

Çiğ Sütte Koliform Grubu Bakteri Florası Üzerinde Araştırmalar

Doç. Dr. Erol ERGÜLLÜ

E. Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü — İZMİR

Ö Z E T

Araştırmada 3 farklı mandıradan alınan 21 çiğ süt örneğinden 129 koliform grubu bakteri suşu izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Örneklerde en fazla *Ent. aerogenes* (% 32.6) ve *E. coli* (% 19.4) bulunmuştur. *Klebsiella*, *Citrobacter* ve *Ent. aerogenes* ise daha düşük oranlarda belirlenmiştir.

1 — G İ R İ Ş

Kaliteli mamül üretiminde ham madde olan sütün bakteri florası önemli bir rol oynar. Bu flora içerisinde yer alan koliform grubu bakteriler, özellikle peynir teknolojisinde zararlı etkileri nedeniyle ön plânda tutulurlar. Zira bu gruptaki bakteriler peynirlerde tat ve aromayı değiştirmekte, peynir yapısını bozmakta ve çeşitli sorunlar ortaya koymaktadırlar.

Bazı ülkelerde yapılan çalışmalar çiğ sütteki mikrofloranın hijyenik koşullara göre çok büyük farklılık gösterdiğini ve peynir teknolojisinde kullanılan sütün genellikle ml'de 10^4 ile 10^6 arasında mikroorganizma içerdiğini, buna karşın koliform grubu bakterilerin daha düşük oranda bulunduğunu ve 10^2 ile 10^5 arasında değiştiğini ortaya koymuştur (4, 5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22).

Çalışmada, bölgemizde beyaz peynir yapan mandıralara gelen çiğ sütlerde toplam mikroorganizma yanında, koliform grubu bakterilerin miktarını ve bu grup içerisinde yer alan türleri belirlemek ve peynir teknolojisinde kullanılan ham materyalin hijyenik kalitesini ortaya koymak amaç güdülmüştür.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Örnekler İzmir civarındaki 3 farklı mandıraya gelen çiğ sütlerden alınmış ve ayda bir defa olmak üzere toplam 21 örnek materyal olarak incelenmiştir. Örneklerin alınması, mandıraların peynir yapımına başladıkları Şubat ayı ile, peynir yapımına son verdikleri Eylül ayı arasında yapılmıştır.

Örnekler steril pipetlerle, steril ve kapaklı örnek alma şişelerine alınmış (yakriben 200 - 250 ml) ve $4 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de laboratuvara getirilerek hemen analiz edilmişlerdir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin analize hazırlanması

Örnek alma şişelerinde iyice karıştırılan örneklerden steril pipetlerle 10'er ml alınmış ve içerisinde 90 ml steril peptonlu tuz çözeltisi bulunan kapaklı şişelere aktarılmıştır. Şişeler 25 kez çalkalanmış ve örneğin 10^{-3} seyreltmesi yapılmıştır. Aynı işleme uygun seyreltme oranı elde edilinceye dek devam edilmiştir.

2.2.2. Toplam mikroorganizma sayısının saptanması

Toplam mikroorganizma sayısının saptanması için Plate - Count - agar (pepton - maya - glikoz - agar) kullanılmıştır. Örneğin 10^{-3} ile 10^{-8} arasındaki seyreltmelerinden steril pipetlerle 1'er ml alınarak 45°C 'deki besi ortamı ile karıştırılmıştır. Üç seri halinde ekim yapılan petri kapları $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ve 72 ± 2 saat sürede inkübasyona bırakılmışlardır. 30 ile 300 arasında koloni içeren petri kaplarında sayım yapılmış ve seyreltme oranı dikkate alınarak 1 ml örnekte toplam mikroorganizma sayısı belirlenmiştir.

2.2.3. Koliform grubu mikroorganizmaların saptanması

Koliform grubu mikroorganizmaların saptanması için Kristalvioleneutral kırmızısı - safra - agar (Violet - red - bile - agar), MacConcey - agar ve Desoxycholat - laktoz - agar olmak üzere 3 ayrı selektif besi ortamı kullanılmıştır. Daha önceden hazırlanmış besi ortamlarına ekim steril cam çubukla (drigalski) yayma şek-

linde yapılmış ve petri kapları $30 \pm 1^\circ$ 'de 24 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmış ve tanım için farklı görünümdeki kolonilerden pepton - maya - glikoz buyyonuna aşılama yapılmıştır.

24 saatlik inkübasyondan sonra buyyondan öze ile alınarak, izole edildikleri besi ortamlarına çizgi şeklinde ekim yapılmış ve gelişen kolonilerin aynı görünümde olup olmadıkları belirlenmiştir. Safılaştırma işleminden sonra kültürlerin 24 saatlik buyyonundan gram boyama yapılmış ve gram özellikleri ile hücre şekilleri saptanmıştır.

2.2.4. Kültürlerin tanımı

Çubuk şeklinde ve gram negatif özellik gösteren kültürlerde cytochromoksidaz - testi ile Hugh - Lefson besi ortamında glikoz fermentasyon testi uygulanmış ve glikozu fermentatif olarak parçalayan ve cytochromoksidaz testinde mavi renk oluşturmayan (negatif reaksiyon) ve bu testlere göre Enterobakterilerin dahil olan kültürlerin tanımı için farklı niteliklerinden yararlanılmış ve tanımda çeşitli literatürlerde belirtilen yöntemler ele alınmıştır (2, 3, 8, 9, 12, 15, 19, 23).

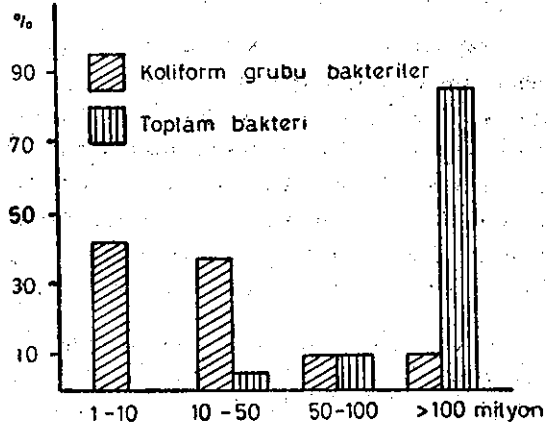
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Toplam mikroorganizma ve koliform grubu bakterileri sayısının mandıralara göre değişimi çizelge 1'de verilmiştir. Çiğ süt örneklerindeki toplam mikroorganizma sayısı mandıralara göre çok büyük farklılık göstermiş ve en az $33.000 \times 10^3/\text{ml}$ ile en fazla $820.000 \times 10^3/\text{ml}$ arasında değişmiştir. Tüm örneklerin ortalama-

sı olarak $298.604 \times 10^3/\text{ml}$ mikroorganizma sayısı saptanmıştır.

Koliform grubu bakterileri sayısı ise genellikle daha düşük oranda belirlenmiş, ancak tüm örneklerde bu gruptaki bakterilerin bulunduğu gözlenmiştir. Koliform grubu bakterilerin sayısı en düşük $1.000 \times 10^3/\text{ml}$, en fazla ise $167.400 \times 10^3/\text{ml}$ olarak belirlenmiş ve örneklerde ortalama $31.473 \times 10^3/\text{ml}$ koli sayısı elde edilmiştir.

Örneklerdeki bakteri sayısının dağılımı incelendiğinde, gerek toplam bakteri ve gerekse koliform grubu bakteri sayısının farklı bir görünüm verdiği ortaya çıkmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1 : Toplam mikroorganizma ile koliform bakterilerin dağılımı

Koliform grubu bakterilerinin % 42.9'u 1 - 10 milyon arasında değişim gösterdiği halde, toplam bakteri sayısı bakımından örneklerin % 85.7'sinin 100 milyonun üzerinde bulun-

Çizelge 1 : Toplam mikroorganizma (T.m.s.) ile koliform grubu bakterileri sayısının (K.b.s.) çiğ süt örneklerindeki değişimi (ml'de 1000 olarak).

Mandıra	A		B		C	
	T.m.s.	K.b.s.	T.m.s.	K.b.s.	T.m.s.	K.b.s.
Şubat	62.000	2.590	240.000	6.000	85.000	1.800
Mart	33.000	1.190	230.000	9.000	140.000	3.000
Nisan	450.000	16.000	190.000	7.000	420.000	1.000
Mayıs	430.000	20.000	240.000	24.000	150.000	4.050
Haziran	300.000	67.200	180.000	16.500	270.000	60.000
Temmuz	170.000	19.700	400.000	44.500	290.000	41.400
Ağustos	600.000	167.400	820.000	17.000	570.000	137.000

duğu görülmektedir. Bakteri sayısının bu denli yüksek bulunması, diğer araştırma sonuçları (5, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 18, 20, 21) ile farklılık göstermektedir. Bu durumun, ülkemizde süt üretiminde gereken hijyenik koşulların yerine getirilmediğinden ve sütün işletmelere taşınması sırasında soğuk zincirin eksikliğinden ve dolayısıyla mikroorganizma sayısının özellikle yaz aylarında hızla artışından kaynaklandığı kabul edilebilir. Ancak peynire işlenecek sütün yüksek sayıda mikroorganizma içermesi, kalitesini de direkt olarak etkilemektedir. Bu konuda Busse'nin (1) yaptığı çalışmada belirlendiği gibi sütün ml'sinde 10 milyon mikroorganizma bulunması, madde değişimi için sınır kabul edilmekte ve sayının 100 milyonun üzerine çıkması halinde ise en yüksek düzeyde madde değişiminin oluştuğu ve sütün kimyasal niteliğinde farklılık meydana geldiği belirtilmektedir.

Örneklerden toplam olarak 136 kültür izole edilmiş, ancak bunlardan yalnız 129'unun gram negatif floraya dahil olduğu belirlenmiştir.

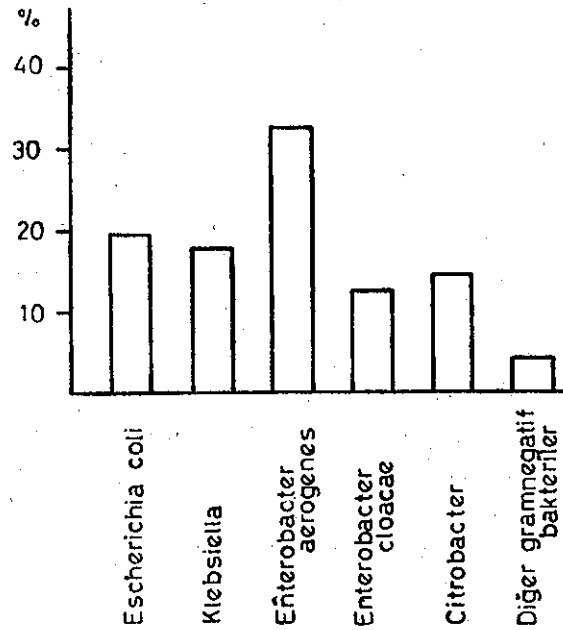
Çizelge 2: Koliform grubu bakteri türlerinin farklı mandıralara göre dağılımı

Koliform grubu bakteriler	Mandıra			Toplam
	A	B	C	
<i>Escherichia coli</i>	9	10	6	25
<i>Klebsiella</i>	12	3	8	23
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	6	21	42
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	6	5	16
<i>Citrobacter</i>	6	4	8	18
Diğer gramnegatif bakteriler	0	5	0	5

Çizelge 2'de tanımlanan kültürlerin türlerine göre dağılımı verilmiştir. Koliform grubu bakteri türleri mandıralara göre farklılık göstermiş A ve C mandırasında alınan örneklerde en fazla *Ent. aerogenes*, buna karşın B mandırasında ise en fazla *E. coli* izole edilmiştir.

Tüm örneklerdeki koliform grubu türlerinin dağılımı ele alındığında *Ent. aerogenes*'in % 32.6 ile en yüksek oranda bulunduğu ve bunu % 19.4 oranı ile *E. coli*'nin, % 17.8 oranı ile *Klebsiella*'nın izlediği görülmüş (Şekil 2) ve bulgular MAİDA ve arkadaşlarının (17) araştırma sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Citrobacter (% 13.9) ve *Ent. aerogenes* (% 12.4) ise daha düşük oranlarda saptanmıştır. Kültürlerin % 3.9'unun diğer gramnegatif bakterilere dahil olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).



ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über Nachweis coliformer Keime in Anlieferungsmilch.

Von 3 verschiedenen Molkerieen entnommenen 21 Rohmilchproben wurde 129 coliforme Stämme isoliert und differenziert. Es waren im Proben am häufigsten *Ent. aerogenes* (32.6

%) und *E. coli* (19.4 %) nachzuweisen. *Klebsiella*, *Citrobacter* und *Ent. aerogenes* scheinen nur in kleinen Mengen aufzutreten.

KAYNAKLAR

1. BUSSE, M. (1971): Die Auswirkungen hoher Keimzahlen in Rohmilch. Deutsche Molkerei - Ztg. 92, 39 - 43.
2. CLOSS, O. and DÍGRANES, A. (1971): Rapid identification of prompt lactose - fermenting genera with in the family Enterobacteriaceae. Acta path. microbiol. scand. Section B. 79, 673 - 678.
3. COWAN, S.T. (1956): Taxonomic rank of Enterobacteriaceae «Groups». I. gen. Microbiol. 15, 345 - 358.
4. ERGÜLLÜ, E. (1974). Untersuchungen zum Vorkommen von gramnegativen Bakterien in Anlieferungsmilch. Dissertation. Giessen.
5. GHAZVINIAN, R.; FARKHONDEH, A.; MALEKI, M. et KOHNECHAHRI, M. (1972): Dénombrement des germes totaux et des bactéries coliformes des laits crus délivrés à la Centrale laitière de Téhéran, et détermination du taux de contamination de ces laits en staphylocoques coagulase positive. Lait. 57, 77 - 84.
6. GINZINGER, W. (1977): Keimgehalt der Anlieferungsmilch. Milchwirtsch. Berichte. 52, 266.
7. GINZINGER, W. (1978): Einige Ergebnisse bakteriologischer Untersuchungen von Kesselmilchen, Kulturen und Emmentalerkäsen. Milchwirtsch. Berichte. 57, 275 - 280.
8. HECHELMANN, H. und LEISTNER, L. (1969): Schnellnachweis gramnegativer Stäbchen. Archiv f. Lebensmittelhyg. 20, 169 - 179.
9. HELLMANN, E. (1969): Ergebnisse der Differenzierung von Enterobacteriaceen aus Milch. Archiv f. Lebensmittelhyg. 20, 241 - 246.
10. HÖVENER, B. (1971): Untersuchungen über den Keimgehalt der Anlieferungsmilch. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B. 155, 117 - 122.
11. KARIM, G.; KACHANI, G. (1978): Flore bactérienne du lait cru de la région de Téhéran. Lait. 58, 179 - 184.
12. KAUFFMANN, F. (1956): Zur biochemischen und serologischen Gruppen und Typen - Ein - leitung der Enterobacteriaceae. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 165, 344 - 353.
13. KIND, H. (1972): Beurteilung der Rohmilchqualität durch elektronische Mikrokoloniezählung. Deutsche Molkerei Ztg. 93, 1714 - 1726.
14. KIND, H.; BILLMAYER, H. (1975): Elektronische Mikrokoloniezählung in der praktischen Anwendung. Deutsche Molkerei Ztg. 96, 1140 - 1146.
15. KNOTHE, H.; SEELIGER, H.; DÖLL, W. und WIEDEMANN, B. (1969): Enterobacteriaceae. Zbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. B. 211, 1 - 15.
16. LIMMER, H.D.; WÖBBECKE, R. (1972): Über die Keimzahl der von Milcherzeugern abgelieferten Milch. Deutsche Milchwirtsch. 23, 1990 - 1994.
17. MAIDA, B.; ARCA, S.U.d'; MAIDA, M.; REALACCI, G. (1971): Biochemical typing of coliforms present in milk. Dairy Sci. Abst. Vol. 33, No: 7. 3617, S. 548.
18. PAUL, S.; NITSCH, B. (1974): Die Anwendung der elektronischen Mikrokoloniezählung (EMZ) zur Qualitätskontrolle von Rohmilch. Deutsche Molkerei Ztg. 95, 1164 - 1170; 1201 - 1208.
19. SEDLAK, J.; SLAJSOWA, M. und TOMASOFFOVA, A. (1961): Zur biochemischen Differenzierung von Enterobacteriaceae. Z. ges. Hyg. u. Ihre Grenzgeb. 7, 774 - 787.
20. SPILLMANN, H. (1973): Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl nach dem Ösen - Plattenverfahren für die Qualitätsbeurteilung der «Lieferanten - Milch» in der Schweiz. Deutsche Molkerei Ztg. 94, 1404 - 1405.
21. WERNERY, H.; SUHREN, G.; HEESCHEN, W.; TOLLE, A. und REICHMUTH, J. (1974): Untersuchungen zur bakteriellen Belastung der Milch zwischen Gewinnung und Konsum in 9 Versorgungsgebieten der BRD. Deutsche Molkerei Ztg. 95, 1222 - 1228.
22. WINTERER, H. (1976): Verhalten der coliformen Keime in Käse. Milchwirtsch. Berichte. 49, 269 - 272.
23. WIESNER, H. - U. (1970): Differenzierung coliformer Keime mit einem polytrophen Medium. Arch. f. Lebensmittelhyg. 21, 267 - 270.