

Tereyağlarından İzole Edilen Koliform Grubu Bakterilerin Tanımlanması

Prof. Dr. Selahattin SERT - Arş. G. Salih ÖZDEMİR

Atatürk Üniv. Ziraat Fak. T.Ü.T. Bölümü — ERZURUM

ÖZET

Bu araştırmada, Erzurum piyasasında kahvaltılık olarak satılan tereyağlarından koliform grubu bakteriler izole edilmiş ve tanımlanmasına çalışılmıştır. Yirmidört örnekten izole edilen 187 adet koliform suşundan 41 i (% 21,9) *Escherichia coli* Tip II, 32 si (% 17,1) *Klebsiella* spp, 27 si (% 14,4) *E. coli* Tip I 22 si (% 11,8) *Enterobacter aerogenes*, 18 i (% 9,6) *K. pneumoniae*, 12 si (% 6,4) *Ent. cloacae*, 12 si (% 6,4) *Ent. agglomerans*, 8 i (% 4,3) *Citrobacter freundii* ve 6 sı da (% 3,2) *C. divercus* olarak tanımlanmıştır. Dokuz suş ise (% 4,8) tanımlanamamıştır.

İzole edilen bu suşları tanımlamada IMVIC testleri esas teşkil etmiştir. Fakat bu testler türlerin tam bir ayırımını ortaya koymaktan uzak kalmıştır. Bunun için tanımlamada kesin sonuç veren diğer bazı özellikler de ele alınmıştır. Bunlardan lisinedekarboksilaz, H₂S, hareketlilik testleri önemli görülmüştür.

SUMMARY

Identification of Coliform Bacteria Isolated from Butter

Coliform bacteria were isolated and identified from 24 butter samples which are sold in Erzurum. Total 187 coliform strains, which have been identified, consisted of 41 *Escherichia coli* type II (21,9 %), 32 *Klebsiella* spp. (17,1 %), 27 *E. coli* type I (14,4 %), 22 *Enterobacter aerogenes* (11,8 %), 18 *K. pneumoniae* (9,6 %), 12 *Ent. cloacae* (6,4 %), 12 *Ent. agglomerans* (6,4 %), 8 *Citrobacter freundii* (4,3 %) and 6 *C. divercus* (3,2 %). Nineteen of strains (4,8 %) couldn't be identified.

Identification of coliform bacteria was based on IMVIC tests. These tests, however, have been insufficient because these species of bacteria have contained a large number of transition types. For this reason, the other characteristics giving strict results have been used in identification. Lysinedecarboxylase,

H₂S, and motility tests have been considered as supplementary tests in identification.

Giriş

Koliform grubu bakteriler süt ve mamüllerinin kalitesini bozmakla beraber, insan sağlığını da olumsuz yönde etkilerler. Bir gıda maddesinden koliform grubu bakterilerin izole edilmesi, onun fekal bir kirlenmeye maruz kaldığını ve dolayısıyla barsak patojenleri tarafından kontamine edilmiş olabileceğini gösterir. Bu nedenle koliform grubu bakteriler, gıdaların mikrobiyolojik muayenelerinde indikatör olarak kullanılırlar (Akman, 1961; Nickerson ve Sinskey, 1974; Frazier ve Westhoff, 1978). Koliform grubu bakterilerin bizzat kendilerinin de insan sağlığını bozucu etkileri vardır. Örneğin, *E. coli*; idrar ve safra yolları enfeksiyonlarına, peritonite, apandisit, menenjit ve vücudun çeşitli yerlerinde irinli yangılara, çocuklarda, bazen erişkinlerde sürgünlere yol açar. *Enterobacter*'ler; özellikle *Ent. cloacae* idrar yolları enfeksiyonlarına sebep olur ve ısıya dayanıklı enterotoksin üretir. *Citrobacter*'ler; idrar, safra ve solunum yolları enfeksiyonlarına, orta kulak ve beyin zarı iltihaplarına neden olabilirler. *Klebsiella* cinsinin en önemli türü olan *K. pneumoniae*, özellikle vücut direncinin zayıf olduğu durumlarda başta pnömöni olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara yol açar (Çetin, 1973; Akman ve Gülmezoğlu, 1980; Unat, 1982). Öte yandan, koliform grubu bakteriler, türlerine ve bulaşmanın derecesine göre tereyağlarında renk, tad ve yapı bozukluklarına sebep olurlar. Örneğin, bazı koliformlar tereyağlarına pis bir koku, bazı *Enterobacter*'ler de ahır kokusunu andıran bir aroma verirler (Frazier ve Westhoff, 1978). *Ent. aerogenes*'in fazlaca üremesi acı tadların oluşmasına yol açar. Koliform grubu bakterilerden bir kısmı diasetil redüktaz enzimine sahip olduğundan bu bakteriler, tereyağlarına hoş bir aroma kazandıran diasetil'in kaybolmasına sebep olurlar (Tunali ve Köşker, 1986).

Süt ve mamüllerinden izole edilen koliform grubu bakterilerin ayırmaları üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Örneğin, Demeter (1956), 49 tereyağı numunesinin 19 unda *E. coli* ve *Ent. aerogenes*, 15 örnekte ise sadece *Ent. aerogenes* tesbit etmiştir. Hindistan'da 285 süt ve süt ürününden, Eosine Methylene Blue Agar ve Violet Red Bile Agar besiyerleri üzerinde, *E. coli* olarak tahmin edilen 1200 den fazla koloninin ancak 167 sinin *E. coli* olduğu ve bunlardan 147 sinin *E. coli* tip I, 9 unun tip II, 11 inin tip III olarak tanımlandığı bildirilmiştir (Singh ve Ranganathan, 1974). Pastörize süt örneklerinden izole edilen 325 koliform suşunun % 13,6 sinin *E. coli* tip I, % 14,4 ünün *Ent. aerogenes*, % 23,8 inin *Ent. cloacae* ve % 19,8 inin *Klebsiella* spp. olduğu kaydedilmiştir (Barbaro ve ark. 1984). Beyaz peynirlerin olgunlaşması sırasında bakteri değişimini inceleyen Ergüllü (1980), ham peynir örneklerinde *Ent. aerogenes* ve *E. coli*'nin yüksek oranda bulunduğunu, olgunlaşmanın 20. gününde *Ent. cloacae*'nin 90. gününde *Klebsiella*'ların, 120. gününde *Citrobacter*'lerin tamamen ortadan kalktığını belirlemiştir.

Bu çalışmada, kahvaltılık tereyağlarından izole edilen koliform grubu bakterilerin, tür veya cins seviyelerine kadar tanımlanmasına çalışılmıştır. Tanımlamada İMVIC testleri esas teşkil etmiş ancak, Lassen (1975)'in üçlü tüp metodundan geniş ölçüde faydalanılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Erzurum'un 4 ayrı semtinden Ocak ve Şubat aylarında, şansa bağlı olarak seçilen 2 şer dükkandan 15'er gün arayla 3'er defa toplam 24 adet kahvaltılık olarak satılan tereyağı numunesi, usulüne uygun bir şekilde alınmış ve laboratuvara getirilerek aynı gün mikrobiyolojik incelemelere tabi tutulmuştur.

Metot

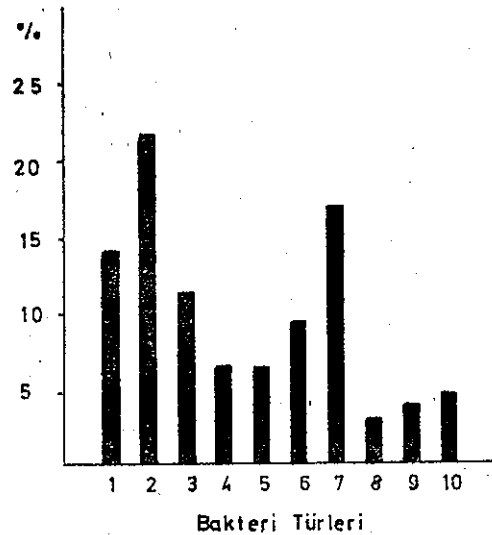
Tereyağ örnekleri 45°C lik su banyosunda eritilerek 10⁻¹ lik dilüsyonları elde edilmiş ve daha sonra uygun seyreltileni hazırlanmıştır (Housler, 1974). Koliformların ön ayırımı Violet Red Bile Agar'da yapılmıştır. 10⁻² — 10⁻⁶ lik dilüsyonlardan paralel olarak ikişer petri pla-

ğına ekim yapılmış, 14 saat 35 ± 1°C de inkübe edilmiştir. Besiyerinde gelişen kırmızı zonlu, 0,5 mm veya daha büyük çaplı koyu kırmızı kolonilerden yaklaşık 10 ar adet yatık agar (Nitrient Agar) besiyerlerine alınmıştır. Burada çoğalan kültürlerden Gram boyama yapılarak koliformların mevcudiyeti doğrulanmıştır (Akman, 1961; Fishbein ve ark., 1976).

Laktöz ve glikozun fermantasyonu, H₂S oluşumu, lisindekarboksilaz testleri, Lassen (1975) tarafından bileşimleri bildirilen, ağız vida kapaklı tüplerdeki katı besiyerinde, mannitol ve hareketlilik testleri de yarıkatı besiyerinde yapılmıştır. İndol, metil kırmızısı (MR), Vigés-Proskauer (VP) ve sitrat testleri Teatcher ve Clark (1973)'a, jelatin hidrolizi ve üreaz testleri Arda (1981)'ya göre yapılmıştır. Metotla ilgili geniş bilgi, önceki çalışmamızda (Sert ve Özdemir, 1988) verilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kahvaltılık tereyağı örneklerinden izole edilerek tanımlanan koliform grubu bakterilerin bölgelere ve dükkanlara göre dağılımı Tablo 1'de, türlere göre dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Koliformların türlere göre dağılımı 1: *E. coli* tip I, 2: *E. coli* tip II, 3: *Ent. aerogenes*, 4: *Ent. Cloacae*, 5: *Ent. agglomerans*, 6: *K. pneumoniae*, 7: *Klebsiella* spp., 8: *O. divercus*, 9: *C. freundii*, 10: Diğer koliformlar.

Tiblo 1. Kahvaltılık Tereyağı Örneklerinden İzole Edilip Tanımlanan Koliform Grubu Bakterilerin Bölgelere ve Dükkanlara Göre Dağılımı.

Böl.	Dük.	Örnek No	İzolat Sayısı	Tanımlanan Koliform Gurubu Bakteriler								Diğer Koli-formlar	
				E. coli tip I	E. coli tip II	Ent. aero	Ent. cloa.	Ent. agg.	Kleb. pneu.	Kleb. spp.	Citrob. diyerc.		Citrob. freu.
A	I	1	8	2	2	—	1	—	3	—	—	—	—
		2	10	2	—	4	—	—	—	1	2	1	—
		3	6	1	4	6	—	—	1	—	—	—	—
		Toplam	24	5	4	6	1	—	4	1	2	1	—
II	1	6	—	5	—	1	—	—	—	—	—	—	
	2	5	—	3	—	—	—	—	2	—	—	—	
	3	8	—	2	—	—	—	1	4	—	—	—	
		Toplam	19	—	10	—	1	—	1	6	—	1	—
B	I	1	10	—	7	—	—	1	—	—	—	2	—
		2	8	—	1	—	1	1	1	2	—	—	2
		3	8	—	—	1	—	1	2	4	—	—	—
		Toplam	26	—	8	1	1	3	3	6	—	2	2
II	1	9	4	—	1	1	—	—	—	2	—	1	
	2	8	—	—	—	3	2	1	1	—	—	1	
	3	10	1	—	8	—	—	—	—	—	1	—	
		Toplam	27	5	—	9	4	2	1	1	2	1	2
C	I	1	7	—	1	2	2	—	—	1	—	1	—
		2	8	1	1	1	—	1	2	—	2	—	—
		3	8	4	—	—	—	—	1	2	—	—	1
		Toplam	23	5	2	3	2	1	3	3	2	1	1
II	1	8	—	1	—	2	1	1	2	—	—	1	
	2	8	—	3	—	—	2	1	2	—	—	—	
	3	8	—	2	—	—	—	1	5	—	—	—	
		Toplam	24	—	6	—	2	3	3	9	—	—	1
D	I	1	8	—	1	2	—	2	—	2	—	1	—
		2	8	2	5	—	—	—	—	1	—	—	—
		3	8	2	—	—	—	—	3	1	—	—	2
		Toplam	24	4	6	2	—	2	3	4	—	1	2
II	1	6	—	2	1	1	—	—	1	—	—	1	
	2	7	1	3	—	—	1	—	1	—	—	1	
	3	7	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		Toplam	20	8	5	1	1	1	—	2	—	1	1
Genel toplam			187	27	41	22	12	12	18	32	6	8	9

Örneklerden toplam 187 adet koliform suşu elde edilmiştir. Bunların 178'nin *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* ve *Citrobacter* cinsine ait olguları belirlenmiş, 9 suş ise tanımlanamamıştır. İzole edilen koliform suşlarının 68'inin (% 38,1) *E. coli* (tip I ve tip II) olduğu belirlenmiştir. *E. coli* tip I ve tip II suşlarının tanımlanması Fishbein ve ark. (1976) ile Lassen (1975) tarafından bildirilen teşhis anahtarına göre yapılmıştır. *E. coli* tip I olarak tanımlananın 27 (% 14,4) suşun indol oluşturduğu sirtatta gelişmediği ve VP testinde negatif reaksiyon verdiği belirlenmiştir. 16 suş hareketli olurken 21 suş lisindekarboksilaz testinde pozitif sonuç vermiş ve hiç bir suş H₂S meydana getirmemiştir. 41 (% 21,9) suş *E. coli* tip II olarak tanımlanmıştır. Bunlar *E. coli* tip I'e benzer reaksiyonlar göstermiş, ancak hiç biri indol oluşturmamıştır.

Enterobacter olarak tanımlanan 46 suştan (% 6,4) *Ent. cloacae* ve 12'sinin de (% 6,4) *Ent. agglomerans* olduğu tesbit edilmiştir. Bu bakterileri türlerinin tanımlanmasında İMVİC reaksiyonlarının yanısıra lisindekarboksilaz testi ve jelatin hidrolizi deneylerinden yararlanılmıştır (Buchanan ve Gibbons, 1974; Lassen, 1975). İndol testine pozitif reaksiyon gösteren 8 suş (% 4,3) atipik *Ent. aerogenes* olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, tüm *Ent. aerogenes* suşları MR testine karşı negatif, VP ve sitrat testine karşı da pozitif reaksiyon göstermiştir. *Ent. cloacae* indol ve MR testinde negatif, VP ve sitrat testinde ise pozitif sonuç vermiş, lisindekarboksilaz testine karşı negatif reaksiyon göstermesiyle *Ent. aerogenes*'ten ayrılmıştır. *Ent. agglomerans* suşlarının tamamı indol negatif, MR ve sitrat pozitif, VP testinde ise büyük oranda (% 80) negatif reaksiyon göstermiş ve diğer *Enterobacter* cin-

si içinde yer alan türlerden ayrılmıştır. Bu cins içinde yer alan suşlardan tümünün hareketli olduğu görülmüştür.

Lassen (1975) ve Wright (1984)'in kriterlerinden faydalanılarak, 50 suşun (% 26,7) *Klebsiella* cinsine mensup olduğu belirlenmiş ve bunlardan 18'i (% 9,6) *K. pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Üç (% 1,6) *K. pneumoniae* suşunun indol oluşturmasıyla atipik olduğu anlaşılmıştır. Diğer *K. pneumoniae* suşları indol ve MR reaksiyonlarında negatif, VP ve sitrat testlerinde ise pozitif sonuç vermiştir. Bütün kültürler hareketsiz olmasıyla diğer koliform grubu bakterilerden ayrılmıştır. Bu tür bakterilerin hepsi, lisindekarboksilaz testinde pozitif reaksiyon göstermiştir. İMVİC testlerine karşı değişik reaksiyonlar gösteren ve hareketsiz olan 32 suş (% 17,1) *Klebsiella* spp. olarak değerlendirilmiştir.

İzolatlardan 14 ünün (% 7,5) *Citrobacter* cinsini teşkil ettiği anlaşılmıştır. H₂S oluşturan 8 suş (% 4,3) *C. freundii* olarak diğerlerinden ayrılmıştır. Bu suşlar lisindekarboksilaz testine karşı negatif reaksiyon göstermiştir. *C. divercus* olarak tanımlanan 6 suşun (% 3,2) hepsi indol, MR ve sitrat testlerine pozitif VP testine ise, negatif reaksiyon göstermiştir. H₂S oluşturmama özelliği ile *C. freundii* den ayrılmıştır. *Citrobacter* cinsi içinde yer alan tüm suşların hareketli olduğu görülmüştür.

Koliform grubu bakterilerin tanımlanmasında önemli ölçüde Lassen (1975)'in üçlü tüp metodundan faydalanılmıştır. Laktoz ve glikozun fermantasyonu, H₂S oluşumu ve lisindekarboksilaz testleri bir besiyerinde, mannitolur fermentasyonu ve hareketlilik testleri de diğer bir besiyerinde yapılmıştır. İki besiyerinde altı testin uygulandığı bu metot ile, hem zamandan hem de ekonomik bakımdan tasarruf sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Akman, M. 1961. Su, Süt, ve Türevlerinin Rutin Bakteriyolojik Muayeneleri. Ege Matbaası, Ankara. 371 S.
- Akman, M., E. Gülmezoğlu, 1980. Tıbbi Mikrobiyoloji, (Çeviri : Javetz, E., J.L. Melnick, E.A. Alderberg, Rewiew of Medical Microbiology. Mange Medical Pub., Los Altos, California), Hacettepe Üniv., Ankara, 908 S.

- Arda, M. 1981. Genel Bakteriyoloji. Ank. Üniv. Vet. Fak., Ankara, 529 S.

- Barbaro, D., S.B. Gentili, R. Gianelli, R. Pencini. 1984. Identification of coliforms isolated from pasteurized milk and from the environment of Florence central dairy. Dairy Sci. Abst., 46 (8), 5243.

- Buchanan, R.E., N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Çetin, E.T. 1973. Genel ve Pratik Mikrobiyoloji. 3. Baskı, Sermet Matbaası, İstanbul, 914 s.
- Demeter, K.J. 1956. *Mikrobiologie der Butter*. Verlag Evgen Ulmer, Stuttgart.
- Ergülli, E. 1980. Beyaz Peynirin Olgunlaşması Sırasında Mikrofloranın Özellikle Gaz Yapan Bakterilerin Değişimi Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi, Ege Üniv. Zir. Fak., İzmir.
- Frazier, W.C., D.C. Westhoft. 1978. *Food Microbiology*, Mc Graw-Hill Book Company, New York, 540 pp.
- Fishbein, M., I.I. Mehlman, L. Chugg, Jr. J.C. Olson. 1976. Coliforms, fecal coliform, *E. coli*, and enteropathogenic *E. coli*. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, American Public Health Association, Inc., Washington, 277 - 300 pp.
- Hausler, W.J. 1974. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 13th ed., American Public Health Association, Inc., Washington D.C.
- Lassen, J. 1975. Rapid identification of gram-negative rods using a threetube method combined with a dichotomic key. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 83 (6), 525 - 533.
- Nickerson, J.T., A.C. Sinskey. 1974. *Microbiology of Foods and Food Processing*, American Elsevier Publishing Company, New York. 306 pp.
- Sert, S., S. Özdemir. 1988. Taze peynir örneklerinden izole edilen koliform grubu bakterilerin tanımlanması. *DOĞA, T.O.*, 12 (3), 421 - 427.
- Singh, R.S., B. Ranganathan, 1974. Occurrence of enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes in milk and milk products. *Milchwissenschaft*, 29 (9), 529 - 532.
- Teacher, F.S., F.S. Clark. 1973. *Microorganisms in Foods*, Univ of Toronto Press, Canada. 234 pp.
- Tunali, N., Ö. Köşker. 1986. Süt Mikrobiyolojisi. *Ank. Üniv. Zir. Fak. Yay.* 966, 136 s.
- Unat, E.K. 1982. Tıp Bakteriolojisi ve Virolojisi. *Dergâh Tıp Yayınları*, İstanbul. 1182 s.
- Wright, R.C. A New selective and differential agar medium for *Escherichia coli* and coliform organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 56, 381 - 388.