

## Erzurum Piyasasından Temin Edilen Beyaz ve Civil Peynirlerden, *Listeria* Türlerinin İzolasyon ve İdentifikasyonu\*

A. Aydan KARA

Atatürk Üniv. Fen Ed. Fak. Biyoloji Böl. Erzurum-TÜRKİYE

Ömer Faruk ALGUR

Atatürk Üniv. Fen Ed. Fak. Biyoloji Böl. Erzurum-TÜRKİYE

Mükerrem KAYA

Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Erzurum-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 07.05.1998

**Özet:** Bu çalışmada, Erzurum piyasasından toplanan 34 beyaz peynir ve 16 civil peynir örneği *Listeria* türleri bakımından analiz edilmiştir. Ocak 1995-Nisan 1996 tarihleri arasında toplanan örneklerden; LSA besiyerinde "Henry'nin Modifiye Aydınlatma Tekniği" ile, Palcam Agar'da ise çıplak gözle incelemeler yapılmış ve tipik koloniler seçilerek biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bu testler sonucunda beyaz peynirlerden sadece bir numunede (%2.94) 3 farklı *Listeria* türü (2 *L. monocytogenes*, 1 *L. innocua*) izole edilmiştir. İncelenen 16 civil peynir örneğinin ise yine bir numunesinde (%6.25) tek bir *Listeria* türü izole edilmiştir.

Sonuçlar, ülkemiz ve dünyada daha önce yapılmış olan benzer araştırma sonuçlarıyla karşılaştırılmış ve literatür ışığında tartışılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** *Listeria*, Peynir, İzolasyon, İdentifikasyon.

### Investigation on the Isolation and Identification of the *Listeria* Species in the White and Civil Cheeses Purchased From Erzurum Region

**Abstract:** In this study, 34 white cheeses and 16 civil (local name) cheeses purchased from markets and shops in Erzurum during the period of January 1995-April 1996 were analysed. The samples were streaked directly onto LSA and Palcam Agar media in Petri Plates and incubated at 37°C for 48 hours. After the incubation, the growing colonies on LSA-agar plates were examined by Henry's Modified Illumination Method while colonies on Palcam agar were examined by naked eye. Typical colonies were selected and used for several biochemical tests. As a result, it was found that only one sample (2.94%) of the white cheeses examined was found to contain three *Listeria* spp. (2 *L. monocytogenes* and 1 *L. innocua*). On the other hand, only one sample (6.25%) of a total of 16 civil cheeses examined was found to contain one *Listeria* sp (*L. monocytogenes*). The results were discussed in light of the literature.

**Key Words:** *Listeria*, Cheese, Isolation,

\* Bu araştırma, Yüksek Lisans Tezinin bir parçasıdır.

## Giriş

Çeşitli peynir türleri içerisinde, dünyada ve Türkiye’de en fazla tüketilen peynirlerin başında beyaz peynir gelmektedir. Bu peynir türü, yurdumuzun daha çok Marmara ve Ege Bölgeleri’nde üretilmesine rağmen tüm bölgelerimize yayıldığı görülmektedir. 1985 yılında 125.000 ton üretilen beyaz peynir, gittikçe artarak 1987 yılında 140.000 ton, 1989 yılında ise 155.000 tona ulaşmıştır (1). Diğer taraftan, daha çok Erzurum ve Kars illerinde yağı alınmış sütün değerlendirilmesi amacıyla yapılan, ancak üke çapındaki tüketimi gittikçe artış gösteren bir diğer peynir türü de civil peynirdir. Bu peynir türü, yağsız olması nedeniyle bir diyet peyniri gibi kullanılmaktadır.

Diğer süt ürünleri ile birlikte peynirlerin böylesine çok tüketilmesi, onlardan birçok hastalık etkenlerinin bulaşması riskini de doğal olarak artırmaktadır. Son yıllarda bütün dünyada süt ürünlerinin ve özellikle yumuşak peynirlerin tüketiminin artışına paralel olarak *Listeriosis* vakalarının da artış göstermesi, bu gıda endüstrisi için büyük bir endişe kaynağı olmuş ve süt ürünleri üzerinde araştırma yapanların dikkati bu hastalık etkenlerinin izolasyonu ve teşhisi üzerinde yoğunlaşmıştır (2). Özellikle Amerika Birleşik Devletleri’nde 49 hastada *L. monocytogenes* türünün sebep olduğu menenjit ve septisemiden pastörize sütün kontaminasyonunun sorumlu tutulması ve bu hastalardan %29’unun ölmesi ve daha sonra Güney Kaliforniya’da görülen enfeksiyonun Meksika tipi peynir tüketimine bağlanması, peynir *Listeriosis* ilişkisini daha da belirginleştirmiştir. Ayrıca *L. monocytogenes*’in süt ürünleri dışında; sığır eti, domuz eti, kür edilmiş domuz budu, tütülenmiş fermente sosis, kümes hayvanları, çiğ yumurta, çeşitli sebzeler ve balık ürünleri gibi çeşitli gıda maddeleriyle de taşınabildiği (3), ancak insanlarda gıda maddelerinden kaynaklanan *Listeriosis* olaylarında, öncelikli olarak süt ve süt ürünlerinin sorumlu olduğu kaydedilmiştir (4). Hastalık etkeninin süt ürünleri dışında bazı gıdalarla da bulaştığı dikkate alınırsa, yukarıda özetlenmeye çalışılan sınırlı sayıdaki araştırma, ülkemizde görülen *Listeriosis* vakaları ile etkenin bulaşma yolları arasında bağlantı kurmak için yeterli omadığı gibi, hatta bu araştırma sonuçları ile süt ve süt ürünlerinde etkenin bulunma sıklığı hakkında yorum yapmak, farklı bölgelerde üretilen farklı ürünleri karşılaştırmak da mümkün değildir. Bu durum, ülkemizde üretimi yapılan süt ürünlerinde *Listeria* aranması çalışmalarının çoğaltılmasını zorunlu kılmaktadır. İşte bu çalışmanın amacı, bölgemizde en çok tüketilen peynirlerden olan beyaz ve civil peynirlerde *Listeria* sıklığını belirlemek suretiyle bu konudaki araştırmalara katkıda bulunmak ve sonuçları diğer araştırma sonuçlarıyla karşılaştırarak literatür ışığında tartışmaktır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

#### Örneklerin Toplanması

Bu araştırmada, Erzurum’da farklı semtlerden rastgele seçilen süpermarket ve dükkanlardan

temin edilen 34 beyaz peynir ve 16 civil peynir örneği 1.1.1995, 19.4.1996 tarihleri arasında toplanmıştır. Peynirlerde *Listeria* kontaminasyonunun mevsimlere göre değişimi gözönüne alınarak örnek alım tarihi yaz kış dönemini içine alacak şekilde uzun tutulmuştur. Peynirler 100 g'lık miktarlar halinde laboratuvara getirilmiş ve aynı gün işleme tabi tutulmuştur. Çalışma süresince mikroorganizmaların üretilmesinde, LEB (Merck), Palcam-Agar (Merck) ve LSA (Merck) besiyerleri kullanılmıştır.

#### Test Mikroorganizmalar

Bu çalışmada CAMP Testi için kullanılan *Rhodococcus equi* Rc 1 ve *Staphylococcus aureus* St44 suşları Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

#### Metod

##### Homojenizasyon ve Zenginleştirme

Peynir örneklerinden 25 g alınarak, üzerine 225 ml LEB ilave edilmiş ve blenderde oda sıcaklığında (21-23°C) 2 dakika süreyle homojenize edilmiştir. İnkübasyonun 2., 7., 14., ve 21. günlerinde homojenizattan Palcam-Agar ve LSA besiyerlerine çizim usulü ekimler yapılmış ve petri kutuları 37°C 'de 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır (5-6).

##### İzolasyon İşlemleri

İnkübasyon sonunda LSA besiyerinde üreyen kolonilere Schmidt (6) tarafından modifiye edilen "Henry'nin Modifiye Aydınlatma Tekniği" uygulanmıştır. Bu teknikte çevresi mavi halkalı koloniler, şüpheli *Listeria* kolonileri olarak seçilmiştir. Palcam-Agar üzerinde oluşan koloniler ise çıplak gözle incelenmiş, merkezi kısımları çökük ve gri-yeşi renkli koloniler, şüpheli *Listeria* kolonileri olarak değerlendirilmiştir.

Her bir besiyerinde üreyen şüpheli *Listeria* kolonilerinden Nutrient Agar besiyerine çizim usulü ekim yapılmış ve petri kutuları 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Nutrient-Agar besiyerindeki koloniler yine Henry'nin Modifiye Aydınlatma Tekniği kullanılarak değerlendirilmiş ve tipik mavi renkli koloniler seçilerek Gram boyama işlemine tabi tutulmuştur. Gram boyama işlemi sonunda, Gram (+) çubuk şekilli bakterilere katalaz testi ve 22-25°C'de hareket testleri uygulanmıştır. Bu son iki test sonucu (+) çıkan koloniler, Nutrient Agar'lı yatık agar stoklarına alınmış ve identifikasyon testleri için buzdolabında saklanmıştır.

##### *Listeria* Türlerinin İdentifikasyonu İçin Uygulanan Testler

*Listeria* cinsine ait türlerin identifikasyonu için; Gram boyama, hareket, katalaz, oksidaz, üreaz, eskulin, Voges-proskauer, Metil-red, şeker, hemoliz ve CAMP testleri uygulanmıştır (7-8).

##### API Kitlerin Uygulanması

Biyokimyasal testler sonucu *L. monocytogenes* ve *L. innocua* olarak tanımlanan suşlara API *Listeria* hazır identifikasyon test kiti uygulanmış, teşhisleri yapılan türler teyid edilmiştir.

## Bulgular

Bu çalışmada incelenen 34 beyaz ve 16 civil peynir örneğinden LSA besiyerine yapılan ekim sonunda üreyen ve Palcam-Agar'da tipik *Listeria* kolonisi oluşturan 4 izolat; B<sub>2</sub>, B<sub>11</sub>, B<sub>17</sub> ve C<sub>2</sub> şeklinde kodlandırılmış ve bu suşlara; gram boyama, katalaz, hareket testleri uygulanmıştır. İncelenen 4 suşun her üç test için pozitif olduğu belirlenmiş ve böylece suşlar *Listeria* şüpheli suşlar olarak kabul edilmiştir. Bu suşların Palcam-Agar'da oluşturdıkları koloniler gri-yeşil renkte merkezi kısmı çökük bir görüntü vermektedir.

34 beyaz peynir örneğinde yapılan çalışma sonucunda bir işletmeden alınan yalnızca bir örneğin (%2.94) 3 ayrı *Listeria* türü (B<sub>2</sub>, B<sub>11</sub>, B<sub>17</sub>) içerdiği tesbit edilmiştir. Bu üç *Listeria* izolatının identifikasyon işlemleri sonucunda ikisinin (B<sub>2</sub>, B<sub>17</sub>) *L. monocytogenes* (%2.94), birinin (B<sub>11</sub>) ise *L. innocua* (%2.94) olduğu saptanmıştır.

16 civil peynir örneğinde yapılan çalışmada ise bir işletmeden alınan yalnızca bir peynir örneğinde (%6.25) tek bir *Listeria* türü (C<sub>2</sub>) izole edilmiş ve bu izolatın *L. monocytogenes* (%6.25) olduğu belirlenmiştir. Tablo 1'de teşhisi yapılan türlerin çeşitli biyokimyasal özellikleri verilmiştir.

Diğer taraftan B<sub>11</sub> ve B<sub>2</sub> suşlarının identifikasyon test sonuçları bu iki suşa uygulanan iki ayrı API-*Listeria* kitiyle doğrulanmıştır.

| Testler            | Suş Numaraları |                 |                 |                |
|--------------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
|                    | B <sub>2</sub> | B <sub>11</sub> | B <sub>17</sub> | C <sub>2</sub> |
| Gram Boyama        | +              | +               | +               | +              |
| Katalaz Testi      | +              | +               | +               | +              |
| 22-25°C'de         | +              | +               | +               | +              |
| Hareket            | +              | +               | +               | +              |
| Oksidaz            | -              | -               | -               | -              |
| Üreaz              | -              | -               | -               | -              |
| Eskulin            | +              | +               | +               | +              |
| Voges-Proskauer    | +              | +               | +               | +              |
| Metil-Red          | +              | +               | +               | +              |
| D-Salisin          | +              | +               | +               | +              |
| D-Glukoz           | +              | +               | +               | +              |
| L-Ramnoz           | +              | +               | +               | +              |
| D-Ksiloz           | -              | -               | -               | -              |
| D-Mannitol         | -              | -               | -               | -              |
| α-Metil-D-mannosid | +              | +               | +               | +              |
| β-hemoliz          | +              | -               | +               | +              |
| CAMP               | +              | -               | +               | +              |
| Testi              | -              | -               | -               | -              |

Tablo 1. Teşhisi Yapılan Türlerin Çeşitli Biyokimyasal Özellikleri

## Tartışma

Bu araştırmada 34 beyaz peynir ve 16 civil peynir olmak üzere toplam 50 peynir örneği *Listeria* bakımından analiz edilmiştir. 34 beyaz peynir örneğinde yapılan çalışma sonucunda sadece bir peynir örneğinden üç ayrı *Listeria* türü izole edilmiş ve bunlardan ikisinin (%2.94) *L. monocytogenes* ve birinin (%2.94) *L. innocua* olduğu sonucuna varılmıştır. 33 beyaz peynir örneğinde ise hiçbir *Listeria* türüne rastlanmamıştır. Araştırmada incelen 16 civil peynir örneğinden ise sadece bir örnekte (%6.25) tek bir *L. monocytogenes* türü tanımlanmıştır.

Bu araştırmada selektif besiyeri olarak LSA ve Palcam besiyerleri kullanılmıştır. LSA agarda 24-48 saatlik inkübasyondan sonra oluşan koloniler Henry Tekniği ile incelenmiş ve etrafı mavi halkalı koloniler seçilmiştir. Daha sonra bu kolonilerden alınan pasajlardan Palcam Agarda ekim yapılmış ve 37C°'de 24-48 saatlik süre sonunda çıplak gözle incelenen kolonilerin, literatürde belirtilen özellikleri taşıdıkları sonucuna varılmıştır. Çeşitli araştırmacılar, *Listeria* seçiminde LSA besiyerlerinde Henry tekniğinin kullanımının avantajlı olduğunu belirtmişlerdir (9). Diğer taraftan çıplak gözle inceleme yapılan Palcam Agar'daki tipik koloni arama işlemi de pratikliği bakımından tavsiye edilmektedir (9-11). Araştırmamızda her iki teknik birlikte kullanılmış ve bu aşamalardan sonra *Listeria* şüpheli sayılan koloniler hücresel morfoloji bakımından incelenmiştir. Gram boyama işleminden sonra yapılan morfolojik incelemeler, *Listeria* şüpheli izolatların Gram(+), tek tek veya kısa zincirler halinde, uçları yuvarlak, çubuksu bakteriler olduklarını göstermiştir. Bu özellikler, *Listeria* türleri için verilen klasik tanımlamalarla uygunluk göstermektedir (12-14).

Yukarıda da ifade edildiği gibi bu araştırma sonucunda, *Listeria* bulunma sıklığı beyaz peynir örneklerinde %2.94, civil peynir örneklerinde ise %6.25 olarak belirlenmiştir. Peynirler üzerinde yapılan daha önceki araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu oranların fazla yüksek olmadıklarını, hatta çoğu ülkede belirlenen oranlardan daha düşük olduklarını görmekteyiz. Nitekim Breer (15) Almanya'da çeşitli peynirler [70 yumuşak peynir, 799 farklı peynir (88 adet sert peynir, 205 yarı yumuşak peynir örneği)] üzerinde yaptığı araştırmada %4-22.9 oranlarında, Pini ve Gilbert (16) İngiltere'de 222 yumuşak peynir üzerinde yaptıkları bir araştırmada % 19 oranında, Terplan ve ark. (17). 706 peynir üzerinde yaptıkları bir araştırmada %8.2 oranında *Listeria* izolasyonu yapmışlardır. Ülkemizde ise farklı bölgelerden alınan 323 peynir üzerinde yapılan çalışmada (18) %5.8 oranında, 105 peynir üzerinde yapılan çalışmada (19) %12.4 oranında ve 22 pastörize süt üzerinde yapılan çalışmada (20) %18.2 oranında *Listeria* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bulgular, araştırmamızda incelediğimiz örneklerin gerek ülkemizin diğer bölgelerinde çalışılan peynirlerden ve gerekse dünyadaki çeşitli araştırmalarda incelenen peynirlerden daha az *Listeria* türü içerdiğini göstermekte ise de, böyle bir genelleme yapmak oldukça güçtür. Çünkü ülkemizde hem peynirlerde *Listeria* aranması üzerinde yapılan araştırma sayısı hem de bu araştırmalarda incelenen örnek sayısı, böyle bir genelleme yapabilmemize yetecek sayıda değildir. Bu çeşit çalışmalar, daha ziyade kontaminasyonun kaynağını ve mikroorganizmanın bulunma sıklığını belirlemek amacıyla

yapıldığından, gıda hijyeni bakımından büyük bir önem arz etmektedir. Bu nedenle, ülkemizde benzer çalışmaların hızla artırılması gerekmektedir.

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar ile, daha önce yapılmış araştırma sonuçları arasındaki en büyük benzerlik tür çeşidi bakımından olmuştur. Araştırmamızda teşhisi yapılan 4 türden üçü *L. monocytogenes*, biri ise *L. innocua*'dır. Gerek ülkemizde, gerekse dünyanın çeşitli ülkelerinde yapılan diğer araştırmalarda da bu iki tür, süt ve süt ürünlerinde en sık rastlanan türlerdir (15-16, 18-19, 21-22).

Araştırmamızda incelenen 16 civil peynir örneğinden sadece bir örnekte tek bir *L. monocytogenes* türü (%6.25) tanımlanmıştır. Ne yazık ki, civil peynir ülkemize has bir peynir türü olmasına rağmen, bu bulguyu karşılaştırabileceğimiz tek bir araştırma bile yoktur. Bu nedenle, civil peynirlerde *Listeria* sıklığı ve kontaminasyon noktalarını belirleyecek yeni araştırmalara şiddetle ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

1. Göncü, S., Beyaz peynirde görülen hata ve bozuklukların nedenleri ve önleme yolları. Trakya Üniv. Ziraat Fak., Yayın No: 125, 13-20, Tekirdağ, 1994.
2. Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D. and Farver, T.B., Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* in Market Cheeses Stored at 4 to 30°C, 54 (9), 662-668, 1991.
3. Rocourt, J., *Listeria monocytogenes*: The state of the science. Dairy Food and Environ. Sanitation, 14 (2), 70-82, 1994.
4. Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Pliakytis B. D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. Reingold, A.L., Pasteurized milk as a Vehicle of Infection in an outbreak of Listeriosis The New England J. Medic., 321 (7), 404-407, 1985.
5. Schmidt, U., Seeliger, H.P.R., Gleen, E., Langer, B. und Leistner, L., Listeriefunde in rohen fleischerzeugnissen. Fleischwirtsch, 68 (10), 1313-1316, 1988.
6. Schmidt, U., Verfahren zum Nachweis von Listerien in Fleischwirtsch, und Fleischerzeugnissen. Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung. Kulmbach, 28, 311-316, 1989.
7. Mclauchlin, J., *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of Listeriosis in humans. A. Review. J. Appl. Bacteriol., 63, 1-11, 1987.
8. Schmidt Wof, G., Seeliger, H.P.R. und Schrettabrunner, A., Menschliche Listeriose. Erkrankuugen in der Bundesrepublik Deutschland, 1969-1985. Zb., Bak. Hyg. A., 472-486, 1987.
9. Curtis, G.D.W., Mitchel, R.G., King, A.F. and Griffin, E.J., A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. App. Microbiol. 8, 95-98, 1989.
10. Van Netten, P., Perales, 1., Van de Moosdijk, A., Curtis, G.D.W. Jnd Mosse, D.A.A., Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food. Microbiol., 8, 299-316, 1989.
11. Taştan, R., Tavuklardan *Listeria* spp. İzolasyonu ve İdentifikasyon Üzerine Çalışmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniv., Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1995.

12. Seeliger, H.P.R., Jones, D., Genus *Listeria*. In: PHA Senath, N.S., main, M.E., Sharpe, J.G., Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, 1235-1245, 1986.
13. Farber, J.M. and Losos, J.Z., *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. CMAJ., 138, 413-418, 1988.
14. Jones, D., Foodborne Listeriosis. Lancet, 336, 1171-1174, 1990.
15. Breer, C., *Listeria* in cheese, Listeriosis, Joint WHO/ROI Consultation on prevention and control, Vet Med Hefte, 106, 1987.
16. Pini, P.N. and Gilbert, R.J., The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses, Int J. Food. Microbiol., 6, 317-326, 1988.
17. Terplan, G., Schoen, R., Springmeyer, W., Degle, I., Becker, H., Vorkommen, Verhalten und Bedeutung Von *Listerien* in milch und milch und milch produkten. Arch. Lebensmittelhyg, 37, 131-137, 1986.
18. Tümbay, E., Seeliger, H.P.R. Inci, R., Coşar, G. and Langer B., Isolation of *Listeria* from cheese in Turkey. Infek. Derg., 2 (4), 593-598, 1988.
19. Çiftçioğlu, G. and Uğur, M., Ülkemizde tüketilen salamura beyaz peynirlerde *Listeria*'ların varlığı üzerine bir araştırma. Bursa III. Uluslararası Gıda Sempozyumu, 1-3 Ekim, Bursa, 168-178, 1991.
20. Sharif, A., Tunail, N., Çeşitli yörelere ait çiğ sütler ile Ankara piyasasında satılan pastörize sütlerde *Listeria monocytogenes* kontaminasyonunu araştırması. Mikrobiyoloji Bülteni, 25, 15-20, 1991.
21. Breer, C., Das vorkommen von *Listerien* inkase, 2. Weltkongre B. Lebensmittelingektronen und-intoxikationen Berlin (West), 26-30 Mar. Proccedings, Vol. 1, 230-233, 1986.
22. Hayes, P.S., Feeley, J.C, Graves, .M. Ajello, G.W. and Feming, D.W., Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl. Environ. Microbiol., 51 (2), 438-440, 1986.