

## Beyaz Peynirlerden ve Pastörize Sütlerden *Yersinia enterocolitica* İzolasyonu ve Tanımlanması Üzerine Araştırmalar

Dr. S. Aykut AYTAÇ, Dr. Z. Yeşim ÖZBAŞ

H. Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe — ANKARA

### ÖZET

Bu araştırmada insan sağlığı açısından patojen olarak kabul edilen *Yersinia enterocolitica*'nın süt ve süt ürünlerinden izolasyonu üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla farklı dönemlerde toplanan 66 beyaz peynir ve 60 pastörize süt örneği incelemeye alınmıştır. Araştırma sonucunda biyokimyasal özellikleri ve selektif besiyerlerindeki koloni görünüşlerine göre 19 peynir örneğinde (% 28,8) ve 4 adet pastörize süt örneğinde (% 2,4) *Y. enterocolitica* izole edilmiştir. Peynirlerden izole edilen *Y. enterocolitica* kültürlerinden beş tanesi, pastörize süt örneklerinden izole edilenlerin ise iki tanesinin atipik oldukları belirlenmiştir.

### SUMMARY

#### STUDIES ON ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* FROM CHEESE AND PASTEURIZED MILK

In this study, dairy and dairy products have been investigated for *Yersinia enterocolitica* accepted as a human pathogen. For this purpose 66 cheese and 60 pasteurized milk samples were collected in different periods. 19 cheese (28,8 %) and 4 pasteurized milk samples (2,4 %) were found to be positive according to both biochemical tests and typical appearance of colonies on selective media. Five out of 19 isolated colonies obtained from cheese were atypical, whereas two out of 4 isolated colonies obtained from pasteurized milk were found to be atypical.

### 1. GİRİŞ ve KAYNAK TARAMASI

*Yersinia enterocolitica* fakültatif anaerob, Gramnegatif, sporsuz, kısa çubuk şeklinde ve *Enterobacteriaceae* familyasına üye bir bakteridir (TOMA, 1973; COWAN, 1974). İlk kez 1894 yılında Fransız bakteriyolog A.J.E. Yersin tarafından veba etmeni olarak izole edilmesinden sonra *Yersinia* olarak adlandırılmıştır

(BERCOVIER ve MOLLARET, 1984). 30°C ve altındaki sıcaklık derecelerinde hareketli (*Y. pestis* dışında), 37°C'de ise hareketsizdir. Biyokimyasal özellikleri bakımından *Y. enterocolitica* benzeri olan ve *Y. enterocolitica* grubu olarak adlandırılan bakteriler, çeşitli gıdalardan izole edilmişlerdir (ZINK ve ark., 1982). *Y. enterocolitica* grubu (*Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* ve *Y. kristensenii*) biyokimyasal özellikleri bakımından heterojen olup tipik ve atipik olarak tanımlanan iki gruba ayrılmaktadır. Tipik olarak tanımlanan türleri sukrozu fermente ederken ramnoz, rafinoz ve meliboz'u fermente edememektedir (BOT-TONE, 1977). Atipik türler ise, genellikle ramnozu fermente ederken sukrozu fermente edememektedir. Tüm türler glukozu fermente edebilmekte çok az yada hiç gaz oluşturmamaktadır (GILMOUR ve WALKER, 1988).

*Yersinia* türleri içinde en önemlileri *Y. pestis* (veba etmeni), *Y. pseudotuberculosis*, *Y. ruckeri* ve *Y. enterocolitica* grubudur (BERCOVIER ve MOLLARET, 1984).

*Y. enterocolitica*'nın birçok farklı serotipleri et, kümes hayvanları, balık, çiğ süt ve dondurma gibi gıdalardan izole edilmiştir. Bu türlerin özellikle 0:3, 0:8, 0:5 ve 0:9 serotipleri, enfeksiyonlarda rol oynamaktadır (MOHAMMAD ve DRAUGHON, 1987; MOUSTAFA, 1990).

Gıda kökenli *Y. enterocolitica* enfeksiyonlarında son 10-15 sene içerisinde önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu artış muhtemelen mikroorganizmanın patojen özelliğinin saptanmasından ve izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu mikroorganizmanın psikrofilik karakterde olması ve gıda endüstrisinde soğuk zincirin yaygınlaşması da artışta bir etken olarak düşünülmektedir (GILMOUR ve WALKER, 1988).

Akut gastroenteritis klinik yersiniosisin en çok bilinen semptomudur (VANTRAPPEN ve ark.,

1982). Hastalık diyare, karın ağrısı ve ateş ile belirmekte, kusma olmamakla birlikte pseudoappendisit görülebilmektedir (BOTTONI, 1977; BLACK ve ark., 1978). Ayrıca mezenter lenf bezlerinde büyüme, ayaklarda ağrılı kırmızı nodüller ve karaciğer ile dalak abselerine neden olabilmektedir (SONNENWIRTH ve WEAVER, 1970; WINBALD, 1973).

Çoğunlukla süt ile süt ürünleri olmak üzere birçok gıda yersiniosisin yayılması açısından oldukça önemli gıdalardır. Özellikle çiğ süt, peynir gibi ürünlerin yanında tereyağ, pastörize krema, dondurma ve yoğurttan da *Y. enterocolitica* izole edildiği belirtilmiştir (GILMOUR ve WALKER, 1988).

Bu çalışmada, Ankara piyasasında satılmakta olan beyaz peynirlerden ve pastörize sütlerden *Y. enterocolitica* izole edilmeye çalışılmıştır.

Araştırmanın amacı : özellikle son 10 15 yıldır birçok ülkede üzerlerinde yoğun olarak çalışılmalar yapılan *Listeria*, *Campylobacter*, *Aeromonas* gibi patojen bakterilerden birisi olan *Y. enterocolitica*'nın izole edilmeye çalışılması, çeşitli besiyerlerindeki koloni özellikleri ile bazı biyokimyasal reaksiyonlarının incelenmesi ve izolasyon-tanımlama kriterlerinin çıkartılması olarak belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1. Beyaz Peynir Örnekleri

Çalışmanın Temmuz - Eylül 1991 döneminde gerçekleştirilen bölümünde, araştırmada kullanılan beyaz peynir örnekleri Ankara'nın çeşitli yerlerinden tamamen tesadüfi olarak toplanmıştır. Bu amaçla 66 beyaz peynir örneği incelemeye alınmıştır.

##### 3.1.2. Pastörize Süt Örnekleri

Araştırmanın Kasım - Aralık 1991 döneminde gerçekleştirilen bölümünde ise, belirlenen bir pastörize süt fabrikasından, kurulan bir istatistik modele göre tüm günlük üretimi temsil edecek şekilde, farklı dolun makineleri da dikkate alınarak ayrı ayrı günlerde örnekler alınmıştır. Denemenin bu aşamasında toplam 60 örnek ile çalışılmıştır.

### 3.2. YÖNTEM

Uygun şekilde hazırlanıp homojenize edilen peynir örnekleri, ilk aşamada % 1 pepton içeren Tamponlanmış Peptonlu Su'ya (TPS) ekilerek  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 2-3 hafta buzdolabında inkübe edilmişlerdir. Diğer yandan, farklı bir dönemde toplanan pastörize süt örnekleri de benzer şekilde ve koşullarda aşılanarak inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda örneklerden Cefsulodin - İrgasan - Novobiocin Agar besiyerlerine (CIN : Oxoid antibiyotik SR 109 + Oxoid CM 653) yüzey sürme yöntemi ile aşılama yapılmış ve  $27^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat bekletilmiştir. Besiyerlerindeki şüpheli («Bullseye» olarak tanımlanan 1,5 mm çapında, ortası kırmızı-mor, düzgün kenarlı ve çevresi yarı şeffaf kenarla çevrili) koloniler Brain Heart Infusion Agar (BHI : Oxoid CM 375) besiyerlerine aktarılmış ve  $27^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilerek, şüpheli kolonilerin saf kültürleri elde edilmiştir. Elde edilen kültürlerden Mac Conkey Agar (Difco 0075-01), Triple Sugar Iron Agar (TSI : Oxoid CM 277), Christensen Urea Agar, Dekstroz Broth ve Brain Heart Infusion Broth (BHI : Oxoid CM 225) besiyerlerine aktarmalar yapılarak, koloni özellikleri ve bazı biyokimyasal reaksiyonları incelenmiştir. Ayrıca kültürlere hareketlilik ( $25^\circ\text{C}$ 'de) ve Metil Red testleri de yapılmıştır. Tüm bu testlerde Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden sağlanan *Yersinia enterocolitica* (0:3) şahit kültürü kullanılarak elde edilen reaksiyonlar karşılaştırılmıştır.

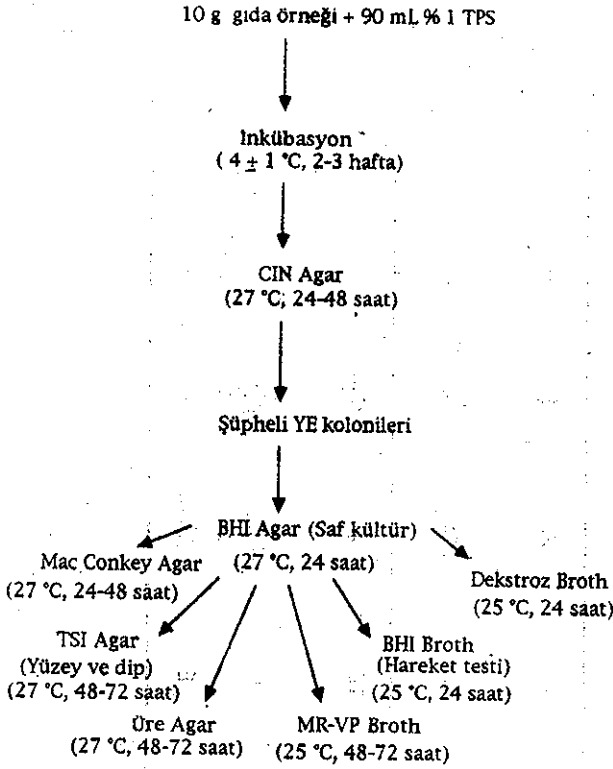
Beyaz peynir ve pastörize süt örneklerinden *Y. enterocolitica*'nın izolasyonu için kullanılan akım şeması Şekil 1'de verilmiştir.

### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

#### 4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI

İncelenen 66 beyaz peynir örneğinin 19'unda (% 28,8), 60 adet pastörize süt örneğinin ise 4 tanesinde (% 2,4) *Y. enterocolitica* izole edilmiştir.

Mac Conkey Agar besiyerinde tipik (2 mm çapında, yarı şeffaf pembe renkli ve atipik (2 mm'den küçük, mat pembe-renksız) olmak üzere 2 farklı koloni tipi izole edilmiştir. *Y. enterocolitica*'nın klinik türleri laktozu fermen-

Şekil 1. *Y. enterocolitica* izolasyon akım şeması

TPS : Tamponlanmış Peptonlu Su  
 CIN : Cefsulodin - Irgasan - Novobiocin  
 BHI : Brain Heart Infusion  
 TSI : Triple Sugar Iron  
 MR - VP : Metil Red - Voges Proskauer

te edememekte, ancak birçok gıda kökenli türler laktozu parçalayabilmekte ve Mac Conkey Agar üzerinde atipik koloniler oluşturabilmektedir (FILMOUR ve WALKER, 1988). Atipik türler çoğunlukla çiğ süt ve etlerde bulunmaktadır (TOMA, 1973; STERN ve PIERSON, 1979).

Çalışmada peynirlerden izole edilen 19 *Y. enterocolitica* kolonisinden 5'i, pastörize sütlerden ise 2'si atipik olarak saptanmış ve bunların bazılarının üre ve metil red testleri zayıf pozitif olarak gözlenmiştir. Atipik kolonilerin TSI Agardaki reaksiyonları ise dip kısmı asit, yüzey kısmı asit/alkali yada alkali olurken gaz ve H<sub>2</sub>S oluşumu belirlenmemiştir.

Tipik koloniler ise TSI Agarda yüzey ve dip kısımda asit yada yüzeyde alkali dipde asit reaksiyonları verirken gaz ve H<sub>2</sub>S oluşumu gözlenmemiştir. Sukrozu fermente eden türler, 24 saatlik inkübasyon sonunda yüzeyi hızla al-

kaliye çevirebilmekte ve alkali yüzey ve asit dip reaksiyonları verebilmektedirler (STERN ve PIERSON, 1979).

Araştırma sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

## 4.2. TARTIŞMA

Süt, insanların yaşamları boyunca, doğrudan veya ürünleri şeklinde tükettikleri vazgeçilmez bir doğal besin kaynağıdır.

Türkiye'de toplum yapısı ve tesis kapasitesi itibarıyla üretimin yalnızca % 22,5'inin ilkel veya modern özellik taşıyan çeşitli tesislerde işlenebildiği bildirilmektedir (TOPAL, 1987). Bu kapasiteden de tam olarak yararlanmadığı bilinmesine rağmen rakamlara göre kalan % 77,5'lük kısmın aile işletmeleri veya sokak sütçülerinin elinde tüketiciye son derece ilkel koşullarda ve denetimsiz olarak ulaştığı yada hiçbir kalite kontrolü ve denetimden geçmeden hijyenik olmayan koşullarda işlenerek pazarlandığı belirtilmektedir (TOPAL, 1987). Türkiye'de üretilen beyaz peynirler genellikle çiğ süttten işlenmekte ve çok kısa süre salamura olarak piyasa sunulmaktadır (GÖNÇ, 1984; KURT, 1991).

Araştırmada, incelenen 66 peynir örneğinin % 28,8'inde *Y. enterocolitica* izole edilmesinin büyük ölçüde çiğ süt kullanımının yanı sıra yetersiz hijyenik koşullara da bağlı olabileceği düşünülmektedir.

MOUSTAFA ve ark. (1983 a, 1983 b) *Y. enterocolitica* ile aşırılmış sütün peynire işlenmesi sonucunda olgunlaşma sırasında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. KARAIÖANOĞLOU ve ark. (1985), yaptıkları çalışmada ürünün son pH'sının *Y. enterocolitica* inaktivasyonunda önemli bir etken olduğu, aynı zamanda inaktivasyonun nem ve düşük tuz içeriği ile de ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Diğer bazı çalışmalarda ise incelenen peynir örneklerinin sırasıyla % 7 ve % 9,2'sinden *Y. enterocolitica* izole edilmiştir (SCHIE-MAN, 1978; GILMOUR ve WALKER, 1988). Ayrıca MOUSTAFA (1990), Kareish peynirlerinde yaptığı bir çalışmada örneklerin % 6,7'sinden *Y. enterocolitica* izole ettiğini bildir-

Çizelge 1. Peynir ve Pastörize Süt Örneklerinden İzole Edilen *Y. enterocolitica* (YE) İzolatlarının Bazı Biyokimyasal Reaksiyonları

	İzolat Sayısı	Üre	Hareket (25°C)	Metil Red	Glukoz (Gaz)	Yüzey	Dip	TSI	
								Gaz	H <sub>2</sub> S
Şahit Kültür		+	+	+	+	A	A	—	—
Peynir Örnekleri	14	+	+	+	TE	A	A	—	—
Atipik YE İzolatları	5	+	(z)	+	TE	A/Aik.	A	—	—
Pastörize Süt Örnekleri	2	+	+	+	—	A	A	—	—
Atipik YE İzolatları	2	+	+	+	—	A/Aik.	A	—	—
Diğer Bazı İzolatlar		—	—	+	(z)	TE	A	A/Aik.	+
		—	+	—	—	+	Aik.	Aik.	—
		—	+	+	(z)	—	—	A	+
		—	—	+	(z)	TE	A/Aik.	A	—

A : Asit, Aik. : Alkali, z : Zayıf reaksiyon, TE : Test edilmemiştir.

miştir. BOER ve ark. (1986) 89 adet Brie ve Camambert peyniri örneklerinin % 4,5'inde, 50 adet blue-veined peynir örneğinin % 2'sinde *Y. enterocolitica* izole ettiklerini açıklamışlardır.

Bazı araştırmacılar pastörizasyon işleminin *Y. enterocolitica*'nın inhibisyonu için yeterli olduğunu öne sürmüşlerdir (KARAIOANNOGLOU ve ark., 1985; MOHAMMAD ve DRAUGHON, 1987). Aynı şekilde SCHIEMANN (1978), 265 pastörize sıvı süt ürünleri ile çalışmış ve sadece bir örnekte *Y. enterocolitica* izole ettiğini bildirmiştir. Ancak araştırmacı bunun pastörizasyon sonrası bir bulaşı olabileceğini belirtmiştir. GREENWOOD ve ark., (1990), yaptıkları çalışmada, şişelenmeden önce aldıkları pastörize süt örneklerinde iki adet *Yersinia* türü izole ettiklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda pastörizasyon sırasında süre ve sıcaklığı da kontrol etmişler ve pastörizasyon normlarının doğru olduğunu tespit etmişlerdir.

Nitekim yapılan bu çalışmada da 60 pastörize süt örneğinin 4 tanesinde % 2,4 *Y. enterocolitica* izole edilmiştir. İleri sürülen bir teoriye göre *Yersinia* cinsi bakterilerin HTST pastörizasyonu ile ölmediğini, ancak bazı koliform grubu bakterilerde görüldüğü gibi hasara

uğradığı ve ürünün uzun süre düşük sıcaklık derecelerinde bekletilmesi ile stres formdaki *Yersinia*'nın gelişebildiği ve izole edilebildiği bildirilmektedir. Ancak pastörize sütlerde *Y. enterocolitica* bulunması olasılığının çiğ sütlere göre oldukça düşük olduğu da belirtilmektedir (SCHIEMANN, 1978; MOUSTAFA 1983 a).

*Y. enterocolitica* psikrofil doğası nedeniyle gıda endüstrisinde ve özellikle süt teknolojisinde problem yaratabilecek, patojen bir bakteridir.

Sonuç olarak, özellikle çiğ süttten işlenen beyaz peynir ve diğer süt ürünlerinin *Yersinia*'nin taşınması açısından önemli olabileceği düşünülmektedir. Toplum sağlığını yakından ilgilendiren bir konu olması nedeniyle, peynir yapımında ısı işlem görmüş süttün kullanılması, yeterli olgunlaşmanın sağlanması ve özellikle pastörizasyon sonrası kontaminasyonunun engellenmesine dikkat edilmesi önerilebilir. Ayrıca tamamen değilse bile *Y. enterocolitica*'nın pastörizasyon koşullarında büyük ölçüde inhibe edildiği kabul edilmekle birlikte, kullanılan çiğ süttün bu bakteri açısından yükü de önemli bir kontaminasyon kaynağı oluşturabileceği için dikkate alınmalıdır.

#### KAYNAKLAR

- BERCOVIER, H., MOLLARET, H.H. 1984. *Yersinia*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1 Ed E. Krieg, Williams and Wilkins, Baltimore.
- BLACK, R.E., JACKSON, R.J., TSAI, T., MEDVESMY, M., SHAYEGANI, M., FEELEY, J.C., MAC LEAD, K.I.E., WAKELEE, A.M. 1978. Epidemic *Yersinia enterocolitica* Infection Due to Contaminated Chocolate Milk. New England Journal of Medicine (298) 76 - 79.
- BOER, E. De, SELDAM, W.M., OOSTEROM J. 1986. Characterization of *Yersinia enterocolitica* and Related Species Isolated from Foods and Porcine Tonsils in the Netherlands. Int J. Food Microbiol (3) 217 - 227.
- BOTTONE, E.J. 1977. *Yersinia enterocolitica*: A Panoramic View of a Charismatic Microorganism. Critical Reviews in Microbiology (5) 211 - 241.
- COWAN, S.T. 1974. Family I Enterobacteriaceae. «In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eds R.E. Buchanan ve N.E. Gibbons» 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- GILMOUR, A., WALKER, S.J. 1988. Isolation and Identification of *Yersinia enterocolitica* and the *Yersinia enterocolitica*-like Bacteria. J. Applied Bacteriology Symposium Supplement. 213 - 236.
- GÖNÇ, S. 1984. Beyaz Peynir Yapım Tekniği ve Karşılana Sorunlar Eğitim Semineri, İstanbul, 2-3 Mart 1984, İstanbul Ticaret Odası Yayın No: 1984 - 14, Ankara 228 sayfa.

- GREENWOOD, M.H., HOOPER, W.L., RODHOUSE, J.C. 1980. The Source of *Yersinia* spp. in Pasteurized Milk: An Investigation at a Dairy. *Epidemiol. Infect.* (104) 351 - 360.
- KARAIANNOGLOU, P., KOIDIS, P., PARAGEORGIOU, D., MANTIS, A. 1985. Survival of *Yersinia enterocolitica* During the Manufacture and Storage of Feta Cheese. *Milchwissenschaft* (40) 204 - 206.
- KURT, A. 1991. Her Yöntüyle Peynir, II. Milli Süt ve Ürünleri Sempozyumu. Tekirdağ, 12 - 13 Haziran 1991, TÜ Tekirdağ Ziraat Fak. Yayın No: 125, Tekirdağ, 289 sayfa.
- MOHAMMAD, A.K., DRAUGHON, F.A. 1987. Growth Characteristics of *Yersinia enterocolitica* in Pasteurized Skim Milk. I. *Food Protection* (50) 849 - 852.
- MOUSTAFA, M.K., AHMED, A.A.H., MARTH, E.H. 1983 a. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* Raw and Pasteurized Milk. *J. Food Protection* (46) 276 - 278.
- MOUSTAFA, M.K., AHMED, A.A.H., MARTH, E.H. 1983 b. Behaviour of Virulent *Yersinia enterocolitica* During Manufacture and Storage of Cob-like Cheese. *J. Food Protection* (46) 318 - 320.
- MOUSTAFA, M.K. 1990. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from Raw Milk and Soft Cheese in Assiut City. *Assiut Vet. Med. J.* (23) 106 - 109.
- SCHIEHMANN, D.A. 1978. Association of *Yersinia enterocolitica* with the Manufacture of Cheese and Occurrence in Pasteurized Milk. *App. and Envir. Microbiol.* (36) 274 - 277.
- SONNENWIRTH, A.C., WEAVER, R.E. 1970. *Yersinia enterocolitica* New England. *J. Medicine* (283) 1468.
- STERN, N.J., PIERSON, M.D. 1979. *Yersinia enterocolitica*: A Review of the Psychrotrophic Water and Foodborne Pathogen. *J. Food Sci.* (44) 1736 - 1742.
- TOMA, S. 1973. Survey on the Incidence of *Yersinia enterocolitica* in the Province of Ontario. *Can. J. Public Health* (64) 477 - 487.
- TOPAL, Ş. 1987. Süt ve Süt Ürünlerine Ait Hijyenik Normlarımız ve Uygulamada Yaratıldığı Sorunlar, TÜBİTAK, Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Beslenme - Gıda Teknolojisi ile Soğuk Tekniği Araştırma Böl. 1986. Yılı İlkbahar Dizi Seminerleri, Gebze, MBEAE Yayın No: 112, Gebze - Kocaeli, 232 sayfa.
- VANTRAPPEN, G., GOBOES, K., ONETTE, E. 1982. *Yersinia enterocolitica* Medical Clinics of North America (66) 639 - 653.
- WENBALD, S. 1973. The Clinical Panorama of Human *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* (2) 129 - 132.
- ZINK, D.L., LACHICA, R.V., DUBEL, J.R. 1982. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like species: Their Pathogenicity and Significance in Foods. *J. Food Safety* (4) 223 - 241.