

## ÇİĞ SÜTLERDEN HAREKETLİ AEROMONAS TÜRLERİNİN İZOLASYONU

### ISOLATION OF MOTILE AEROMONADS FROM RAW MILK

Mehmet Akan<sup>1</sup> K.Serdar DİKER<sup>1</sup> Celalettin KOÇAK<sup>2</sup> Murat YILDIRIM<sup>1</sup> Şenay BOZKURT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü, ANKARA

**ÖZET:** Araştırmada, 80 adet çiğ inek sütü, hareketli aeromonaslar yönünden incelendi. İncelenen sütlerin 23'ünden (% 28,7) hareketli Aeromonas türleri izole edildi. İzole edilen 23 adet suşun, 15'i (% 65,3) *A. hydrophila*, 7'si (% 30,4) *A. sobria* ve 1'i (% 4,3) *A. caviae* olarak tanımlanmıştır. Hareketli aeromonasların patojenitesinde önemli rol oynadığı düşünülen biyokimyasal özelliklerinden, Voges Proskauer testinde 19 (% 82,6), lizin dekarboksilaz testinde 16 (% 69,5) suşun pozitif olduğu saptandı.

**SUMMARY:** In this study, 80 raw milk samples from cows were examined for motile aeromonads. Motile aeromonads were isolated from 23 (28.7 %) of milk samples. Out of 23 isolates, 15 (65.3 %) were identified as *Aeromonas hydrophila* 7 (30.4%) as *A. sobria* and 1 (4.3 %) as *A. caviae*. Voges Proskauer and lysine decarboxylase tests which are thought to play important roles in the pathogenicity of motile aeromonads, 19 (82.6 %) and 16 (69.5 %) strains were found to be positive, respectively.

#### GİRİŞ VE KAYNAK TARAMASI

Hareketli Aeromonas türleri (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*) doğada, insanlarda, hayvanlarda ve hayvansal kaynaklı gıdalarda bulunabilen mikroorganizmalardır. Son yıllarda bu grup bakteriler, insanların gastrointestinal sistem hastalıkları, yara infeksiyonları ve septisemilerde primer etken olarak izole edilmektedir (JANDA ve BRENDEN, 1987; GRAY ve GRIFFITHS, 1990). Ayrıca bu etkenlerin, hayvanların sindirim sistemi florasında buldukları da bildirilmektedir (GRAY, 1989; GRAY ve ark. 1990). Akan (1993), çiftlik hayvanlarının dışkılarında hareketli Aeromonas türlerinin varlığını belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, sığır dışkılarında % 16,6, tavuk dışkılarında % 17,5 oranında izolasyon gerçekleştirmiştir. STERN ve ark. (1987), sığır, domuz, koyun ve hindi dışkılarında hareketli aeromonasları düşük oranda saptamışlardır. JINDAL (1993) ise, ishali ve ishalsiz sığır, tavuk, koyun ve keçi dışkılarında hareketli aeromonasların varlığını belirlemiştir.

Hareketli Aeromonas türleri hayvansal orijinli gıdalardan sıklıkla izole edilmektedir. PALUMBO ve ark. (1989), deniz ürünlerinde, çiğ sütlerde, tavuk etlerinde ve kırmızı etlerde bu mikroorganizmaların varlığını bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, OKREND ve ark. (1987), inceledikleri tavuk ve sığır etlerinin tümünden hareketli Aeromonas türlerini izole etmişlerdir. Hayvansal orijinli gıdalardaki kontaminasyonun kaynağı, bu mikroorganizmaları içeren sular ve hayvan dışkıları olduğu düşünülmektedir (TERMSTRÖM ve MOLIN, 1987; PALUMBO ve ark. 1989). Sütlerden hareketli Aeromonas türlerinin izolasyonu üzerinde az sayıda araştırma vardır (KIELWEIN ve ark. 1974; GRAY ve ark. 1990). KIELWEIN ve ark. (1974), üzerinde çalıştıkları süt örneklerinin % 17,1'den izolasyon gerçekleştirmişlerdir. Benzer bir çalışmada, GRAY ve ark. (1990), inceledikleri sığır sütlerinin % 25'inde hareketli Aeromonas türlerini saptamışlardır.

Bu çalışmada, çiğ inek sütlerinde hareketli Aeromonas türlerinin sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

#### MATERYAL VE YÖNTEM

##### Materyal

Bu çalışmada, materyal olarak A.Ü. Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Bölümü Eğitim Araştırma ve Uygulama İşletmesi ile Atatürk Orman Çiftliği Süt İşletmesi'ne tanker ve güğümlerle getirilen çiğ inek sütlerinden alınan 80 adet örnek kullanıldı. Örnekler, steril koşullarda steril tüplere yaklaşık 10 ml olarak alındı. Bu örnekler bir saat içinde laboratuvara ulaştırılarak hareketli Aeromonaslar yönünden incelendi.

Araştırmada ön zenginleştirme amacıyla alkali peptonlu su (APS, pH 8,4), hareketli Aeromonas suşlarının izolasyonu amacıyla ampisilinli kanlı agar (AKA, 10 mg/L ampisilin, % 5 koyun kanı) kullanıldı. İzolatların biyokimyasal özelliklerinin incelenmesinde ve pasajlarında, sıvı besiyeri olarak Trypticase soy broth'tan (TSB, Oxoid) faydalanıldı.

### Yöntem

**Hareketli Aeromonas türlerinin izolasyon ve identifikasyonu:** Steril koşullarda toplanan örnekler, ön zenginleştirme amacıyla APS içinde (1/10 oranında) 28°C'de bir gece bekletildi. Ön zenginleştirme sonunda örnekler, ampisilinli kanlı agara ekildi ve 24 saat 37°C'de aerobik koşullarda inkubasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üreyen mikroorganizmalar hareketli Aeromonas türleri yönünden incelendi.

AKA'da üreyen Aeromonas şüpheli koloniler seçilerek, Gram yöntemi ile boyandı. Gram negatif çomakların kolonilerinden TSB'ye ekimler yapılarak bir gece 37°C'de inkubasyona bırakıldı. Sıvı besiyerinde üreme özelliği incelenerek lam-lamel arası hareket muayenesi yapıldı. Hareketli Gram negatif çomaklar, biyokimyasal özelliklerine göre identifiye edildi (POPOFF, 1984). Hareketli Aeromonasları diğer bakterilerden ayırmak için, katalaz, oksidaz, oksidasyon/fermentasyon (O/F, glukoz ile), tuzlu (% 6) ve tuzsuz buyyonda üreme, O/129'a (2-4 diamino 6-7 diisoprophyl piteridine) dirençlilik ve mannitol fermentasyonu kriterleri kullanıldı. Hareketli Aeromonasların tür düzeyinde identifikasyonları, Tablo 1'de gösterilen testler ile yapıldı.

**Tablo 1. Hareketli Aeromonas Türlerinin İdentifikasyonunda Kullanılan Ayrııcı Testler**

Testler	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. sobria</i>	<i>A. caviae</i>
Eskülin hidrolizi	+	-	+
Arabinoz fermentasyonu	+	-	+
Salisin fermentasyonu	+	-	+
Glokuzdan gaz	+	+	-
Sisteinden H <sub>2</sub> S	+	+	-

**Patojenite ile ilgili biyokimyasal testler:** Hareketli Aeromonas türlerinde patojenite ile ilgili olduğu düşünülen Voges Prouskauer (VP) testi, %1 oranında glukoz içeren TSB'de üretilen mikroorganizma kültürü üzerine % 40'lık KOH'ten 1 ml, % 5'lik alfa-naftol eriginden 3 ml ilave edilerek; lizin dekarboksilaz (LDC) testi ise lizin dekarboksilaz besiyerinde (Merck) yapıldı. Test sonuçları, besiyerlerinde gözlenen renk değişimine göre değerlendirildi (ARDA, 1978).

### ARAŞTIRMA BULGULARI

**İzolasyon ve identifikasyon bulguları:** İncelenen 80 adet çiğ süt örneğinin 23'ünden (% 28,7) hareketli Aeromonas türleri izole edildi. İzole edilen 23 adet suşun, 15'i (%65,3) *A. hydrophila*, 7'si (% 30,4) *A. sobria* ve 1'i (% 4,3) *A. caviae* olarak identifiye edildi. *A. hydrophila* olarak identifiye edilen 15 suşun 14'ü (% 93,3) ve 7 *A. sobria* suşunun tümü kanlı agarda hemolitik koloniler oluşturdu. İzole edilen *A. caviae* suşunun non-hemolitik olduğu saptandı.

İzole edilen 23 hareketli Aeromonas suşunun tümünün Gram negatif ve aktif hareketli olduğu saptandı. Tüm suşların, oksidaz ve katalaz testinde pozitif, O/F testinde fermentatif, O/129'a dirençli olduğu belirlendi. İzole edilen tüm suşlar tuz içermeyen buyyonlarda üreme gösterirken, hiçbiri % 6 tuz içeren buyyonda üremedi. İzolatların tümünün, mannitolü fermente ettiği gözlemlendi. İzole edilen hareketli Aeromonasların tür düzeyinde identifikasyonları için yapılan testlerin sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Patojenite ile ilgili biyokimyasal testlerin bulguları:** Hareketli Aeromonas türlerinin patojenitesi ile ilgili olduğu düşünülen iki testin sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. İki biyokimyasal test yönünden incelenen 23 suşun 19'u (% 82,6) VP testinde, 16'sı (% 69) LDC testinde pozitif bulundu. *A. hydrophila* suşlarının 13'ü (% 86,6) VP, 11'i (% 73,3) LDC testinde pozitif sonuç verirken, *A. caviae* suşu hem VP hem

de LDC testinde negatif bulundu. *A.sobria* suşları ise VP testinde % 85,7, LDC testinde % 71,4 oranında pozitif bulundu.

**Tablo 2. İzole Edilen Hareketli Aeromonasların Tür İdentifikasyonunda Kullanılan ve Patojeniteyle İlgili Testlerin Sonuçları**

Testler	<i>A.hydrophila</i> n: 15 (% +)	<i>A.sobria</i> n: 7 (% +)	<i>A.caviae</i> n: 7 (% +)
İdentifikasyon testleri			
Eskülin hidrolizi	15 (% 100)	0 (% 0)	1 (%100)
Arabinoz fermentasyonu	14 (% 93,3)	0 (% 0)	1 (%100)
Salisin fermentasyonu	15 (% 100)	0 (% 0)	1 (%100)
Glukozdan gaz	15 (% 100)	7 (%100)	0 (%0)
Sisteinden H <sub>2</sub> S	15 (% 100)	7 (%100)	0 (%0)
Patojenite ile ilgili testler			
Voges Proskauer	13 (% 86,6)	6 (%85,7)	0 (%0)
Lizin dekarboksilaz	11 (% 73,3)	5(%71,4)	0 (%0)

(% 85,7) VP testinde, *A.hydrophila* suşlarının 11'i (% 73,3), *A.sobria* suşlarının 5'i (% 71,4) LDC testinde pozitif olarak bulundu. *A.caviae* suşunun hem VP hem de LDC testinde negatif olduğu saptandı. LALLIER ve HIGGINS (1988), klinik vakalardan izole ettikleri suşların % 78'inde LDC testinin % 66,6'sında VP testinin pozitif olduğunu bulmuşlardır. KIROV ve ark. (1986), hareketli Aeromonas suşlarında sitoksin üretimi ile LDC testi pozitifliği arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar, sitotoksin pozitif suşlarda % 80 oranında LDC pozitifliği saptamışlardır. Araştırmacılar, klinik vakalardan izole edilen suşlarda, LDC ve VP testinde pozitiflik oranının yüksek olmasının bu iki biyokimyasal özellik ile patojeniteyi belirleyen diğer faktörler arasında bir ilişkinin olduğunu düşünmektedirler. Bu çalışmada, izole edilen hareketli Aeromonas suşlarında saptanan yüksek LDC ve VP oranı, bu suşların insanlar için muhtemel bir patojen olabileceğini göstermektedir.

Hayvansal orijinli gıdalarda yüksek oranda hareketli Aeromonasların bulunması, pişirilmemiş hayvansal ürünlerin tüketilmesi ve bu ürünlerin işlenmesi esnasında insan sağlığı açısından bir risk oluşturmaktadır. Hayvansal orijinli gıdalardan izole edilen suşlar ile klinik vakalardan izole edilen suşların birbirlerine fenotipik olarak yakınlık göstermesi, gıdalarda kontaminasyonun azaltılması konusunda ilave tedbirlerin alınmasını zorunlu kılmaktadır.

Hayvansal orijinli gıdaların hareketli Aeromonaslarla bulaşması, bu ürünlerin değişik aşamalarda bu etkenleri içeren hayvan dışkılarıyla kontamine olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, öncelikle sütlerin sağım esnasında bu mikroorganizmalarla kontaminasyonun engellenmesi ve daha sonraki aşamada süt işletmelerinde özellikle sanitasyon kurallarına uyulması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, çiğ sütlerden izole edilen 23 hareketli Aeromonas suşunun biyokimyasal özellikleri incelenerek identifikasyonları yapıldı. Ayrıca izole edilen suşların patojenitesinde önemli rol oynadığı düşünülen iki biyokimyasal özellikleri incelendi.

Çalışmada incelenen 80 adet çiğ süt örneğinden 23 adet (% 28,7) hareketli Aeromonas suşu izole edildi. Örneklerden en yüksek oranda *A.hydrophila* (% 65,3) izole edilirken bunu *A.sobria* (% 30,4) ve *A.caviae* (%4,3) izledi. KIELWEIN ve ark. (1974) inceledikleri çiğ sütlerin % 17,1'inde, GRAY ve ark. (1990) ise, % 25'inde hareketli Aeromonas türlerini saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen izolasyon oranı, diğer iki çalışmadaki orandan yüksek bulunmuştur.

Hareketli Aeromonas suşlarının patojenitesi ile ilgili olarak iki biyokimyasal testin önemli olduğu düşünülmektedir. Bu testler VP ve LDC testleridir. Bu çalışmada *A.hydrophila* suşlarının 13'ü (% 86,6), *A.sobria* suşlarının 6'sı

**KAYNAKLAR**

- AKAN, M. 1993. Hayvanlardan ve çevresel kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinin biyokimyasal, toksijenik, enzimatik ve yüzey özellikleri. Doktora Tezi, A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- ARDA, M. 1978. Genel Bakteriyoloji. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayın No. 342. A.Ü. Basımevi, Ankara. 521 sayfa.
- GRAY, S.J. 1989. Some observations on the faecal carriage of mesophilic *Aeromonas* species in cows and pigs. *Epidemiol. Infect.* 103: 523-537.
- GRAY, S.J., A.GRIFFITHS, 1990. Observation on *Aeromonas* species isolated from human faeces. *J. Infect.* 20: 267-268.
- GRAY, S.J., D.J.STICKLER, T.N.BRYANT, 1990. The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from farm animal and their environment. *Epidemiol. Infect.* 105: 277-294.
- JANDA, J.M., R.BRENDEN, 1987. Importance of *Aeromonas sobria* in *Aeromonas bacteraemia*. *J. Infect. Dis.* 155: 589-591.
- JINDAL, N., S.R.GARG, A.KUMAR, 1993. Comparison of *Aeromonas* spp. isolated from human, livestock and poultry faeces. *Isr. J. Vet. Med.* 48: 80-83.
- KIELWEIN, Von G., R.GERLECH, H.JOHNE, 1974. Untersuchungen über das vorkommen von *Aeromonas hydrophila* in rohmilch. *Archive für Lebensmittelhygiene.* 25: 34-38.
- KIROV, S.M., B.REES, R.C.WELLOCK, J.M.GOLDSMID, A.D.VAN GALEN, 1986. Virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in relation to source and biotype. *J. Clin. Microbiol.*, 24: 827-834.
- LALLIER, R., R.HIGGINS, 1988. Biochemical and toxigenic characteristics of *Aeromonas* spp. isolated from diseased mammals, moribund and healthy fish. *Vet. Microbiol.*, 18: 584-590.
- OKREND, A.J.G., B.E.ROSE, B.BENNETT, 1987. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas* species in retail poultry, beef and pork. *J.Food. Prot.* 50: 509-513.
- PALUMBO, S.A., M.M.BENCIVENGO, F.D.CORRAL, A.C.WILLIAMS, R.L.BUCHANAN, 1989. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* 27: 854-859.
- POPOFF, M. 1984. *Aeromonas*. "in, *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol. 1, Eds. M.R. Krieg ve J.G. Holt", Williams and Wilkins. Baltimore/London. 795 sayfa.
- STERN, N.J., E.S.DRAZEK, S.W.JOSEPH, 1987. Low incidence of *Aeromonas* spp. in livestock faeces. *J. Food Protect.* 50: 66-69.
- TERNSTRÖM, A., G.MOLIN, 1987. Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Food Protect.* 50: 141-146.