlarına bağlanarak 641 bp ürün elde edilmesi amaçlandı. Forward, 5-TGATCGCATGATCTTAACATCAAAG ve Reverse, 5-TCGACCCCGACACCTAGTATT diziliminden oluşan primerler, Genosys (United Kingdom) firması tarafından sentezlendi. PCR reaksiyonu, Tag Master Mix (Qiagen, Tag Master Mix) ile farklı konsantrasyonlarda primerler ve pozitif kontrol (Dr. Christopher Helps, University of Bristol, Veterinary School, United Kingdom) kullanılarak standardize edildi. Standart PCR reaksiyonu, 1.5 mM MgCl₂ içeren 1XPCR bufer, 0.2 mM dNTP'ler ve 1 Ünite Tag, 0.3 µM her primer ve 5 µl hedef DNA eklenerek total miktar 40 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR, 94 °C de 5 dk, 94 °C de 1 dk, 60 °C de 1 dk ve 72 °C de 1 dk olmak üzere son üç basamak 40 siklus olarak gerçekleştirildi (BioRad-DNAengine, İ.Ü. Veteriner Fakültesi, Viroloji Abd). PCR ürünleri %1 agaroz (Sigma) ve 0.5 µM/ml ethidium bromide içeren jel içinde, TAE buffer (Qiagen) kullanılarak elektroforez yapıldıktan sonra UV altında incelendi.

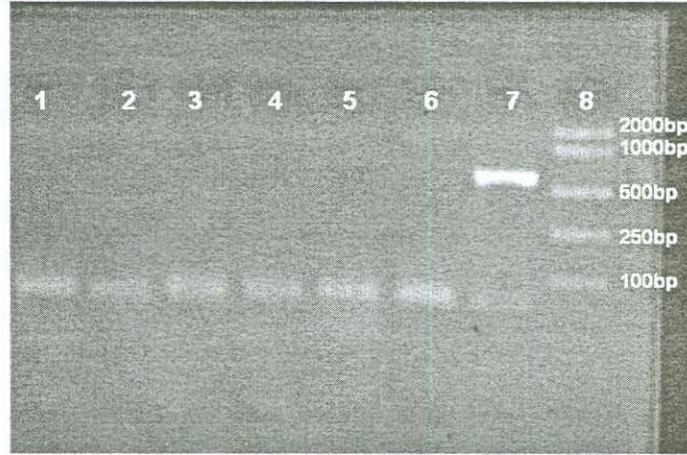
Bulgular

Organoleptik açıdan vakum paketlerde koku ve bombaj tespit edilmedi. Nanodrop cihazı ile yapılan DNA ölçümü sonucunda, ekstraksiyon ürünlerinde DNA miktarı 30-40 ng/µl arasında değiştiği saptandı. İncelenen 70 örnekten elde edilen DNA örneklerinde ve negatif kontrolde hedeflenen *Clostridium estertheticum* DNA'sı (641bp ürün) saptanmadı. Buna karşın pozitif kontrolde, 641 bp PCR ürünü saptandı (Şekil 1).

Tartışma ve Sonuç

Clostridium estertheticum bazı ülkelerde, özellikle İngiltere ve Yeni Zellanda'da, koku ve bombajla karakterize ciddi bozulmalara (blown pack) ve bunun sonucunda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (4, 8). Çalışma ülkemizde, vakum paketli sığır etlerinde *Clostridium estertheticum* araştırılmasına yönelik ilk çalışmadır ve etkenin izolasyonu zor olduğu için moleküler yöntemden yararlanılmıştır. Bu çalışmada PCR'ın tercih nedeni duyarlılığının ve spesifikliğinin yüksek olması ve hızlı bir yöntem olmasıdır. Testin duyarlılığı ve spesifikliğı daha önceki çalışmayla (8) ortaya konulduğu için, bu çalışmada tekrar duyarlılık ve spesifikliğıye yönelik çalışma yapılmamıştır. Ancak primerler ve hedef DNA değişik miktarlarda kullanılarak, test standardize edilmiştir. Bu test için kullanılan primerler Helps ve ark. (8) tarafından Primer 3 programı kullanılarak gen bankasında mevcut *Clostridium estertheticum* sekanslarından

yararlanılıp hazırlanmıştır (8). Primerler M-fold programında denenmiş ve sekonder yapı izlenmemiştir (8). Bu primerler bu çalışmada da kullanılmış ve PCR yapılarak vakum paketli sığır etlerinde bozulmalar görüldüğünde etlerde *Clostridium estertheticum* saptanabileceği gösterilmiştir. Bu sayede ülkemizde bu konuda yaşanan veya yaşanacak problemlerde yardımcı olunabilecektir.



Şekil 1 : PCR ile pozitif kontrolde elde edilen 641 bp ürünün jel elektroforez görüntüsü.

Figure 1 : Gel electrophoresis of 641 bp PCR product seen in positive control. 1-5: İncelenen örneklerden bazıları; 6: Negatif kontrol; 7: Pozitif kontrol; 8: Moleküler belirteçler (100bp, 250bp, 500bp, 1000bp, 2000bp).

Clostridium estertheticum sığır eti sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ancak etkenin moleküler yöntemlerle saptanmasına yönelik yapılan çalışmalar sınırlı sayıda (3, 4, 8). Bu nedenle, söz konusu etken hakkında ülkemizde de çalışmaların yapılmasında yarar vardır. Çalışmada *Clostridium estertheticum* saptanmamış olsa da, vakumlu sığır etlerinde sorun yaşayan et sektörü ve araştırmacılara ışık tutacağı kanısındayız.

İngiltere ve Yeni Zelandada'da yapılan çalışmalarda, etkenin kaynağı araştırılmak üzere vakum paketli kırmızı etler ve çevresel örnekler incelenmiş ve etkenin mezbaha ortamından kaynaklanabileceği saptanmıştır (3, 4, 8). Etkenin mezbaha ortamında ve vakum paketlerde üreyebilmesi için, düşük ısıya ihtiyacı vardır. Bu nedenle soğuk ortamlarda uzun süre tutulan vakum paketli etlerde bozulmalara neden olmaktadır. Çalışmada etkenin saptanamamasının nedeni ülkemizde vakum paketli etlerle ilgili

uygulamalara bağlı olabileceği gibi bu çalışmada incelenen örneklerin problemleri örneklerden olmamasına da bağlı olabilir. Çünkü vakum paketli etlerle ilgili problemler, daha çok uzun süreli muhafaza edilmeleri sonucu ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde vakum paketli etler genellikle uzun süreli soğukta tutulmadan tüketilmektedir. Kötü koku ve bombaj sorununun sık yaşandığı İngiltere ve Yeni Zelanda gibi ülkelerde (4, 8) ise vakum paketli etler uzun süreli tutulabilmektedir.

Sonuç olarak "blown pack" nedeni olabilen etkenler, hijyen koşullarının iyi olmadığı ortam ve işlemeden köken alan ve uzun süreli muhafaza edilen vakum paketli etlerde problemler oluşturmaktadır. Ülkemizde ise, bu sorunun ciddiyetinin daha fazla çalışmalarla ortaya konulmasında yarar vardır. Ayrıca vakum paketli sığır etlerinde yapılacak olan önleme ve kontrole yönelik yasal düzenlemelerde, *Clostridium estertheticum* varlığının araştırılması yönü dikkate alınmalıdır. Etkenin kontrolü için, saptamaya yönelik testlerin mutlaka gündeme alınması ve moleküler yöntemlerden PCR ve real-time PCR yönteminin tercih edilmesinde yarar vardır.

Kaynaklar

1. Bell, R.G.: Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. J Appl Microbiol, 1997; 82: 292-300.
2. Broda, D.M., Saul, D.J., Lawson, P.A., Bell, R.G., Musgrave, D.R.: *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meats. Int J Syst Evol Microbiol, 2000; 50: 107-118.
3. Broda, D.M., Bell, R.G., Boerema, J.A., Musgrave, D.R.: The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled venison. J Appl Microbiol, 2002;93(5):817-824.
4. Broda, D.M., Boerema, J.A., Bell, R.G.: PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. J Appl Microbiol, 2003; 94: 515-522
5. Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E.: The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol, 1994; 44: 812-826.
6. Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M.: Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. J Sci Food Agric, 1989; 49: 473-486.
7. Gill, C.O.: Intrinsic bacteria in meat. J Appl Bacteriol, 1979; 47: 367-378.

8. **Helps, C.R., Harbour, D.A., Corry, J.E.L.:** PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. *Int J Food Microbiol*, 1999; 52: 57–65.
9. **Kalchayanand, N., Ray, B., Johnson, M.C.:** Spoilage of vacuum-packaged beef by *Clostridium*. *J Food Prot*, 1989; 52: 424–426.
10. **McEvoy, J.M., Doherty, A.M., Finnerty, M., Sheridan, J.J., McGuire, L., Blair, I.S., McDowell, D.A., Harrington, D.:** The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Lett Appl Microbiol*, 2000; 30: 390–395.
11. **Nakamura, S., Yamakawa, K., Izumi, J., Nakashio, S., Nishida, S.:** Germinability and heat resistance of spores of *Clostridium difficile* strains. *Microbiol Immunol*, 1985; 29: 113–118.
12. **Newton, K.G., Harrison, J.C.L., Wauters, A.M.:** Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *J Appl Bacteriol*, 1978; 45: 75–82.