

ANKARA'DA TÜKETİME SUNULAN PASTÖRİZE SÜTLERDEN HAREKETLİ AEROMONAS TÜRLERİNİN İZOLASYON VE İDENTİFİKASYONU

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MOTILE AEROMONAS SPECIES IN PASTEURIZED MILK CONSUMED IN ANKARA

Belgin SARİMEHMETOĞLU, Özlem KÜPLÜLÜ, Şerif KAYMAZ

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET: Bu çalışmada, Ankara'da tüketime sunulan pastörize sütlerden toplam 100 adet alınarak hareketli Aeromonas türlerinin varlığı incelenmiştir. Analiz edilen numunelerin %19'unun hareketli Aeromonas'lar ile kontamine oldukları tesbit edilmiştir. İdentifikasyon sonucu numunelerin %68.4'ünün *A. caviae*, %21.0'nun *A. hydrophila* ve %10.5'inin ise *A. sobria* olduğu saptanmıştır.

Sonuç, olarak, hareketli Aeromonas'ların gıda kaynaklı patojen olarak pastörize sütlerde bulunabileceği ve bu sütlerin insanlar için potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olabileceği kanısına varılmıştır.

ABSTRACT: In this study, a total of 100 samples of pasteurized milk purchased at markets in Ankara were analyzed for the presence of motile Aeromonas. It is indicated that, pasteurized milk was contaminated with 19% of motile Aeromonas. From positive sample, 68.4% of *A. caviae*, 21% of *A. hydrophila* and 10.5% of *A. sobria* were identified. As a result, motile Aeromonas spp. can be found in pasteurized milk as a potential food pathogen and it was of the opinion that, those milk could be an important source of Aeromonas infection in humans.

GİRİŞ

Hareketli Aeromonaslar, birçok ülkede özellikle yaz aylarında, çocuklarda, yaşlılarda ve immun sistemi baskılanmış insanlarda gastroenteritis ile seyreden enfeksiyonlardan sorumlu mikroorganizmalar olarak bilinmektedir (ABEYTA ve WEKELL, 1988; ALTWEGG, 1985; BUCHANAN ve PALUMBO, 1985; WAITES ve ark., 1993; WATSTRÖM ve LJUNGH, 1991). Bu enfeksiyonların başlıca kaynağı deniz suları, klorlanmış veya klorlanmamış sular ve dışkı ile kirlenmiş sulardır. Bu konuda KNOCHEL ve JEPPESEN (1990)'in Danimarka'da yaptıkları çalışmada 191 içme suyunun 54'ünden (%28), yine BURKE ve ark. (1984) klorlanmamış su kaynaklarından aldıkları toplam 764 numunenin 260'undan (%34) Aeromonas türleri izole etmişlerdir. GÜRSOY (1993), Ankara'daki askeri birliklere ait su numunelerinde yaptığı çalışmada 50 numunenin 18'inden hareketli Aeromonas spp. izole etmiştir. Bu oran içerisinde *A. hydrophila*'nın %55.6, *A. sobria*'nın %33.3, *A. caviae*'nin ise %11.1 olduğunu bildirmiştir. Aeromonas'lar ile kontamine sular deniz ürünlerini, sebzeleri, et ve süt ürünlerini indirekt olarak kontamine etmekte ve bu mikroorganizmanın gıda zincirine girmesine neden olmaktadır (ABEYTA ve WEKELL, 1988). Nitekim yapılan çalışmalarda da balık, tavuk, kırmızı et, sebze, çiğ süt, peynir ve dondurma gibi pekçok gıdanın Aeromonas'lar ile kontamine olduğu bildirilmiştir. (FLEMING ve ark., 1985; HUNTER ve BURGE, 1987; İBRAHİM ve RAE, 1991; KİROV ve ark., 1990; NISHIKAVA ve TERUHIKOÇ, 1988; OKREND ve ark., 1987; TAYAR ve ark., 1994; WATSRÖM ve LJUNGH, 1991).

Hareketli Aeromonas türleri de *Listeria monocytogenes* (FLEMING ve ark., 1985) ve *Yersinia enterocolitica* (GREENWOOD ve ark. 1990) gibi buzdolabı sıcaklığında çoğalabilme yeteneğinde olan bir patojendir (POPOFF, 1984). Yapılan bir çalışmada başlangıçta önemsiz düzeyde (2.2×10^1 kob/ml) Aeromonas içeren çiğ sütlerde 5°C'de 7 gün bekletildikten sonra Aeromonas sayısında önemli düzeyde artış (5.0×10^4 kob/ml) gözlemlendiği bildirilmiştir (PALUMBO ve ark. 1985). Bir çok gıdanın buzdolabında muhafaza edildiği ve pastörize süt, sebze gibi bazılarının tekrar ısı işlemi görmeden tüketildiği de bilinmektedir. Bu nedenle Aeromonas ile kontamine olmuş pastörize sütlerin tüketimi özellikle çocuklar, yaşlılar ve hastalar açısından endişe verici olup, gözardı edilemeyecek derecede önemlidir.

Aeromonas'lar, Vibrionaceae familyasına ait, Gram (-), fakültatif anaerob mikroorganizmalar olup, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* ve *A. salmonicida* olmak üzere dört grupta toplanmaktadırlar. Bu soy aynı zamanda *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. caviae*'yi içeren *A. hydrophila* ile *A. salmonicida* ve alt tiplerini içeren *A. salmonicida* olmak üzere iki grupta da toplanmaktadır. *A. hydrophila* grubu hareketli olup, 37°C'de ürer. *A. salmonicida* grubu ise hareketsiz olup, 37°C'de üreyemez ve özellikle de somon balıkları için patojendir. *A. hydrophila* ise genellikle hareketli ya da mezofilik Aeromonas'lar olarak bilinmekte ve insanlarda patojen olduğundan, halk sağlığı problemi oluşturmaktadır (PALUMBO ve ark., 1992; POPOFF, 1984).

Aeromonas'ların ve oluşturdukları sitotoksik enterotoksinlerin 56°C'de 10 dakikada, sitotoksik enterotoksinlerin ise 56°C de 20 dakikada yıkımlandıkları bildirilmektedir (HOUSTON ve ark., 1991; PALUMBO ve ark., 1987). Dolayısıyla süte uygulanan 72°C de 15-20 sn'lik pastörizasyon işleminden sonra Aeromonas'ların ve toksinlerinin bulunmaması gerekir. Ancak yapılan çalışmalarda gerek pastörize sütlerde gerekse süt ürünlerinde Aeromonas tespit edilmiş ve bu ürünlerin Aeromonas kaynaklı enterit vakalarında önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (FREITAS ve ark., 1993; HUNTER ve BURGE, 1987; İBRAHİM ve RAE, 1991; KIROV ve ark., 1993). Nitekim yapılan çalışmalarda PALUMBO ve ark. (1985), çiğ sütlerde sayısal olarak $2.2 \times 10^2 - 5.0 \times 10^4$ kob/ml düzeyinde, KIROV (1993), 72 numunenin 43'ünden (%59,7), İBRAHİM ve RAE, (1991) 150 numunenin 40'ından (%27) Aeromonas spp. izole etmişlerdir. Pastörize sütlerde ise KIROV ve ark. (1993), 183 numunenin 7'sinin (%3.8), FREITAS ve ark (1993), 35 numunenin 10'unun (%28.5) hareketli Aeromonas spp. ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir.

Bu düşünceden hareket ederek, Ankara'da tüketime sunulan pastörize sütlerin de hareketli Aeromonas'lar yönünden incelenip, halk sağlığı açısından risk taşıyıp taşımadığının araştırılması, bu çalışmanın amacını oluşturmuştur.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada, 1995 yılı Mayıs-Temmuz aylarında muhtelif günlerde Ankara'da tüketime sunulan biri karton ambalajda diğerleri şişede satılan 4 farklı firmaya ait ve herbirinden 25'er adet olmak üzere toplam 100 adet günlük pastörize süt numunesi materyal olarak kullanılmıştır.

Süt numuneleri, aynı gün termos içerisinde laboratuvara getirilmiş ve hemen analize alınmıştır.

Mikrobiyolojik Analizler:

Aerob mezofil genel mikroorganizma sayımı: Süt numunelerinin her birinden 10'ar ml alınmış ve 90'ar ml %0.01'lik steril peptonlu suda homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra her numunenin 10⁻⁵'e kadar yapılan dilüsyonlarından Tryptone Soya Agar'a (OXOID CM 131) damla plak yöntemi ile ekim yapılmıştır. Plakların 37°C'de, 24-48 saat inkubasyonu sonucu üreyen koloniler değerlendirilmiştir.

Hareketli Aeromonas'ların izolasyon ve identifikasyonu: Ön çalışmalarda süt numunelerinden kantitatif olarak Aeromonas Agar'a (Oxoid-CM 833) 0.1 ml yayma plak yöntemi ile yapılan ekimler sonucunda plaklarda tipik üremeye rastlanmadığı için, Aeromonas izolasyonu kalitatif olarak yapılmıştır. Bu amaçla, 25 ml süt, 30 mg/l ampicillin içeren 225 ml Tryptone Soy Broth'da (Oxoid-CM 129) 28°C'de 24 saat zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme yapılan numunelerden Aeromonas Agar'a ekim yapılarak plaklar 30°C'de 24 saat inkube edilmiştir. Inkubasyonu takiben koyu yeşil merkezli, yeşil renkteki şüpheli kolonilerin Tryptone Soy Agar'da 30°C'de 24 saat inkubasyonu sonucu Vibriostatik ajan 0/129'a (2-4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) dirençli, Gram (-), Oksidaz (+), hareketli ve 37°C'de üreyen, Mannitol fermentasyonu (+), %5 NaCl içeren Nutrient Broth'da (DIF-CO-003-01-6) 37°C'de üreme (-), Kaper's besiyerinde tipik üreme [H₂S (-), İndol (+), tüp yüzeyinde alkalik, bant, dipte asit oluşumu] sonucu hareketli Aeromonas olduğu belirlenen kültürlerden tip tayini yapılmıştır. Bu amaçla, eskulin hidrolizasyonu, KCN brothda üreme, Voges-Proskauer reaksiyonu, salisin fermentasyonu, kanlı agarda β-hemoliz oluşumu incelenerek hareketli Aeromonas türleri *A. hydrophila*, *A. caviae* ve *A. sobria* olarak belirlenmiştir (PALUMBO ve ark., 1992).

Çizelge 1. Pastörize süt numunelerinden izole edilen hareketli Aeromonas Türleri ve Aerob Mezofil Genel Mikroorganizma sayıları

Firmalar	Aeromonas (+) Numune sayısı	İzole Edilen Türler			Aerob genel mikroorg. (ort.) kob/ml
		A. hydroph.	A. caviae	A. sobria	
A** n=25	7(28)	2(28.6)	5(71.4)	0(0)	2.75x10 ⁴
B* n=25	3(12)	0(0)	3(100)	0(0)	6.45x10 ³
C** n=25	5(20)	1(20)	4(80)	0(0)	1.57x10 ⁴
D** n=25	4(16)	1(25)	1(25)	2(50)	1.69x10 ⁴
N=100	19(19)	4(21)	13(68.4)	2(10.5)	

*= Karton ambalajda tüketime sunulan üst numuneleri

**= Şişede tüketime sunulan süt numuneleri

n= Numune sayısı

BULGULAR

Ankara'da tüketime sunulan toplam 100 adet pastörize süt numunelerinden izole edilen hareketli Aeromonas türleri ve Aerob Mezofil Genel Mikroorganizma sayıları, Çizelge-1'de verilmiştir.

Çizelge 1'de görüldüğü gibi, Aeromonas ile kontamine olmuş numune sayısı, her ne kadar firmalara göre az ya da çok değişse de pastörize süt numunelerinde genel olarak %19 düzeyinde Aeromonas kontaminasyonunun söz konusu olduğu, kontaminasyonun en fazla A.caviae'den kaynaklandığı (%68.4), bunu %21.0 ile A. hydrophila ve %10.5 ile A. sobria'nın takip ettiği saptanmıştır. Aerob mezofil genel canlı mikroorganizma düzeyi ise, ortalama olarak A, B, C ve D firmalarında sırasıyla 2.75x10⁴, 6.45x10³, 1.57x10⁴ ve 1.69x10⁴ kob/ml olarak tesbit edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerek hareketli Aeromonas'lar ve gerekse oluşturdukları toksinler pastörizasyon ısısına dayanıklı olmadığı için (HOUSTON ve ark., 1991), pastörize sütlerle ilgili çok az çalışmaya rastlanmıştır. KIROV ve ark. (1993), 183 pastörize sütün 7'sinden (%3.8) hareketli Aeromonas izole etmişlerdir. Bu oran içerisinde A. sobria %42.9, A. hydrophila %28.6, ve A. caviae ise %28.6 bulunmuştur.

FREITAS ve ark. (1993), yine 35 pastörize sütün 10'undan (%28.5) hareketli Aeromonas izole etmişler ve kontaminasyonda en önemli rolün %58.9 ile A. caviae'den kaynaklandığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da en yüksek düzeyde A. caviae (%68.42)'nin izole edilmiş olması, bu araştırmacıların bulguları ile uyum göstermektedir.

Çiğ ve pastörize sütlerden kaynaklanan enfeksiyonlar sonucu yapılan sanitasyon kontrollerinin çoğunda, pastörizasyon sırasında süte uygulanan ısı-zaman kombinasyonlarının yetersiz kaldığı (BIRKHEAD ve ark., 1988; RAMPLING ve ark., 1987; STANESCU ve ark., 1992), ya da pastörizasyon sonrası kontaminasyonların önemli rolü olduğu (GERINGER, 1983; MAHARI ve GASHE, 1990; SHARP, 1985; STANESCU ve ark., 1992) bildirilmiştir. Bu çalışmada da pastörize sütte tesbit edilen Aerob mezofil genel mikroorganizma sayısı her ne kadar Gıda Maddeleri Tüzüğü'nün önerdiği (ANONYMOUS, 1982) 4.0x10⁴ kob/ml düzeyini geçmiyor olsa da (Çizelge 1), Aeromonas gibi patojen bir mikroorganizma ile kontaminasyonun söz konusu olması, yeterince teknolojik ve hijyenik önlemlerin alınmadığı şüphesini uyandırmaktadır.

Firmalardan birinin karton ambalajda, diğer üçünün şişelerde satışa sunduğu süt numunelerinde gerek Aeromonas kontaminasyonunun gerekse aerob mezofil genel mikroorganizma sayılarının karton ambalajda satılan süt numunelerinde daha az olduğu tespit edilmiştir (Çizelge-1). Dolayısıyla bu durum, kontaminasyonun daha çok şişelerin iyi temizlenmediği ya da temizlikte kullanılan suların daha önceden Aeromonas'lar ile kontamine olabileceği şüphesini uyandırmaktadır.

Aeromonas ile kontamine sütlerin buzdolabında muhafaza süresinin uzaması da, Aeromonas'ların sayısal artışına neden olmaktadır (PALUMBO ve ark., 1985). Bu nedenle, depolama koşullarının uzamaması, mümkünse pastörize sütlerin günlük tüketilmesi, korunmada faydalı olacaktır.

Sonuç olarak, Ankara'da tüketime sunulan pastörize sütler hareketli Aeromonas'lar açısından özellikle çocuklar, yaşlılar ve immun sistemi baskılanmış insanlar açısından potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle pastörizasyon sonrası hijyen kurallarına çok önem verilmeli ve özellikle süt şişelerinin ve dolum makinelerinin temizliğine özen gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

- ABEYTA, C., WEKELL, M.M. 1988. Potential sources of *Aeromonas hydrophila*. J. Food Safety. 9:11-12.
- ALTWEGG, M. 1985. *Aeromonas caviae*: An enteric pathogen? Infection 13 (5): 228-230.
- ANONİM. 1982. Gıda Maddelerinin ve Umumi Sağlığı İlgilendiren Esya ve Levazımın Hususi Vasıflarını Gösteren Tüzük. Titiz Ofset Matbaası, Ankara, 16-18.
- BIRKHEAD, G., VOGT, R.L., HEUN, E., EVELTI, C.M., PATTON, C.M. 1988. A multiple strain outbreak of *Camphyllobacter enteritis* due to consumption of inadequately pasteurized milk. J. Food Infect. Diseases. 157(5):1095-1097.
- BUCHANAN, R.L., PALUMBO, S.A. 1985. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: A review. J. Food Safety. 7: 15-29.
- BURKE, V., ROBINSON, J., GRACEY, M., PETERSON, D., MAYER, N., HALEY, V. 1984. Isolation *Aeromonas* spp. from on unchlorinated domestic water supply. Appl. Environ. Microbiol. 48(2): 367-370. 1984.
- FLEMING, D. W., COCHI, S.L., MACDONALD, K.L., BROUNDUM, P.S., HAYES, P.D. PLIKAYTIS, B.D. HOLMES, M.B., ANDURIER. A., BROOME, C.V., A.L. REINGOLD. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 321:404-407.
- FREITAS, A.C., NUNES, M.P., MILHOMEM, A.M., RICCIARDI, I.D. 1993. Occurrence and characterization of *Aeromonas* in pasteurized milk and White cheese in Rio De Janeiro, Brazil. J. Food Prot. 56(1): 62-65.
- GERINGER, M. 1983. Lebensmittelvergiftungen durch enterotoxinbildende *Staphylococcus aureus*-Stämme in H-Milch und einem UHT-Milchmischgetränk. Tierarztl. Umschau. 38:98-109.
- GREENWOOD, M.H., HOPPER, W.L., RODHAUSE, J.C. 1990. The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: An investigation at a dairy. Epidemiol Infect. 104: 351-360.
- GÜRSOY, K. 1993. Ankara'daki askeri birliklerin su kaynaklarında *Aeromonas*'ların bulunuşu. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- HOUSTON, C.V., CHOPRA, A.K., KUROSOKY, A. 1991. Review of *Aeromonas* enterotoxins. In:Freitas, A.C., Nunes, M.P., Milhomem, A.M., Ricciardi, I.D. (1993). Occurrence and characterization of *Aeromonas* in pasteurized milk and White cheese in Rio De Janeiro, Brazil. J. Food Prot. 56(1): 62-65.
- HUNTER, P.R., BURGE, S.H. 1987. Isolation of *Aeromonas caviae* from icecream. Letters Appl. Microbiol. 4: 45-46.
- İBRAHİM, A., MAC RAE, I.C. 1991. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. In red meat and milk samples in Brisbane, Australia. Int. J. Food Microbiol. 12:263-270.
- KIROV, S.M., ANDERSON, M.J., MC MEEKIN, T.A. 1990. A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogen. J. Appl. Bacteriol. 63: 327-334.
- KIROV, S.M., HUI, D.S., HAYWARD, L.J. 1993. Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. J. Food Prot. 56(4):306-312.
- KNOCHEL, S., JEPPESEN, C. 1990. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. Int. j. Food Microbiol. 10(3-4): 317-322.
- MAHARI, T., GASHE, B.H.A. 1990. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the sources of contamination in a milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia. J. Dairy Res. 57:233-238.
- NISHIKAVA, Y., TERUHIKOÇ, K. 1988. Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens. Epidem. Inf. 101: 213-223.
- OKREND, A.J.G., ROSE, B.E., BENNETT, B. 1987. Incidence and toxigenicity of *Aeromonas* species in retail poultry, beef and pork. J. Food Prot. 50(6):509-513.
- PALUMBO, S.A., MAXINO, M., WILLIAMS, A., BUCHANAN, C R.L., THAYER, D.W. 1985. Starch-Ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. Appl. Environ. Microbiol. 50(4): 1027-1030.
- PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C., BUCHANAN, R.L., PHILLIPS, J.G. 1987. Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. J. Food Prot. 50(9): 761-764.
- PALUMBO, S., ABEYTA, C., STELMA, G. 1992. *Aeromonas hydrophila* group. In:Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed:VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, F. 3. rd ed. American Public Health Assoc, Washington, 497-509.
- POPOFF, M. 1984. Genus III. *Aeromonas*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, London, Williams and Wilkins Co. Vol 1. 545-548.

- RAMPLING, A., TAYLOR, C.E.D., WARREN, D.E. 1987. Safety of pasteurized milk. *The Lancet*. 2:1209.
- SHARP, J.C.M. 1985. Infections associated with milk and dairy products in Europe and North America, 1980-1985. Canadian Federal Food Directorate Seminar, Ottawa, 1-6.
- STANESCU, V., CHIRILA, F., SAHLEANU, C., VANA, V., DAMIAN, A. 1992. The level of coliform and *E. coli* titre as hygienic quality index of raw and pasteurized milk and of chicken meat. 3rd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. 16-19 June 1992, Berlin, 351-354.
- TAYAR, M., ÇETİN, C., ŞEN, C., ŞEN, A., EYİĞÖR, A. 1994. Bursa et ve balık kurumunda kesilen koyun ve keçilerin hareketli *Aeromonas*'lar yönünden incelenmesi. *U.Ü. Veteriner Fak: Derg.* 1-2-3 (13):1994.
- WAITES, W.M., DODD, E.R., BOLTON, K.J. 1993. Microbial food poisoning: Problems and solution. *British Food J.* 1:4-9.
- WATSTRÖM, T., LJUNGH, A. 1991. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food and waterborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 12:303-312.