

A TİPİ ENTEROTOKSİN OLUŞTURAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN ÇİĞ KÖFTEDE ÜREME VE TOKSİN OLUŞTURMA YETENEĞİNİN BELİRLENMESİ

THE DETECTION OF THE ABILITY TO GROWTH AND ENTEROTOXIN PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN RAW MEAT BALLS

İrfan EROL, Bülent MUTLUER, Leyla VATANSEVER

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET: Çiğ köfte genellikle 1:1 oranında kıyma ve bulgur karışımına değişik oranlarda baharatın katılarak elle yoğurulmasıyla hazırlanan ve yapıldıktan birkaç saat içerisinde tüketilen bir et ürünüdür. Bu çalışmada A tipi enterotoksin oluşturan *S. aureus* suşunun (SEA 100) çiğ köfteye 24 saatlik muhafaza süresi içerisindeki gelişimi ve toksin oluşturma yeteneği incelenmiştir. Bu amaçla deneysel olarak hazırlanan çiğ köfte numuneleri sırasıyla 10^3 , 10^4 ve 10^5 kob/g *S. aureus* suşu ile kontamine edilerek 24 saat süreyle oda ısısında muhafaza edilmiştir. Numunelerde, muhafaza süresinin 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerinde *S. aureus* sayımı ve toksin tayini yapılmıştır. Muhafaza süresi içerisinde numunelerin *S. aureus* sayılarında sınırlı bir azalma gözlenirken numunelerin hiçbirisinde toksin saptanmamıştır.

SUMMARY: Raw meat balls "çiğ köfte" is a special raw meat product, which is made of 50% minced meat and 50% bulgur (boiled and pounded wheat product) and different kind of spices. In general raw meat balls are consumed within a few hours after preparation.

The current study was conducted to determine of the ability of *S. aureus* to growth and toxin production in raw meat balls within 24 hours. For this purpose *S. aureus* (SEA 100) was inoculated at the levels of 10^3 , 10^4 and 10^5 cfu/g to raw meat balls respectively and the samples were stored at room temperature for 24 hours. The growth and toxin production of *S. aureus* examined at 0, 2, 4, 6 and 24 hours. The number of *S. aureus* was reduced only slightly and the production of enterotoxin was not detected in any of the samples.

GİRİŞ

Çiğ köfte başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere Türkiye'nin birçok yöresinde tüketilen geleneksel bir et ürünüdür. Yapımı ve bileşimi bölgesel bazı farklılıklar göstermekle birlikte genel olarak 1:1 oranında yağsız sığır kıyması ve bulgur ile lezzet vermek amacıyla belirli oranlarda katılan tuz, soğan, maydanoz, biber veya domates salçası ile çeşitli baharattan oluşmaktadır. Bileşimine giren maddelerin elle karıştırılması ve yoğurulması ile hazırlanan çiğ köfte, çoğunlukla yapımından hemen sonra tüketilmektedir. Ancak ticari olarak üretildiği restoran ve benzeri toplu tüketim yerlerinde hijyenik olmayan koşullar altında hazırlandığı ve uzun süre bekletildiği bilinmektedir.

Çiğ köftenin hijyenik kalitesi üzerinde yapım yöntemi ve çiğ olarak tüketilmesine bağlı olarak personel hijyeni ve bileşimine giren maddelerin bakteriyel kontaminasyonu önem taşımaktadır. Üretim sırasındaki yetersiz personel hijyeni ve bileşimine giren maddelerin arzu edilmeyen mikroorganizmalarla kontaminasyonu başta stafilkokal gıda zehirlenmeleri olmak üzere potansiyel gıda enfeksiyon ve intoksikasyon riskini gündeme getirmektedir. *S. aureus* doğal çevrede yaygın olarak bulunan ve A, B, C, D, E ve F tipi toksin oluşturan en yaygın gıda zehirlenme etkenlerindedir. Epidemiyolojik çalışmalar stafilkokal gıda zehirlenmelerinin meydana gelişinde gıdaların hazırlanmasında çalışan personelin önemli bir kontaminasyon kaynağı oluşturduğunu ortaya koymuştur.

PULLEN ve GENIGEORGİS (1977) hazırlama aşamasındaki kontaminasyona bağlı olarak çiğ etin 10^2 - 10^4 kob/g *S. aureus* içerdiğini bildirmektedir. Yurdumuzda tüketime sunulan kıyma ve baharatın mikrobiyolojik kalitelerini belirlemek üzere yapılan çeşitli araştırmalar sığır kıymaları ve baharatın koliform bakteriler, *E. coli*, fekal streptokoklar ve *S. aureus* ile önemli derecede kontamine olduğunu göstermektedir (GÖKALP ve ark, 1986; KRAUSE ve ark, 1972; MUTLUER ve ark, 1986; TEKİNŞEN ve SARIGÖL, 1982). KRAUSE ve ark. (1972) kıymalarda koagulaz pozitif *S. aureus* sayısının 10^2 - 10^5 kob/g arasında değiştiğini, TEKİNŞEN ve ark. (1980) Ankara'da satılan hazır kıymaların bakteriyolojik kaliteleri üzerine yaptıkları çalışmada örneklerin ortalama 10^5 - 10^6 kob/g *E. coli* ve stafilkokal ile kontamine olduklarını saptamışlardır. GÖKALP ve ark. (1986)'ı Erzurum'da satışa sunulan kıymaların çoğunluğunda 10^3 - 10^6 kob/g *E. coli* ve *S. aureus* bulmuşlardır. MUTLUER ve ark. (1986) piyasada satılan kırmızı ve karabiberlerin

önemli miktarda enterobakteri, maya, küf ve stafilkoklar ile kontamine olduklarını bildirmektedirler. Ayrıca TEKİNŞEN ve ark. (1982) Elazığ bölgesinde satılan baharatın koliform bakteri ve stafilkoklar ile önemli derecede kontamine olduğunu saptamışlardır.

GÖKTAN ve TUNCEL (1988) çığ köftede katkı maddelerinin salmonellanın üremesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada aerob genel canlı organizma sayısının, üretimden sonra 30. dakika ile 24. saatler arasında $5,6 \times 10^5$ kob/g dan $1,9 \times 10^5$ kob/g değerine düşerken, aynı süreç içerisinde köftenin kendi florasında mevcut *S. aureus* sayısının $2,0-1,4 \times 10^2$ kob/g değerleri arasında değişmeden kaldığını bildirmektedirler. Aynı çalışmada çığ köfte hamuruna inokule edilen *Salmonella typhimurium* sayısı da 48 saatlik muhafaza süresi içerisinde hemen hemen başlangıç düzeyinde kalmıştır.

Bu çalışmada A tipi enterotoksin oluşturan *Staphylococcus aureus* suşu ile kontamine edilen çığ köfte numunelerinde 24 saatlik muhafaza süresi içerisinde *S. aureus*'un üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin incelenmesi ve bu suretle de çığ köftenin stafilkokal gıda zehirlenmeleri yönünden bir risk oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Test Suşunun Hazırlanması

Çalışmada A tipi enterotoksin oluşturan *S. aureus* suşu (SEA 100) Berlin Eyalet Gıda, İlaç ve Salgınlar Enstitüsünden (Landesuntersuchungsinstitut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin) Dr. D. KUSCH'dan sağlanmıştır. Ön denemelerde Brain Heart Infusion Broth'da (BHI) üreme dinamiği ile toksin oluşturma yeteneği saptanan *S. aureus* test suşunun toksin oluşturmadığı 10^3 , 10^4 ve 10^5 kob/ml dilüsyonlar deneysel inokulasyonda kullanılmıştır.

Çığ Köfte Numunelerinin Hazırlanması ve *S. aureus* ile Kontaminasyonu

Çalışmada 1:1 oranında yağsız sığır kıyması ve bulgura tuz ve baharat ilavesiyle usulüne uygun olarak hazırlanan çığ köfte hamuru herbiri 200'er gramlık 4 ayrı gruba ayrılmıştır. İlk üç grup sırasıyla $3,0 \times 10^3$, $3,0 \times 10^4$, $3,0 \times 10^5$ kob/g içerecek şekilde *S. aureus* test suşu suspensiyonu ile kontamine edilirken 4. grup kontamine edilmeksizin negatif kontrol grubu olarak bırakılmıştır. Numuneler 24 saatlik süre boyunca oda ısısında muhafaza edilmişlerdir.

Numunelerin Alınması ve Mikrobiyolojik Analizler

Muhafaza süresinin 0., 2., 4., 6. ve 24. saatlerinde herbir gruptan alınan 10'ar gram numune steril plastik torbalarda 90 ml steril peptonlu su ilavesi ile 2-3 dakika süreyle stomacher'da homojenize edilmiştir. Bu aşamadan sonra steril peptonlu su ile 10^{-8} e kadar hazırlanan desimal dilüsyonardan damla plak yöntemi ile BAIRD-PARKER (MERCK) Agara çift paralelli ekimler yapılmıştır. *S. aureus* sayımında aerob koşullarda 37°C 'de 48 saat inkube edilen plaklarda zon oluşturan koagulaz pozitif koloniler değerlendirilmiştir. Ayrıca aerob genel canlı ve aerob spor oluşturan mikroorganizmaların sayımında Plate Count Agar, aside dirençli laktobasiller için REUTER'in % 0,04 sorbik asitli Laktobazillen-Agar'ı, enterobakterilerin izolasyonunda Violet-Red-Bile-Glucose-Agar (OXOID), koliform bakteriler için Violet-Red-Bile-Lactose-Agar (OXOID), enterokokların sayımında SLANETZ ve BARTLEY Medium (OXOID) ve pseudomonasların izolasyonunda ise Pseudomonas-Agar-Base (OXOID) kullanılmıştır.

Enterotoksin Tayini

Mikrobiyolojik analizlere paralel olarak her bir çığ köfte porsiyonundan alınan 10 g numune 10 ml serum fizyolojik ile homojenize edildikten sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de 9000 g'de 30 dakika süre ile santrifüje edilip 0,20 μm 'lik membran filtreden (Minisart N, SARTORIUS) süzülükten sonra elde edilen filtratlarda A tipi enterotoksin tayini Reversed Passive Latex Agglutination Test kiti (SET-RPLA, TD 900, OXOID) ile gerçekleştirilmiştir (PARK ve SZABO, 1986).

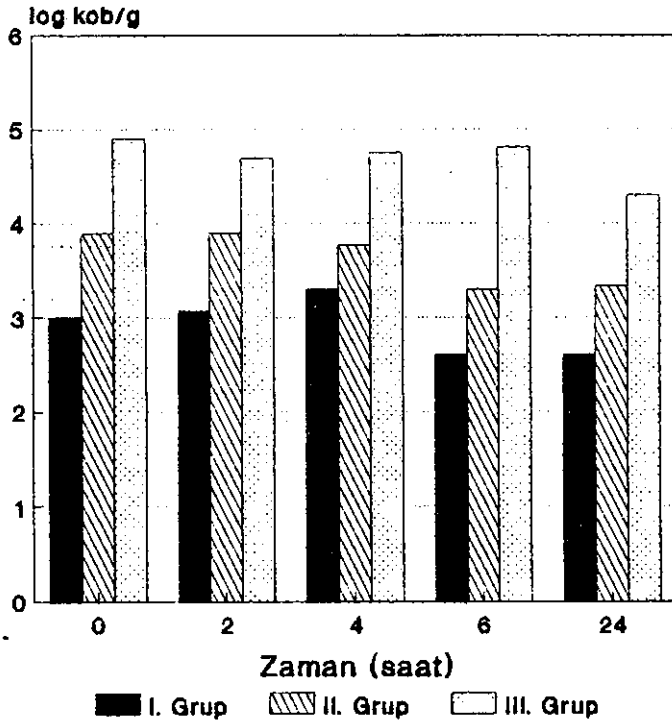
Fiziksel-Kimyasal Analizler

Çiğ köfte numunelerinin pH değerleri elektronik pH-Metre (PORTAMESS 751, KNICK) ile ölçülürken tuz tayini Mohr metodu, rutubet tayini ise kurutma fırınında yapılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI

Çiğ Köfte Mikroflorasının Gelişimi

Çiğ köfte yapımında kullanılan kıyma ve baharat numunelerinin hiçbirinin başlangıçta *S. aureus* ile kontamine olmadığı saptanmış, ayrıca kontrol grubu ile diğer deney grupları arasında mikroflora yönünden önemli fark görülmemiştir. Çiğ köfte numunelerinde başlangıçta $6,0 \times 10^5$ kob/g olan aerob genel canlı sayısı 24 saatlik muhafaza süresi sonunda $1,8 \times 10^7$ kob/g'a ulaşırken aerob spor oluşturan mikroorganizmalar 10^5 kob/g seviyesinde değişmeden kalmıştır. Aside dirençli laktobasiller aerob genel canlı sayısına paralel bir artışla $5,5 \times 10^3$ kob/g'dan $1,2 \times 10^7$ kob/g'a ulaşarak çiğ köftenin dominant florasını oluşturmuşlardır. Hijyen indikatörü olarak kabul edilen enterobakteriler ve koliformların sayısı da sırasıyla $1,0 \times 10^4$ ve $3,4 \times 10^3$ 'ten ortalama $8,0 \times 10^5$ kob/g'a ulaşmıştır. Enterokoklar $2,0 \times 10^2$ kob/g'dan $1,2 \times 10^3$ kob/g'a yükselirken muhafaza ısısı ve muhtemelen su aktivitesindeki düşüğe bağlı olarak pseudomonasların sayısında muhafaza süresi sonunda sınırlı bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 1. A tipi enterotoksin oluşturan *S.aureus*'un çiğ köftedeki gelişimi

S. aureus'un Gelişimi

Başlangıçta $3,0 \times 10^3$, $3,0 \times 10^4$ ve $3,0 \times 10^5$ kob/g seviyesinde *S. aureus* ile kontamine edilen I., II. ve III. grup çiğ köfte numunelerinin yapımından hemen sonra (0. saat) gerçekleştirilen ekimlerde sırasıyla $1,0 \times 10^3$, $8,0 \times 10^3$ ve $8,0 \times 10^4$ kob/g değerlerinde *S. aureus* bulunmuştur. Genel olarak bütün gruplardaki *S. aureus* sayısı muhafaza süresi içerisinde sınırlı bir şekilde azalarak 24. saatte $2,0 \times 10^2$ (I. grup), $2,2 \times 10^3$ (II.grup) ve $2,0 \times 10^4$ kob/g (III.grup) seviyesine düşmüştür (Şekil 1.).

Enterotoksin Oluşumu

Mikrobiyolojik analizlere paralel olarak yapılan enterotoksin testinde *S. aureus*'un numunelerin hiçbirinde toksin oluşturmadığı saptanmıştır.

Fiziksel-Kimyasal Analiz Bulguları

Başlangıçta 5,7 olan pH değeri 24 saatlik süre sonunda 6,0-6,2 değerlerine yükselirken rutubet miktarları aynı süre içerisinde %60'tan %58'e düşmüştür. Tuz miktarı ortalama %1,9 olarak bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

A tipi enterotoksin oluşturan *S. aureus* suşu ile farklı düzeylerde (10^3 , 10^4 ve 10^5 kob/g) kontamine edilen ve oda ısısında 24 saat muhafaza edilen çığ köfte numunelerinde *S. aureus* sayısı muhafaza süresi içinde sınırlı bir azalma göstererek sırasıyla $2,0 \times 10^2$, $2,2 \times 10^3$ ve $2,0 \times 10^4$ kob/g'a düşmüştür. Ayrıca grupların hiçbirinde enterotoksin saptanmamıştır.

Çığ köfte numunelerinin pH, rutubet ve tuz konsantrasyonu bakımından *S. aureus* üremesine uygun seviyelerde bulunmasına karşın, *S. aureus* sayısındaki sınırlı azalma stafilocokların zayıf kompetitör özellikleri dolayısıyla ortamda diğer mikroorganizmaların dominant olduğu durumlarda iyi üreyemediklerine bağlanabilir. Bu bulgular CASMAN ve ark. (1963)'ün araştırma sonuçları ile uyum sağlamaktadır. Muhafaza süresi içinde aside dirençli laktobasiller çığ köfte içerisinde hızla üreyerek ortalama $1,2 \times 10^7$ kob/g seviyesine ulaşmış ve dominant flora komponentlerini oluşturmuşlardır. Laktobasillerin *S. aureus* üzerine olan inhibitör etkileri birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (EROL, 1991; HAINES ve HARMON, 1973; RACCACH, 1981).

CASMAN ve ark. (1963)'ü 30°C 'de 72 saat muhafaza sonunda kıymalarda, *S. aureus*'ün hiç üremediği yada çok az ürediğini bildirmektedirler. EROL (1991) 10^5 kob/g *S. aureus* ile kontamine edilen sucuk hamurunda *S. aureus*'ün 20°C 'lik olgunlaştırma ısısında büyük ölçüde değişmeden kaldığını saptamıştır. GÖKTAN ve TUNCEL (1988) çığ köftenin kendi mikroflorasında başlangıçta mevcut $2,0 \times 10^2$ kob/g *S. aureus* sayısının sınırlı ölçüde azalarak 48 saat sonra $0,8 \times 10^2$ kob/g'a düştüğünü bildirmektedirler. Bu çalışma sonuçları GÖKTAN ve TUNCEL (1988)'in bulguları ile uyum göstermektedir.

Çığ köfte numunelerinin hiçbirinde enterotoksin saptanmamış olması *S. aureus*'ün hiçbir grupta toksin oluşturabileceği $>10^6$ - 10^7 kob/g seviyeye ulaşmadığına bağlıdır (HAHN, 1989).

Ayrıca araştırmacılar, çığ köftenin bileşimine giren soğan, tuz ve bazı baharatın kimyasal içerik ve mikroorganizma yüklerinin *S. aureus*'ün üremesinin baskı altına alınmasında etkili olabileceğini bildirmektedirler (SALZER, 1982; SHELEF, 1983).

Sonuç olarak bu çalışma ile *S. aureus*'ün çığ köftede 24 saatlik muhafaza süresi içerisinde toksin oluşturacak düzeyde üreyemediği ve toksin oluşturmadığı saptanmış ise de, sağlık koruma önlemleri açısından çığ köftenin bileşimine giren kıyma ve baharatın hijyenik kalitesinin iyi olmasına ve yapım sırasında personel hijyenine özen gösterilmesi gerekli görülmektedir.

KAYNAKLAR

- CASMAN, E.P., BENNET, R.W. McCOY, D.W. and BRANDLEY, P., 1963. Appl. Microbiol. 11:498-500. In: Foodborne Bacterial Pathogens; Ed by M.P. Doyle. (1989). Marcel Dekker, Inc. NY and Basel, 475.
- EROL, İ., 1991. Der Einfluss von Starterkulturen auf das Wachstum pathogener Keime in türkischer Rohwurst. Diss. Vet. Med., FU Berlin.
- GÖKALP, H.Y., YETİM, H., KARACAN, H., 1986. Some saprophytic and pathogenic bacteria levels of ground beef sold in Erzurum, Turkey. 1986. In: Proceeding of 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. 26-30 May, Berlin, 310-313.
- GÖKTAN, D., TUNCEL, G., 1988. Effect of ingredients on quantitative recovery of Salmonella in raw meat balls. Meat Science., 22: 155-160.
- HAHN, G., 1989. Staphylococcus aureus und Staphylokokken-Enterotoxine. In: Pathogene Mikroorganismen. Ed. W. Heeschen, Behr's Verlag. 97-112.
- HAINES, W.C. and HARMON, L.G., 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of Staphylococcus aureus and production of enterotoxine. Appl. Microbiol. 25:3:436-441.
- KRAUSE, P., SCHMOLDT, R., TOLGAY, Z. and YURTYERİ, A. 1972. Mikrobiologische und serologische Untersuchungen an Lebensmitteln in der Türkei. Fleischwirtsch. 1:83-86.
- MUTLUER, B., ÖZTAŞIRAN, İ., ŞARER, E., AKKUŞ, M., ERSEN, S., KAYA, B., 1986. İyonize radyasyonla baharatların sterilizasyonu. I-Gamma ışınlarının karabiber ve kırmızıbiberin mikrobiyel flora, uçucu yağ ve duyuşal niteliklerine etkisi. A.Ü. Vet. Fak. Derg. 33,3:464-476.
- PARK, C. and SZABO, R., 1986. Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxins A,B,C and D in foods. Can. J. Microbiol. 32:723-727.
- PULLEN, M.M. and GENIGEORGIS, C., 1977. A study of coagulase positive saphylococci in salami before fermentation. J. Food Protect. 40:704-707.
- RACCACH, M., 1981. Control of Staphylococcus aureus in dry sausage by a newly developed meat starter culture and phenolotype antioxidants. J. Food Protect. 44,9:665-669.
- ROSE, S., BANKES, P. and STRINGER, M., 1989. Detections of staphylococcal enterotoxins in dairy, products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit. Int. J. Food Microbiol. 8:65-72.
- SALZER, U.J., 1982. Antimikrobielle Wirkung einiger Gewürzextrakte und Würzmischungen. Fleischwirtsch. 62:885-887.
- SHELEF, L.A., 1983. Antimicrobial effects of spices. J. Food Safety. 6:29-44.
- TEKİNŞEN, O.C., SARIGÖL, C., 1982. Elazığ yöresinde tüketime sunulan bazı öğütülmüş baharatların mikrobiyel florası. F.Ü.Vet. Fak. Derg. 1-2,27:45-63.
- TEKİNŞEN, O.C., YURTYERİ, A., MUTLUER, B., 1980. Ankara'da satılan hazır kıymaların bakteriyolojik kalitesi. A.Ü. Vet.Fak.Derg. 1-2,(27):46-63.