

BEYAZ PEYNİRDE *L. MONOCYTOGENES* PATOJENİNİN ARANMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

A RESEARCH ON DETERMINATION OF *L. Monocytogenes* PATHOGEN IN WHITE CHEESE

Sıddık GÖNÇ, Sevda KILIÇ

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü 35100 Bornova - İzmir, Türkiye

ÖZET: Bu çalışmada İzmir ili ve çevresindeki büyük satış yerlerinden temin edilen 82 beyaz peynir örneğinde *L. monocytogenes* aranmıştır. Soğuk ve sıcak koşullarda iki farklı zenginleştirme tekniği uygulanmıştır. İzolasyon için iki değişik besiyerine ekim yapılarak *Listeria* kolonileri elde edilmiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda 82 beyaz peynirden örneğinden 11'i (%13.4) *L. monocytogenes* açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada soğukta zenginleştirme tekniği ve Oxford agar besiyeri kullanımıyla daha iyi sonuç alınmıştır. Bütün örneklerde *E. aerogenes* ağırlıklı olmak üzere *E. coli*'ye de raslanmıştır.

ABSTRACT: In this study, 82 white cheese samples collected from stores in and around İzmir city were assessed for the presence of *L. monocytogenes*. Two different enrichment techniques have been used for cold and warm conditions. *Listeria* colonies to be isolated were obtained on two different nutritive media. As a result of biochemical and physiological test, 11 of 82 samples (13.4%) were found to be *L. monocytogenes* positive. Better results were obtained by using cold enrichment and Oxford agar as nutritive medium. In all the samples *E. aerogenes* was dominant with *E. coli* in a lesser quantity.

GİRİŞ

İlk defa 1911 yılında tavşandan daha sonra da kobay, keçi, inek ve insandan izole edilen *L. monocytogenes* doğada yaygın olarak bulunan bir türdür.

1929 yılında PIRIE tarafından *Bacterium monocytogenes* şeklinde adlandırılan bakteriyeye daha sonra MURRAY ve ark. tarafından *L. monocytogenes* ismi verilmiştir. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyöz hastalığa da listeriosis denilmiştir (SHARIF, 1990).

Kötü koşullarda hazırlanan silaj, bitki materyalleri, toprak, kanalizasyon çamur ve suyu ile süt ve süt mamülleri gibi besinler sözkonusu bakterinin sıkça izole edilebildiği kaynaklardır. Hatta sağlıklı insan ve hayvanların da bu bakteriyi taşıdıkları belirlenmiştir. 1980'li yıllarda ardarda büyük epidemilerin ortaya çıkması dikkatlerin daha çok gıdalara, özellikle süt mamüllerine çevrilmesine neden olmuştur. Nitekim 1985 yılında ABD'de Kaliforniya eyaletindeki olayda 86 kişiden 29'unun ölümüne, Meksika tipi yumuşak peynirin tüketimi neden olmuştur (GRAY, 1960; GITTER, 1985; HAMMER, HAHN ve HEESCHEN, 1989).

Konuyla ilgili yapılan çalışmada bakteri hem peynir hem de işletme ekipmanlarından izole edilmiştir. Süt işletmelerinde bulaşma ihtimalinin hemen her ortamda mümkün olduğu bildirilerek başta süt toplayıcıları ve taşıma araçları olmak üzere süt sayaçları, separatörler, pıhtı presleri, yıkıma düzenleri ve salamura havuzları ile çalışan personel bakterinin bulaşmasında en etkin araç olarak görülmüştür.

L. monocytogenes'in önemi insan ve hayvan organizmasında birçok hastalığa neden olabilen bir patojen olmasına dayanmaktadır. GITTER (1985) bakterinin yavru atma, septisemik enfeksiyon, mastitis, meningo ensefalitis, konjonktivit, faranjit, sinüzit, gelişme geriliği ile siroz benzeri birçok tehlikeli hastalık oluşturduğunu bildirmiştir.

Türkiye'de genelde peynir yapımı için temin edilen çiğ süt, çoğu zaman düşük kalitelidir. Toplam bakteri sayısı oldukça yüksektir. Bu yüzden uygulanan ısı işlem sonucu mikroorganizmaların büyük bir kısmı sütte canlı kalmaktadır. İşletmelerde temizlik ve hijyen de gereği şekilde yapılmadığından bulaşma kaynağı oldukça fazladır. En önemlisi ise peynirin belli bir olgunlaşma devresi geçirmeden satılmasıdır. Bu nedenlerden

bakterinin peynirde canlı kalma riski artmaktadır. Peynirde bulunması arzulanmayan mikroorganizmalardan bir diğeri de koliform grubu bakterilerdir. Bunlar sütteki laktozu heterofermentatif olarak parçalarlar. Laktik, asetik asit, alkol yanında CO₂ ve H₂ gazı oluşturarak peynirlerde erken şişme denilen yapı bozukluğuna sebep olurlar. Bu arada proteinleri parçalamaları sonucu tat ve aroma bozuklukları da ortaya çıkar. Bu gruptaki *E. coli* ve *E. aerogenes*'in peynirlerde gaz oluşturdukları, %10'dan fazla tuz içeren ortamlarda bile gelişebildikleri araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Sözkonusu bakterilerin peynire çiğ süttten geçtiği, pastörize edilmiş peynir sütünde bulunmadığı halde taze peynirlere yapım aşamasında bulaştığı da ortaya konulmuştur (ERGÜLLÜ, 1980).

Bu grubu oluşturan bakteriler pislik kaynaklı ve indikatör mikroorganizma oluşları nedeniyle peynirlerde aranmaları öngörülmüştür. Nitekim PONCET (1988), PRENTICE ve NEAVES (1988) listeria'nın arandığı durumlarda koliform bakterinin kontrolünün da yapılarak aradaki ilişkinin belirlenmesinin gerekliliğini bildirmişlerdir.

MATERYAL ve METOT

Materyal

İzmir ili ve çevresindeki büyük gıda mağazalarında satışa beyaz peynirlerden 1 yıl boyunca, 4 devrede alınan örnekler araştırmanın materyalini oluşturmuştur. Bu süreçte 0.5 kg.lık 82 adet beyaz peynir örneği satın alınmıştır. Steril kavanozlara konulan örnekler analiz edilinceye kadar buzdolabında saklanmıştır.

Referans suş *L. monocytogenes* ve *L. innocua* ile camp testinde yararlanılan *S. aureus* suşu Refik Saydam Hıfzı Sıhha Enstitüsü İzmir Şubesi bakteriyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

Metot

Örneklerin Analize Hazırlanması

Örnekler önce blenderde parçalanarak homojen bir duruma getirilmiştir. Daha sonra herbirinden 4'er adet 25 g lık tartımlar yapılmıştır (ANONYMOUS, 1990).

L. monocytogenes'in İzolasyonu:

Bu amaçla birçok araştırmacı birbirinden farklı yöntem ve besiyeri önermişlerdir. Ancak materyalin ve bakterinin özelliği ve teknikteki son gelişmeler dikkate alınarak besiyerinin seçimine özen gösterilmiştir.

Zenginleştirme

Sözkonusu bakterinin izolasyon olasılığını yükseltmek ve kolaylaştırmak amacıyla bu işlem yapılmıştır. Bunun için 2 zenginleştirme buyyonu (ZB) kullanılmıştır. Her peynir örneği için içlerinde 225 ml buyyon bulunan 2 ZB₁ (ANONYMOUS, 1990) ve 2 ZB₂ (HICKS ve LUND, 1991) erlenleri hazırlanmış ve 25'er g olarak tartılan örnekler erlenlere aktarılmış ve çalkalanarak karışmaları sağlanmıştır. Her iki ZB'na alınan örneklerden 1'er tanesi soğuk zenginleştirme yapmak için 7 gün süreyle buzdolabında bırakılmıştır. Sıcak zenginleştirmeye ayrılan ZB₁ 30°C'de (2+5) 7 gün, ZB₂ ise 25°C'de (2+5) 7 gün süreyle inkübe edilmiştir.

İzolasyon

1. IDF Yöntemi ile Oxford Agar'da İzolasyon

ZB₁ ve ZB₂'de soğuk ve sıcak koşulda bırakılan örneklerden 1'er öze dolusu alınmış ve çizgi yöntemiyle Oxford Agar plaklarına ekim yapılmıştır. 37°C'nin 1 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Siyahımsı, koyu kahverengi bir zonla çevrili koloniler Tripton Soyton Yeast Extract Agar (TSYEA) plaklarına yine çizgi yöntemiyle aktarılmıştır (ANONYMOUS, 1990).

2. Listeria Selektif Agar (LSA)'da İzolasyon

Daha önceden hazırlanarak petri kutularında dondurulan Listeria Selektif Agar (LSA) besiyerine ZB₁ ve ZB₂'de soğuk ve sıcak koşulda inkübe edilen buyyonlardan ayrı ayrı çizgi yöntemi ile ekim yapılmış ve tüm plaklar 37°C'nin 1 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Küçük, yüzeyi pürüzlü, çevresi şeffaf, parlak, yeşil-mavi, ortası yeşil-sarı olan koloniler geliştirilip saklanmak üzere Tripton Soyton Yeast Extract Agar (TSYEA) plaklarına çizgi yöntemi ile aktarılmıştır (MERCK, 1986)

İdentifikasyon

Tripton Soyton Yeast Extract Agar (TSYEA) Plaklarında gelişen koloni ve bakteri morfolojisi, katalaz reaksiyonu, hareketlilik, hemoliz, karbonhidrat kullanımı incelenmiş ve camp testi uygulanmıştır (RODRIGUEZ, 1985; RALOVICH ve NAIDU, 1988; PRENTICE ve NEAVES, 1988; SEELIGER ve LANGER, 1988; ANONYMOUS, 1990). Bu analizler araştırmacılar tarafından oluşturulan indentifikasyon tablolarıyla karşılaştırılmak suretiyle bakterinin tanımlanması yapılmıştır (GITTERD, 1985; SEELIGER ve LANGER, 1988; SHARIF, 1990).

Koliform Grubu Bakterilerin Belirlenmesi

Söz konusu bakterilerin izolasyonunda Brilliant Green Bile Broth (BGBB) ile Vrolet Red Bile Agar (VRBA) kullanılmıştır (HARRIGAN, 1976). Kolonilerin tanımlanması IMVIC testine göre yapılmıştır. (HARRIGAN, 1976, ERGÜLLÜ, 1980).

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çizelge 1'de görüldüğü üzere 4 değişik devrede temin edilen 82 peynir örneğinden farklı besiyerinde gelişmiş olan kolonilerden *Listeria* şüphesiyle 416 adet izolat incelenmeye alınmıştır.

Çizelge 1. Beyaz Peynir Örneklerinden *Listeria* Şüphesiyle Elde Edilen İzolatların Satış Yeri ve Devrelere Göre Dağılımı

Devre	Satış Yeri						Toplam
	1	2	3	4	5	6	
1	20	37	–	22	22	–	101
2	–	18	–	–	–	–	18
3	19	–	32	24	–	–	75
4	35	38	42	32	42	33	222
Toplam	74	93	74	78	64	33	416

Kolonilerde önce G reaksiyon testi uygulanmıştır. (G+) olanlar Henry ışıklandırma yöntemi ile mikroskopta incelenmiş, düzgün kenarlı, merkezi belirgin mavi-yeşil renkli, konveks olan koloniler ayrılmıştır. Bunlar daha sonra saflaştırma işlemi için Tripton Soyton Yeast Extract Agar (TSYEA) plaklarına alınmıştır. Oluşan kolonilerin katalaz + reaksiyon verenlerinde camp testi, hemoliz testi ile hareketlilik kontrolü yapılmıştır. Biyokimyasal testler ise Tripton Soyton Yeast Extract Bullion (TSYEB)'de gerçekleştirilmiştir. Karbonhidrat kullanımında başlıca ayırıcı farklar olarak ramnoz ve ksiloz testlerinin türlerinin belirlenmesinde önemli rol oynadıkları anlaşılmıştır.

Çizelge 2. *Listeria* İzolatları Elde Edilen Beyaz Peynir Örneklerinin Satış Yeri ve Devrelere Göre Dağılımı

Devre	Satış Yeri						Örnek Sayısı
	1	2	3	4	5	6	
1	1	2	–	1	1	–	5
2	–	1	–	–	–	–	1
3	1	–	1	1	–	–	3
4	2	2	3	2	2	2	13
Toplam	4	5	4	4	3	2	22

Çizelge 2'de görüldüğü gibi *Listeria* genusu içinde yer aldığı belirlenen 22 izolat daha sonra karbonhidrat ve camp testine tabi tutularak tür düzeyinde de belirlenmiştir. Bunlar arasından 11 örneğin *L. monocytogenes* olduğu saptanmıştır. Bu bulgulara göre çalışma boyunca incelenen beyaz peynir örneklerinin %13.4'de *L. monocytogenes*'e raslanmıştır.

Çalışma sırasında bakterinin izolasyonun zorluğu göz önüne alınarak örnekler iki farklı zenginleştirme buyyonuna aşılanmıştır. Her iki ZB soğuk ve sıcak olmak üzere iki farklı sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Soğukta bırakılan her iki buyyondan yapılan ekim sonucu Oxford Agar plaklarında Listeria Selektif Agar (LSA) plaklarına kıyasla daha yüksek oranda *L. monocytogenes* izole edilmiştir.

TÜMBAY ve ark. (1991) 262 beyaz peynir örneğinden %2.7 oranında *L. monocytogenes* izole etmişlerdir.

Bir başka çalışmada 644 adet değişik cins yumuşak peynir örneğinin %93'ünde *L. monocytogenes* izole edildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (HICKS ve LUND, 1991).

JUNG ve ark. (1989) uzun bir periyotta 9 sütçülük işletmesinden temin ettikleri 5558 örnekte farklı Listeria türleri belirlemişlerdir. İşletmelerin dördünde sırasıyla %98, %68, %35 ve %20 gibi oldukça yüksek oranda *L. monocytogenes* saptanmıştır. Çoğunlukta bunların çiğ süt ve bununla bulaşık alet ekipmanlardan izole edildiği bildirilmiştir.

1740 adet peynir örneğinin %3'ünün düşük patojenite gösteren *L. monocytogenes*'i 10^2 adet/g'dan düşük seviyede bulundurduğu belirlenmiştir (COMI, 1990).

BRINDANI ve FRESCHI (1988, 1989) ise farklı tipten 68 peynir örneğinde *L. monocytogenes*'e raslamadıklarını açıklamışlardır.

Çalışmada elde edilen bulgular diğer araştırmacılarınki ile kıyaslandığında bazıları ile benzer, bazıları ile oldukça farklı olduğu dikkati çekmektedir. Burada en büyük etkenin incelenen materyalin özellikleri ile izolasyon yöntemlerinden ileri geldiği kanısına varılmıştır.

Nitekim SEELIGER ve LANGER (1988) bunun için sıcakta FDA zenginleştirme buyyonunu, izolasyonda ise sikloheksimid ilaveli modifiye Mc.I Bride Agar (MMA) önermişlerdir. TÜMBAY ve ark. (1988) aynı yöntemi kullanmışlardır.

MEUMER ve ark. (1988) LiCl ve nalidixic asit ilaveli zenginleştirme buyyonunda zenginleştirmeyi takiben Oxford Agar ve LPM'nin başarıyla kullanıldığını ortaya koymuşlardır.

JATISATIENR ve BUSSE (1989) zenginleştirmede LOVETT buyyonunun tiyosiyanat buyyonundan çok daha iyi sonuç verdiğini, Oxford Agar'ın izolasyon için güvenilir bir ortam olduğunu açıklamışlardır.

SHARIF (1990) TFB'de 4°C'de 2 ay süreyle zenginleştirmeyi müteakip SMLA besiyeri üzerinde %18.2 oranında *L. monocytogenes* izole etmiştir. Araştırmacı uzun süreli soğuk zenginleştirme ile psikrofil karakterli Listeria'nın gelişmesine olanak sağlandığı için izolasyonun daha kolay olduğunu bildirmiştir.

Çalışmada koliform grubu bakterilerin aranmasına da yer verilmiştir. Çizelge 3'te analizi yapılan 82 örnekte belirlenen koliform grubu bakterilerin ortalama değerlerinin devrelere ve satış yerlerine göre dağılımı verilmiştir. Ağırlıklı olarak *E. aerogenes* izole edilmiş, ancak hemen her devrede farklı satış merkezlerinden alınan peynir örneklerinde *E. coli*'ye raslanmıştır. Fakat *L. monocytogenes*'in bulunuşu ile koliform grubu bakterileri arasında herhangi bir ilgi saptanmamıştır. Sonuçta örneklerde *E. coli*'nin belirlenmiş olması beyaz peynir işletmelerindeki koşulların istenilen düzeyde olmadığı ortaya konmaktadır.

ERGÜLLÜ (1980), ERALP ve ark. (1974) larının 54 adet beyaz peynirden 4 farklı olgunlaşma aşamasında 216 örnek temin ettiklerini ve yaptıkları analizlerde çiğ süttten yapılan taze peynirlerde 2×10^2 - 2.3×10^3 /g arasında, 3.5 aylık olanlarda 2×10^2 /g'dan az sayıda koliform belirlediklerini bildirmiştir.

Çizelge 3. Değişik Satış Yerlerinden Farklı Zamanlarda Alınan Beyaz Peynir Örneklerinde Saptanan Koliform Grubu Bakterilerin Dağılımı (x100/g)

Devre	Satış Yeri					
	1	2	3	4	5	6
1	180	53x	11	159x	23	76
2	37	14	143x	312	714x	98x
3	8	72x	291	34	241x	172x
4	42x	69	482	213	522	138x

x: *E. coli* belirlenen satış yerleri ve devreleri

ERGÜLLÜ (1980) yaptığı çalışmada koliform bakterilerinin birçok faktöre bağlı olarak ham peynirden itibaren olgunlaşma süresi ilerledikçe azaldığını ortaya koymuştur. 10. günde $7.5 \times 10^6/g$ iken 90. günde $2.3 \times 10^4/g$, 180. günde 47 adet/g'a düştüğünü saptamıştır. *E. coli* ve *E. aerogenes*'in ağırlıklı olarak bulunduğunu ve bunların beyaz peynirde delik oluşturdıklarını da belirlemiştir.

KAYNAKLAR

- AL-GAZALİ, M.R., 1988. Isolation Procedure of Listeria Species. Turkish J. of Infect. 2 (4) 544-550.
- ANONYMOUS, 1990. Milk and Milk Products, Detection of *L. monocytogenes*. IDF Standart 143 (1990)
- BEUMER, R.R., COX, L.J., STOCHHORST, I., SHERBINII, M.: 1988 Detection of listeria Species in Cheese, Modern Microbiological Methods for Dairy Products.
- BRINDANI, F., FRESCHI, E., 1989. *L. monocytogenes* in sheep and goat milk and in various cheeses. Annali della Facolta di Medicina, Veterinaria, Univer. Di Parma. 8-9 205-219.
- CONI, G., CANTONI, C., VALENTI, M., CILINI, M., 1990. Listeria Species in Italian Cheeses. Micro-biologie, Aliments, Nutrition 8 (4) 377-382.
- ERGÜLLÜ, E., 1980. Beyaz Peynirlerin Olgunlaşması Sırasında Mikrofloranın, Özellikle Gaz Yapan Bakterilerin Değişimi Üzerine Araştırmalar. Doç. Tezi, Bornova.
- GITTER, M., 1985. Lisbteriosis in Farm Animal in Great Britain. In: Isolation and Identification of Microorganisms of Medical and Veterinary Importance. Ed. Collins, C.H. Society of Appl. Bact. 191-200.
- GRAY, M.L., 1960. Isolation of: *L. monocytogenes* from oat silage J. of Dairy Sci. 132, 1767-1768.
- HAMMER, PH., HAHN G., HEESCHEN, W., 1989. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von *L. monocytogenes* in weichk" se. Killer. Milchw. Forsch. 41 (3) 175-210.
- HARRIGAN, W.F., Mc Cance, M.E., 1976. Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc. London LTD (XII+452).
- HICKS, S.J., LUND, B.M., 1991. The Survival of *L. monocytogenes* in Cottage Cheese. J. of Appl. Bact. 70 (4) 308-314.
- JAT8ISATIENR, C, BUSSE, M., 1989. Comparison of Selective Media for Listeria. Microbiological Methods for Dairy Methods. 399-401.
- JUNG, W., FUTZ, H., SULZER, G., BUSSE, M., 1989. Distribution of Listeria in Cheese and environment. Modern Microbiological Methods of Dairy Product. (XVI+440) 153-160.
- MERCK, E.: N., 1986. Hboden Handbuch Copyright, Darmstadt 2245.
- PONCET, L.V., 1988. *L. monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. Techniques Laiti, res et Marketing (31) 1027.
- PRENTICE, G.A., NEAVES, p.: 1988 *L. monocytogenes* in food, its significance and methods for its detection. Bulletin of IDF (223) 3-9
- RALOVICH, B.S., NAIDU, A.S., 1988. Data to the cultivation and isolation of Listeria. Turkish J. of Infect. 2 (4) 553-560.
- RODRIGUEZ, L.D. et al.: Isolation de microorganismes du genre Listeria... partir du lait cru destin, ...la comsomption humaine Canad. J. Microbiol.
- SEELIGER, H.P.R., LANGER, B., 1988. Methods of Detection, Isolation and Identification of *L. monocytogenes* and Related Species from Clinical Samples. food and Envir. Sources. Turkish W. of Infect. 2 (4) 607-616.
- SHARIF, A., 1990. Çeşitli Yörelere ait Çiğ Sütlerin ve Ankara Piyasasında Satılan Pastörize Sütlerin *L. monocytogenes* Açısından Değerlendirilmesi. Yüks. Lis. Tez. Ank. Üniv. F.E.B. Gıda Bil. Ve Tekn. ABD.
- TÜMBAY, e., SEELIGER, H.P.R., INCI, R., COŞAR, G., LANGER, B.: 1988 Isolation of Listeria from Cheese in Turkey. Turkish J. of Infect. 2 (4) 593-598.