

# BEYAZ PEYNİR, ÇİĞ VE PASTÖRİZE SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDE İODOMETRİK TEST VE KROMOJENİK SEFALOSPORİN TEST (NİTROCEFİN) YÖNTEMLERİYLE BETA LAKTAMAZ ARAŞTIRMASI

## THE INVESTIGATION OF BETA-LACTAMASE BY USING IODOMETRIC TEST AND CHROMOGENIC CEPHALOSPORIN TEST (NITROCEPHIN) IN THE BACTERIA ISOLATED FROM WHITE CHEESE, RAW AND PASTEURIZED MILK SAMPLES

Güven URAZ<sup>1</sup>, Seza ARSLAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,

<sup>2</sup>Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı,

**ÖZET:** Araştırmada Ekim 1993-Mart 1994 tarihleri arasında 197 örnek çeşitli süt işletmelerinden alınarak çalışılmıştır. 197 örneğin, 103'ü çiğ, 52'si pastörize süt ve 42'si beyaz peynirdir. Araştırmada çalışılan toplam 197 örneğin 190'nında bakteri üremiş, 7'sinde üreme görülmemiştir. 190 bakteri üreyen örnekten, izole edilen bakteri sayısı toplam 597'dir. Araştırmamızda çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen toplam 597 bakterinin İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz enzim varlığı test edilmiştir. 286'sı (%47,90) beta-laktamaz enzimi pozitif olarak bulunmuştur. Geriye kalan 311'i (%52,10) beta-laktamaz enzimi negatiftir. 286 beta-laktamaz pozitif bakterinin, 142'si çiğ süt, 74'ü pastörize süt ve 70'i beyaz peynir örneklerinden izole edilmiştir. Ayrıca 286 beta-laktamaz pozitif bakterinin 187'si Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefın) yöntemiyle de çalışılarak enzim varlıkları kontrol edilmiştir. 286 beta-laktamaz pozitif bakterinin, 128'i (%44,75) *Escherichia coli*, 40'ı (%13,99) *Klebsiella*, 36'sı (%12,59) *Enterobacter*, 46'sı (%16,08) *Staphylococcus aureus*, 2'si (%0,70) *Staphylococcus epidermidis*, 1'i (%0,35) *Pseudomonas*, 1'i (%0,35) *Serratia*, 30'u (%10,49) *Bacillus* ve 2'si (%0,70) *Lactobacillus* olarak adlandırılmıştır.

**ABSTRACT:** In the investigation; 197 samples from several different milk companies have been worked between the periods of October 1993 March 1994. Among 197 samples; 103 was raw; 52 was pasteurized milk and 42 was white cheese. A bacterial production has been seen in the 190 samples of totally 197 raw, pasteurized milk and cheese samples where no production has been seen in 7 of them. 597 bacteria have been isolated from 190 samples which shows production. In our investigation; the presence of beta-lactamase enzyme of totally 597 isolated bacteria from raw and pasteurized milk and white cheese has been tested by using iodometric test 311 (52.10%) have negative beta-lactamase enzyme. Among 286 beta-lactamase positive bacteria; 142 are isolated from raw milk, 74 from pasteurized milk and 70 from white cheese. In the 187 of 286 beta-lactamase positive bacteria; the presence of enzyme has been controlled additionally by using chromogenic cephalosporin test (Nitrocephin) method. 128 (44.75%) of 286 beta-lactamase positive bacteria are named as *Escherichia coli*; where 40 (13.99%) as *Klebsiella*; 36 (12.59%) *Enterobacter*; 46(16.08%) *Staphylococcus aureus*; 2(0.70%) *Staphylococcus epidermidis*; 1(0.35%) *Pseudomonas*; 1(0.35%) *Serratia*; 30(10.49%) *Bacillus* and 2(0.70%).

### GİRİŞ

Beta-laktamaz enzimi gram pozitif ve gram negatif bakteriler tarafından sentezlenebilen ve sentezlendiği bakteriye çok yönlü direnç kazandıran bir enzimdir. Sütte üreyen patojen olan veya olmayan pekçok bakteri beta-laktamaz enzimini sentezleyebilmektedir. Beta-laktamaz enzimi genellikle beta-laktam antibiyotiklerini inhibe eden bir enzimdir. Bu tür enzim bulunduran bakteriler süt aracılığıyla insan organizmasına geçebilmektedirler. Örneğin; *Staphylococcus*'lar beta-laktamaz enzimi üreten başlıca bakterilerdir. Mastitisli hayvanlardan sıklıkla izole edilen *Staphylococcus aureus*'lar süte bulaşabilmekte ve sütte uzun süre kalabilmektedir. Çiğ süt, pastörize süt veya süt ürünlerinde bulunmaları halinde önemli olabilirler. Bu düşüncelerden hareketle araştırmamız konusu seçilmiştir. Araştırmamızda çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynirden izole edilen 597 bakterinin çeşitli yöntemlerle beta-laktamaz enzim varlığı test edilmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada 4.10.1993-5.3.1994 tarihleri arasında toplam 197 örnek çeşitli süt işletmelerinden sağlanarak çalışılmıştır. 197 örneğin 103'ü çiğ süt, 52'si pastörize süt ve 42'si beyaz peynirdir. Örneklerden PCA ve EMB besiyerlerine ekim yapılarak bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu besiyerlerinde üreyen bakterilerin adlarını belirlemek amacıyla çeşitli biyokimyasal testler yapılmıştır. Çalışılan beyaz peynir, çiğ süt ve pastörize süt örneklerinin PCA basiyerinde toplam canlı bakteri sayımı da bu örneklerin bakteriyolojik niteliğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmamız doğrultusunda bu örneklerden izole edilen bakterilerin beta-laktamaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Testler sonucunda adlandırılan bakteriler saf kültür olarak %0,2 çözünebilir nişasta içeren Nutrient agar besiyerinde yeniden üretilmişlerdir. Bu besiyerinde üreyen bakterilerin beta-laktamaz enzim varlığı çalışılarak test edilmiştir.

Aynı amaçla, İodometrik Test ve Kromojenik Sefalosporin Test'leri (Nitrosefin) uygulanmıştır. Her iki test sonucunda pozitif çıkan bakterilerin penisilin-G ile antibiyogram testleri yapılarak penisilin-G'ye dirençleri kontrol edilmiştir (WASHINGTON, 1985). Araştırmada Türk Standartları Enstitüsünde (TSE-1018) belirtilen esaslara göre çiğ ve pastörize süt örnekleri steril 200 ml'lik şişelerde laboratuvara getirilmiştir (ANONYMOUS, 1981). Pastörize süt örnekleri, çiğ süt örneklerinin alındığı aynı günde imal edilen pastörize sütlerden alınmıştır. Çiğ süt örneklerinden fizyolojik tuzlu su kullanılarak  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  lük dilüsyonlar hazırlanmıştır (CLARK, 1978; GILLIAND, 1984). Ve  $10^{-3}$  dilüsyon tüpünden steril pipetle alınan 0,1 ml'lik çiğ süt örnekleri PCA ve EMB besiyerlerine ekilmiştir. 200 ml'lik şişeyle alınan pastörize süt daha önceden steril edilen iki erlene eşit olarak paylaştırılmıştır. Tüketime sunulan pastörize sütlerin saklanma koşulları düşünülerek pastörize sütlerden birincisi +22°C'de oda ısısında 24 saat bekletilmiştir. Pastörize sütün ikincisi de +4°C'de buzdolabı ısısında 48 saat beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra her iki pastörize süt örneğinden steril pipetle 0,1 ml alınarak PCA ve EMB besiyerine ekim yapılmıştır.

Beyaz peynir örneklerinden steril bıçakla kesilen 10 gr beyaz peynir örneği, steril porselen havanda sıcaklığı 45°C olan 90 ml trisodyum sitrat ile iyice ezilmiştir. Ve  $10^{-1}$  dilüsyonlu beyaz peynir örneği hazırlanmıştır. Bu örneklerden de 0.1 ml alınarak PCA ve EMB besiyerine ekilmiştir. Daha sonra çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden inkübasyon sonrası üreyen bakterilerin sayımları yapılmıştır. Seyreltme oranı dikkate alınarak 1 ml örnekteki toplam canlı mikroorganizma sayısı hesaplanmıştır (CLARK, 1978; GILLIAND, 1984; GÜRGÜN, 1988; HARRIGAN, 1966). Ayrıca bakterilerin adlandırılmaları için çeşitli biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Üre, indol, sitrat, metil red, voges proskauer, triple sugar iron (TSI), lizin dekarboksilaz, ornitin dekarboksilaz, arginin dehidrolaz, dulsitol, maltoz, mannitol, laktoz, sükröz fermantasyonu, hareket (SIM), glikozdan gaz ve glikozdan asit, nitrat redüksiyonu, oksidaz testleri yapılmıştır. Sonuçta *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Erwinia* bakterileri adlandırılmıştır (FARMER, 1991).

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* lamda koagülaz, novobiosin ve mannitol fermantasyonu testleriyle adlandırılmışlardır (KLOOS, 1991). *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactic*, metilen blue, %6,5 NaCl'de üreme, gelatin, nişasta, esculin, arginin dehidrolaz, sükröz, laktoz, mannitol, arabinoz, rafinoz fermantasyonu testleri ile adlandırılmıştır (DEIBEL, 1974; KONEMAN, 1988) *Pediococcus urinequi*'ye, nişasta, %6,5 NaCl'de üreme, maltoz, sükröz, arabinoz fermantasyonu testleri uygulanmıştır (FACKLAM, 1991). *Lactobacillus bulgaricus*, glukozdan asit ve gaz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, rafinoz, sükröz, ksiloz fermantasyonu, esculin testleri uygulanarak adlandırılmıştır (ROGOSA, 1974).

*Bacillus* adlandırılmalarında ise karbonhidratları kullanma (OF), glukozdan gaz, glikoz, ksiloz, mannitol, laktoz, sükröz, maltoz fermantasyonu, hareket (SIM), %6,5 NaCl'de üreme, nitrat redüksiyonu, indol, triple sugar iron (TSI), voges proskauer (VP), gelatin ve esculin testlerinden faydalanılmıştır (KONEMAN, 1988).

İodometrik test yönteminde; testler sonucunda adlandırılmış ve saf kültür olarak %0,2 çözünebilir nişasta içeren Nutrient agar'da üremiş koloniler üzerine iodometrik test çözeltisi damlatılmıştır. Çözeltinin damlatılmasından hemen sonra iyot, nişastaya bağlanarak kolonilerin çevresinde mavi renk oluşmuştur. (WASHINGTON, 1985).

Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle bakterilerin beta-laktamaz enzimleri araştırılırken Oxoid firmasının "Beta-lactamase Identification sticks BR 66 nolu" ürünleriyle çalışılmıştır. Bu amaçla PCA besiyerinde yeniden üretilen saf kültürlerle çubuklar halinde bulunan stiklerin sarı kısımları dokundurulmuştur. Stik uçları dokundurulan bakteriler beta-laktamaz pozitif ise renk değiştirirler. 5-15 dakika içinde sarıdan kırmızıya doğru renk değiştiren bakteriler beta-laktamaz pozitif olarak adlandırılmıştır (WASHINGTON, 1985).

## ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırmada çeşitli süt işletmelerinden alınarak çalışılan toplam 197 örneğin 190'ında bakteri üremiş, 7'sinde üreme görülmemiştir. 190 örnekten izole edilen toplam bakteri sayısı 597'dir.

**Çizelge 1. Araştırmada Çalışılan Bakteri Üreyen ve Üremeyen Toplam 197 Örneğin Materyallere Göre Dağılımı**

Çalışılan Materyal	Çalışılan Örnek Say.		Toplam
	Bak. Üreyen Örnek Say.	Bak. Üremeyen Örnek Say.	
Çiğ Süt	102	1	103
Pastörize Süt	48	4	52
Beyaz Peynir	40	2	42
Toplam	190	7	197

Çizelge 1'de araştırmanın temelini oluşturan 197 örneğin alınan materyallere göre dağılımı gösterilmektedir. Bakteri üreyen 190 örneğin 102'si (%53,68) çiğ süt, 48'i (%25,26) pastörize süt ve 40'da (%21,05) beyaz peynir olarak dağılmıştır.

Çizelge 2'de görüldüğü gibi test edilen 597 bakterinin 286'sı (%47,90) beta-laktamaz pozitif olarak ve 311'i (%52,10) beta-laktamaz negatif olarak saptanmıştır.

**Çizelge 2. İodometrik Test Yöntemiyle Beta-laktamaz Enzim Varlığı Araştırılan Toplam 597 Bakterinin Örneklere Göre Dağılımı**

Çalışılan Materyal	Bakteri üreyen örnek sayısı	İodometrik test yöntemiyle beta-laktamaz enzim varlığı belirlenen bakteri sayısı		Top.
		Beta-Laktamaz enzimi pozitif bakteriler	Beta-Laktamaz enzimi negatif bakteriler	
Çiğ süt	102	142	124	266
Pastörize Süt	48	74	101	175
Beyaz Peynir	40	70	86	156
Toplam	190	286	311	597

**Çizelge 3. Toplam 197 Çiğ Süt, Pastörize Süt ve Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmaların Toplam Canlı Bakteri Sayım Ortalamalarının Çalışılan Örnek Sayısına Göre Dağılımı**

Toplam Canlı Bakteri Sayımı Yapılan Materyal	Toplam Ör. Sa.	Toplam Canlı Bakteri Ortalaması
Çiğ Süt	103	25,1x10 <sup>7</sup> adet/ml.
Süt	+22°C'de bekletilen pastörize süt	69,8x10 <sup>4</sup> adet/ml.
	+4°C'de bekletilen pastörize süt	19,5x10 <sup>4</sup> adet/ml.
Beyaz Peynir	42	20,3x10 <sup>5</sup> adet/gr.

**Çizelge 4. İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzimi Pozitif Olarak Değerlendirilen 286 Bakterinin Dağılımı**

Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen beta-laktamaz pozitif bakteriler	İodometrik test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunan bakteriler	
	Bakteri sayısı	%
<i>E.coli</i>	128	44,75
<i>Klebsiella</i>	40	13,99
<i>Enterobacter</i>	36	12,59
<i>S.aureus</i>	46	16,08
<i>S.epidermidis</i>	2	0,70
<i>Bacillus</i>	30	10,49
<i>Pseudomonas</i>	1	0,35
<i>Serratia</i>	1	0,35
<i>Lactobacillus</i>	2	0,70
Toplam	286	

Çizelge 3'de görüldüğü gibi çiğ süt örneklerinin toplam canlı bakteri ortalaması 25,1x10<sup>7</sup> adet/ml.dir. Aynı örneklerin bakteri sayısı en düşük 1,7x10<sup>7</sup> adet/ml., en yüksek 80,1x10<sup>7</sup> adet/ml. olarak hesaplanmıştır.

Çalışılan 52 pastörize sütün +22°C'deki toplam canlı bakteri ortalaması 69,8x10<sup>4</sup> adet/ml. bulunmuştur. Bu örneklerin aynı ısı derecesindeki bakteri sayısı en düşük 2,3x10<sup>4</sup> adet/ml., en yüksek de 21x10<sup>5</sup> adet/ml., hesaplanmıştır. Gene 52 pastörize sütün +4°C'deki toplam canlı bakteri ortalaması 19,5x10<sup>4</sup> adet/ml. olarak tespit edilmiştir. Aynı örneklerin aynı ısı derecesindeki bakteri sa-

yısı en düşük  $2,6 \times 10^4$  adet/ml. ve en yüksek  $1 \times 10^6$  adet/ml.dir. 42 beyaz peynir örneğinde ise toplam canlı bakteri ortalaması  $20,3 \times 10^5$  adet/gr. olarak bulunmuştur. Bu örneklerin bakteri sayısı en düşük  $2,3 \times 10^5$  adet/gr., en yüksek  $10,3 \times 10^6$  adet/gr'dır.

Çizelge 5. İodometrik Test ve Kromojenik Sefolosporin Test (Nitrosefin) Yöntemleriyle Karşılaştırılarak Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Tespit Edilen 187 Bakterinin Dağılımı

Çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen beta-laktamaz pozitif bakteriler	Çalışılan Materyal	İodometrik test yöntemiyle beta-laktamaz enzim varlığı tespit edilen bakteri dağılımı		Kromojenik Sefolosporin test (Nitrosefin) yöntemiyle beta-laktamaz enzim varlığı tespit edilen bakterilerin dağılımı								
		Beta-laktamaz enzimi pozitif bakteri sayısı	Beta-laktamaz enzimi negatif bakteri sayısı	Beta-laktamaz enzimi pozitif bakteri sayısı	Beta-laktamaz enzimi negatif bakteri sayısı							
<i>E.coli</i>	Çiğ süt	50	-	50	-							
	Pastörize süt	27	-	27	-							
	Beyaz peynir	10	-	10	-							
<i>S.aureus</i>	Çiğ süt	6	-	6	-							
	Pastörize süt	4	-	4	-							
	Beyaz peynir	21	-	21	-							
<i>Enterobacter</i>	Çiğ süt	17	-	17	-							
	Pastörize süt	6	-	6	-							
	Beyaz peynir	1	-	1	-							
<i>Klebsiella</i>	Çiğ süt	22	-	22	-							
	Pastörize süt	4	-	4	-							
<i>B.firmus</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-							
	<i>B.circulans</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-						
		<i>B.pumilus</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-					
			<i>B.cereus</i>	Beyaz peynir	3	-	3	-				
				<i>B.lentus</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-			
					<i>B.brevis</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-		
						<i>B.polymyxa</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-	
							<i>B. megaterium</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-
								<i>Adlandırılmayan Bacillus'lar</i>	Çiğ süt	4	-	4
Pastörize süt	2	-	2	-								
Beyaz peynir	1	-	1	-								
<i>Lactobacillus</i>	Beyaz peynir	1	-	1	-							
<i>Serratia</i>	Çiğ süt	1	-	1	-							
<b>Toplam</b>		<b>187</b>	<b>-</b>	<b>187</b>	<b>-</b>							

Çizelge 5'de toplam 187 bakterinin beta-laktamaz enzim varlığı İodometrik Test ve Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemleriyle ayrı ayrı test edilerek karşılaştırılmıştır. Test edilen 187 bakterinin her iki yöntem sonucunda beta-laktamaz varlığı pozitif bulunmuştur. Bu bakterilerin 87'si *E.coli*, 31'i *S.aureus*, 24'ü *Enterobacter*, 26'sı *Klebsiella*, 17'si *Bacillus*, 1'i *Lactobacillus* ve 1'i de *Serratia*'dir.

**Çizelge 6. Çiğ Süt Örneklerinde İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Araştırılan 266 Bakterinin Dağılımı**

Çiğ süttten izole edilen bakteriler	İodometrik test yöntemiyle beta-laktamaz varlığı pozitif olan bakterilerin sayısı		İodometrik test yöntemiyle beta-laktamaz varlığı negatif olan bakterilerin sayısı	
	Bak.say.	%	Bak.say.	%
<i>E.coli</i>	72	50,70	29	23,38
<i>Klebsiella</i>	32	22,54	20	16,13
<i>Enterobacter</i>	23	16,20	16	12,90
<i>S.aureus</i>	8	5,63	2	1,61
<i>S.epidermidis</i>	1	0,70	–	–
<i>S.saprophyticus</i>	–	–	4	3,23
<i>Bacillus</i>	4	2,82	2	1,61
<i>Streptococcus</i>	–	–	48	38,71
<i>Pseudomonas</i>	1	0,70	1	0,81
<i>Serratia</i>	1	0,70	1	0,81
<i>Erwinia</i>	–	–	1	0,81
<i>Toplam</i>	142		124	

**Çizelge 7. Çiğ Süt Örneklerinde Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefim) Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Belirlenen 100 Bakterinin Dağılımı**

Çiğ süttten izole edilen bakteriler	Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefim) yöntemiyle test edilerek beta-laktamaz varlığı pozitif olan bakteriler
<i>E.coli</i>	50
<i>Klebsiella</i>	22
<i>Enterobacter</i>	17
<i>S.aureus</i>	6
<i>Bacillus</i>	4
<i>Serratia</i>	1
<i>Toplam</i>	100

Çizelge 7 Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefim) yöntemiyle test edilmiş beta-laktamaz pozitif bulunmuş 100 bakterinin dağılımını göstermektedir.

Daha önce İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunmuş çiğ sütlerde üreyen 142 bakteriden 100'ü yeniden Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrocefim) yöntemiyle test edilmiştir. 100 beta-laktamaz pozitif bakterinin; 50'si (%50) *E.coli*, 22'si (%22) *Klebsiella*, 17'si (%17) *Enterobacter*, 6'sı (%6) *S.aureus*, 4'ü (%4) *Bacillus*, 1'i (%1) *Serratia*'dır.

**Çizelge 8. İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Araştırılan Pastörize Sütte Üreyen 175 Bakterinin Dağılımı**

Pastörize sütte üreyen İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz varlığı test edilen bakteriler	+22C'de 24 saat bekletilen pastörize sütlerde üreyen bak.				+4C'de 48 bekletilen pastörize sütlerde üreyen bakteriler			
	Beta-laktamaz enzimi pozitif bakteri sayısı	%	Beta-laktamaz enzimi negatif bakteri sayısı	%	Beta-laktamaz enzimi pozitif bakteri sayısı	%	Beta-laktamaz enzimi negatif bakteri sayısı	%
<i>E.coli</i>	26	56,2	20	40	13	46,43	18	35,29
<i>Klebsiella</i>	5	10,87	2	4	3	10,71	1	1,96
<i>Enterobacter</i>	9	19,57	7	14	3	10,71	3	5,88
<i>S.aureus</i>	2	4,35	1	2	5	17,86	5	9,80
<i>S.epidermidis</i>	–	–	–	–	–	–	1	1,96
<i>S.saprophyticus</i>	–	–	1	2	–	–	–	–
<i>Streptococcus</i>	–	–	3	6	–	–	10	19,61
<i>Lactobacillus</i>	–	–	–	–	–	–	1	1,96
<i>Pseudomonas</i>	–	–	1	2	–	–	1	1,96
<i>Proteus</i>	–	–	2	4	–	–	–	–
<i>Bacillus</i>	4	–	13	26	4	14,29	11	21,57
<i>Toplam</i>	46		50		28		51	

**Çizelge 9. Pastörize Süt Örneklerinde Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) Yöntemiyle Beta-laktamaz Enzim Varlığı Araştırılan 43 Bakterinin Dağılımı.**

Pastörize sütte üreyen Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle beta-laktamaz varlığı test edilen poz.bakte.	+22°C'de 24 saat bekletilen pastörize sütlerde üreyen beta-laktamaz pozitif bakteri sayısı	+4°C'de 48 saat bekletilen pastörize sütlerde üreyen beta-laktamaz pozitif bakteri sayısı
<i>E.coli</i>	17	10
<i>Klebsiella</i>	1	3
<i>Enterobacter</i>	5	1
<i>Bacillus</i>	-	2
<i>S.aureus</i>	-	4
Toplam	23	20

**Çizelge 10. Beyaz Peynir Örneklerinden İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Enzim Varlığı Araştırılan 156 Bakterinin Dağılımı**

Beyaz peynirden izole edilen bakteriler	İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif olan bakteriler		İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz negatif olan bakteriler	
	Bakt. Say.	%	Bakt. Say.	%
<i>E.coli</i>	17	24,28	14	16,28
<i>Enterobacter</i>	1	1,43	2	2,33
<i>Klebsiella</i>	-	-	1	1,16
<i>S.aureus</i>	31	44,28	5	5,81
<i>S.epidermidis</i>	1	1,43	4	4,65
<i>S.saprophyticus</i>	-	-	2	2,33
<i>S.lactis</i>	-	-	6	6,98
<i>S.cremoris</i>	-	-	4	4,65
<i>S.faecalis</i>	-	-	20	23,26
Adlandırılmayan <i>Streptococcus</i> 'lar	-	-	8	9,30
<i>L.bulgaricus</i>	1	1,43	-	-
Adlandırılmayan <i>Lactobacillus</i>	1	1,43	2	2,33
<i>B.macerans</i>	-	-	1	1,16
<i>B.megaterium</i>	2	2,86	-	-
<i>B.sphaericus</i>	-	-	5	5,81
<i>B.cereus</i>	3	4,28	-	-
<i>B.brevis</i>	1	1,43	-	-
<i>B.lentus</i>	1	1,43	-	-
<i>B.firmus</i>	2	2,86	1	1,16
<i>B.circulans</i>	1	1,43	1	1,16
<i>B.anthraxis</i>	-	-	1	1,16
<i>B.polymyxa</i>	1	1,43	-	-
<i>B.pumilus</i>	1	1,43	1	1,16
<i>B.thuringiensis</i>	1	1,43	-	-
Adlandırılmayan <i>Bacillus</i> 'lar	5	7,14	6	6,98
<i>P.ürinequi</i>	-	-	1	1,16
<i>Erwinia</i>	-	-	1	1,16
Toplam	70		86	

**Not: Yüzdeler beta-laktamaz pozitifler için 70 ve beta-laktamaz negatifler için 86 bakteri üzerinden hesaplanmıştır.**

Çizelge 8'de pastörize süt örneklerinden izole edilen 175 bakterinin beta-laktamaz İodometrik Test yöntemiyle çalışılmıştır. Sonuçta 74 bakterinin beta-laktamaz enzimi pozitif bulunmuştur. Geriye kalan 101 bakterinin beta-laktamazı negatiftir.

Çizelge 9'da pastörize sütte üremiş ve İodometrik yöntemle test edilmiş 74 beta-laktamaz pozitif bakterinin 43'ü Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle yeniden test edilmiştir. +22°C'deki 23 beta-laktamaz pozitif bakterinin; 17'si (%73,91) *E.coli*, 1'i (%4,35) *Klebsiella*, 5'i (%21,74) *Enterobacter*'dir. +4°C'deki 20 beta-laktamaz pozitif bakterinin ise 10'u (%50) *E.coli*, 3'ü (%15) *Klebsiella*, 1'i (%5) *Enterobacter*, 2'si (%10) *Bacillus* ve 4'ü (%20) *S.aureus* olarak bulunmuştur.

Çizelge 10'da beyaz peynir örneklerinden izole edilen toplam 156 bakterinin 70'i İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif, 86'sı da beta-laktamaz negatif olarak belirlenmiştir. Bu örneklerden izole edilen beta-laktamaz pozitif bakteriler içerisinde en sıklıkla 31 *S.aureus*, toplam 18 *Bacillus* bakterileri ve 17 *E.coli* bulunmuştur. Diğer beta-laktamaz pozitif bakteriler de daha az sıklıkla belirlenmiştir. Beyaz peynirden izole edilen bakteriler içerisinde beta-laktamaz negatif bakteriler değerlendirildiğinde en fazla 20 *S.faecalis*, ikinci derecede 17 *Bacillus* bakteriler ve 14 *E.coli* tespit edilmiştir.

Daha önce İodometrik Test yöntemiyle beta-laktamaz pozitif bulunmuş beyaz peynir örneklerinde üreyen 70 bakteriden 44'ü yeniden Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle test edilmiştir. Çizelge 11 Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle test edilmiş beta-laktamaz pozitif bulunmuş 44 bakteri dağılımını göstermektedir. 44 beta-laktamaz pozitif bakterinin; 10'u (%22,73) *E.coli*, 1'i (2,27) *Enterobacter*, 21'i (%47,73) *S.aureus*, 1'i (%2,27) *Lactobacillus* ve geriye kalan 11'i (%25,00) *Bacillus* türleridir.

**Çizelge 11. Beyaz Peynir Örneklerinde Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) Yöntemiyle Beta-laktamaz Enzim Varlığı Belirlenen 44 Bakterinin Dağılımı.**

Beyaz peynirde izole edilen bakteriler	Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemiyle test edilerek beta-laktamaz varlığı pozitif olan bakteri sayısı
<i>E.coli</i>	10
<i>Enterobacter</i>	1
<i>S.aureus</i>	21
<i>Lactobacillus</i>	1
<i>B.pumilus</i>	1
<i>B.cereus</i>	3
<i>B.lentus</i>	1
<i>B.brevis</i>	1
<i>B.polymyxa</i>	1
<i>B.megaterium</i>	1
<i>B.firmus</i>	1
<i>B.circulans</i>	1
Adlandırılmayan <i>Bacillus</i> 'lar	1
<b>Toplam</b>	<b>44</b>

## TARTIŞMA

Birçok araştırmacı beta-laktamaz enzim tayininde birden fazla yöntemi birlikte kullanarak sonuçları karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Araştırmamızda izole ettiğimiz bakterilerin enzimleri karşılaştırmalı olarak odometrik Test, Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemleri ile çalışılmıştır. İodometrik Test yöntemi beta-laktamaz enziminin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Testte substrat olarak penisilin-G antibiyotiği kullanılmıştır. Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) de son yıllarda çok kullanılan araştırmacıların hızlı, aktif ve güvenilir olarak tanımladıkları bir yöntemdir. Testte substrat olarak nitrosefin antibiyotiği kullanılmıştır.

Çalışmamızda İodometrik Test yöntemiyle çalışılan bakterilerden 187'si Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin)'lede yeniden test edilmiştir. Bu 187 bakterinin her iki metodla da enzimleri pozitif bulunmuştur. Araştırmamız sonuçlarına göre İodometrik Test ve Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) aynı oranda güvenilir bulunmuştur. Ayrıca beta-laktamaz pozitif bütün bakteriler kontrol amacıyla penisilin-G ile antibiyogram testine alınmışlardır. Tüm beta-laktamaz pozitif bakteriler penisilin'e dirençli tespit edilmiştir.

Pekçok araştırmacıda beta-laktamaz enzimi tayininde kontrol amacıyla penisilini diğer yöntemlere ilave olarak bizim gibi kullanmıştır.

MURRAY ve MEDERSKI-SAMARAJ (1983) yaptıkları çalışmada İodometrik Test ve Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) yöntemlerini bizim gibi karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır.

LEE ve ROSENBLATT (1983) yaptıkları araştırmada Nitrosefin (Sefinaz) yöntemini İodometrik Test yönteminden daha güvenilir bulmuşlardır.

PETRESKA (1989) İodometrik Test, Kromojenik Sefalosporin Test (Nitrosefin) ve penisilin hassasiyet testini birlikte kullanmış ve aynı oranda güvenilir bulmuştur.

Araştırmamızda çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örnekleri çalışılarak ayrı ayrı her örnek grubu için beta-laktamaz pozitif ve negatif bakteriler tespit edilmiştir. Çizelge 2 incelendiğinde örnek grupları içinde beta-laktamaz pozitif ve negatif bakteri sayısı birbirine yakın bulunmuştur. Çiğ süt örneklerinden 142 beta-laktamaz pozitif bakteri, 124 beta-laktamaz pozitif, 101'i beta-laktamaz negatiftir. Beyaz peynir örneklerinde 70 beta-laktamaz pozitif, 86 beta-laktamaz negatif bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçta süt ve süt ürünlerinde üreyen bakterilerin beta-laktamaz enzimi sentezleme oranı oldukça yüksek bulunmuştur. Araştırmamızda çiğ süt, pastörize süt ve beyaz peynir örneklerinden izole edilen 286 beta-laktamaz pozitif bakterilerin dağılımı Tablo 12'de görüldüğü gibi *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *S.aureus* ve *S.epidermidis*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Lactobacillus* olarak belirlenmiştir.

Çizelge 6'da beta-laktamaz pozitif 72 (%50,70) *E.coli*, 32 (%22,54) *Klebsiella* ve 23 (%16,20) *Enterobacter* en fazla sıklıkla çiğ sütlerden izole edilmiştir. +22°C'de bekletilerek çalışılan pastörize süt örneklerinden en sıklıkla 26 (%56,22) *E.coli*, 9 (%19,57) *Enterobacter* ve 5(%10,87) *Klebsiella* beta-laktamaz pozitif olarak belirlenmiştir. +4°C'de bekletilen pastörize süt örneklerinden izole edilen ve beta-laktamaz pozitif olarak tespit edilen bakteriler en çok 13(46,43) *E.coli*, 5(%17,86) *S.aureus* ve 4 (%14,29) *Bacillus*'dur.

Araştırmamız sonuçlarına göre sütün bakteri yoğunluğu arttıkça beta-laktamaz pozitif bakterilerin bulunma şansı o nispette artmaktadır. Beta-laktamaz pozitif bakteriler arasında besin zehirlenmesine neden olarak değerlendirilen *S.aureus*, *B.cereus* gibi bakterilerde tespit edilmiştir. Ayrıca en fazla izolasyonunu gerçekleştirdiğimiz beta-laktamaz pozitif *E.coli*'ler arasında enteropatojenik, enteroinvaziv *E.coli*'lerin bulunabileceği düşünülmelidir. O nedenle süt ve ürünleri aracılığıyla insan organizmasına geçebilen bu bakterilerin önemi ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda beta-laktamaz pozitif bakteriler insan organizmasında ürettiğinde beta-laktam halkası içeren antibiyotiklerin etkisini inaktive edebilmektedir. Bu yüzden sütte beta-laktamaz enzimi sentezleyen bakterilerin bulunması önemlidir.

## KAYNAKLAR

- ANONYMOUS, 1981. Türk Standartları Enstitüsü, Çiğ Süt TS 1018.
- CLARK, W.S., BRAZIS, A.R., FOWLER, J.L. 1978. Standard Plate Count Method, Standart Methods for the Examination of Dairy Products, Ed. Marth. E.H., 14 th Edition, (A.P.H.A.) Washington, 7-107.
- DEIBEL, D.H., SEELEY, H.W., 1974 "Streptococcus in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ed. Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E., 8 th ed. The Williams and Wilkins Company Baltimore, 490-509.
- FACKLAM, R.R., WASHINGTON II, J.A., 1991 *Streptococcus* and Related Catalase-Negative Gram-Positive Cocci in, Manual of Clinical Microbiology 5 th. edition". Ed. Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., Washington, 253.
- FARMER III, J.J., KELLY M.T., 1991. *Enterobacteriaceae* in Manual of Clinical Microbiology, 5 th edition. Ed. Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., Washington, 360-363.
- GILLIAND, S.E., BUSTO, F.F., BRINDA, J.J., 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Ed. Speck, M.L., 2 nd ed., Am.Publ. Health Assoc., Inc, Washington D.C.
- GÜRGÜN, V., HALKMAN, A.K., 1988 Mikrobiyolojide Sayım Yöntemi, Ankara. 146 sayfa.
- HARRIGAN, W.F., Mc CANCE, M.E., 1966. Laboratory Methods in Microbiology, Academic Press. London and New York, 362 sayfa.
- KLOOS, W.E., LAMBE, D.W., 1991 "Staphylococcus in Manual of Clinical Microbiology 5 th edition, Ed. Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J., Washington, 228-229.



- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., DOWELL, V.R., 1988. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 3 rd Edition, J. B. Lippincott. Company, Philadelphia, 840 sayfa.
- LEE, D.T., ROSENBLATT, J.E., 1983. A comparison of four methods for detecting beta-lactamase in anaerobic bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1(2), 173-175.
- MURRAY, B.E., MEDERSKI-SAMARAJ, B., 1983. Transferable  $\beta$ -Lactamase: a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis* *J. Clin. Invest.*, 72:1168-1171.
- PETRESKA-SIBINOVSKA D., 1989. A rapid penisillinase paper strip test for the detection of beta-lactamase *Srp. Arh. Celok. Lek.*, 117(1-2) 39-46.
- ROGOSA, M., 1974 *Lactobacillus* in, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ed. Buchanan, R.E., and Gibbons, N.E., 8 th ed". The Williams and Wilkins Company Baltimore, 576-593.
- WASHINGTON, J.A., 1985. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*, 2 nd edition United States of America, 885 sayfa.