

UHT VE PASTÖRİZE SÜTLERDE LIMULUS TESTLE GRAM
NEGATİF BAKTERİYEL ENDOTOKSİN TAYİNİ

Bülent Mutluer¹

Seniha Akın¹
Şerif Kaymaz²

Bengü Kaya¹

Determination of gram-negative bacterial endotoxin with the Limulus test in UHT and pasteurized milk

Summary: *It is proposed that the determination of gram-negative bacterial endotoxin content and microbiological quality of commercial UHT and pasteurized milk by the use of the Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test and bacteriological methods. All samples (30 UHT and 30 pasteurized milk) were obtained from retail stores in Ankara.*

The total aerobic count (PCA), psychrotrophic count (PCA, 7°C / 10 day), coliform count (VRBA), pseudomonad count (GSP agar) were determined by using of the overlay method. The gram-negative bacterial endotoxin content of both kind of samples varied from 5×10^2 ng/ml to 5×10^5 ng/ml with a mean of 2×10^5 ng/ml. The total aerobic count of pasteurized milk samples ranged from 4×10^2 / ml to 7.5×10^6 / ml with a mean of 5×10^5 / ml. The psychrotrophic count of these samples ranged from 1×10^2 / ml to 3×10^5 / ml. Fourteen samples (% 46.7) had coliform count that fell within the range of 2×10^2 / ml to 4×10^5 / ml.

The results obtained from this study indicated that the microbiological quality of pasteurized milk samples are low. The UHT and pasteurized milk samples contained gram-negative bacterial endotoxins significantly high amounts; depending on the microbiological quality of the raw milk used for UHT and pasteurized milk production.

Özet: *Bu çalışmada Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) test ve bakteriyolojik metodlar ile UHT ve pastörize sütün gram negatif bakteriyel endotoksin miktarı ve mikrobiyolojik kalitesinin tayini amaçlan-*

¹ TAEK, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, Ankara.

² A.Ü. Vet. Fak. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Ankara.

miştir. Tüm örnekler (30 UHT süt ve 30 pastörize süt) Ankara'daki satış mağazalarından sağlandı.

Total aerobik canlı (PCA), psikrotrofik (PCA, 7°C/10 gün) ve koliform grubu (VRBA) mikroorganizmalar ve pseudomonas (GSP agar) lar yüzeysel sayım metodu kullanılarak tayin edildi. Her iki çeşit süt örneklerinde gram negatif bakteriyel endotoksin miktarı 5×10^2 ng/ml ile 5×10^5 ng/ml arasında değişmekte olup ortalama 2×10^5 ng/ml bulundu. Pastörize süt örneklerindeki total aerobik canlı sayısı 4×10^2 — 7.5×10^6 /ml arasında ve ortalama 5×10^5 /ml; psikrotrofik mikroorganizma sayısı 1×10^2 — 3×10^5 /ml arasında bulundu. 14 örnekte (% 46.7) 2×10^2 — 4×10^5 /ml arasında değişen sayıda koliform grubu mikroorganizma saptandı.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, incelenen pastörize süt örneklerinin mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğunu, UHT ve pastörize süt örneklerinin, üretimde kullanılan çiğ sütlerin mikrobiyolojik kalitesine bağlı olarak önemli miktarda bakteriyel endotoksin içerdiklerini göstermiştir.

Giriş

Süt ve süt ürünlerinde gram negatif bakterilerin kantitatif tayini, üretim ve muhafaza sırasında karşılaşılan hijyenik sorunlar bakımından büyük ekonomik önem ve pratik bir değer taşımaktadır. Gram negatif bakteriler süt ve süt ürünlerinde öncelikle lipolitik ve proteolitik değişikliklerden sorumludurlar ve soğukta muhafaza koşulları altında dominant bir rol oynadıkları gibi pastörize veya UHT sütlerde önemli rekontaminantları oluşturmaktadırlar.

Gram negatif bakteriler, uygun pastörizasyon işlemleri ile tahrip olmalarına karşın, meydana getirdikleri (öncelikle pseudomonas türleri tarafından oluşturulan) thermorezistans proteinaz ve lipazlar pastörizasyon ve UHT işlemleri ile tamamıyla inaktive olmamak ve üründe mikrobiyel gelişme olmaksızın enzim aktivitesine bağlı koagülasyon, acılık (ransidite) gibi bozukluklar şekillenmektedir (1, 3, 17). Bu bakımdan UHT ve pastörize sütlerde bakteriyolojik kaliteyi güvence altına almak, uzun süre dayanıklılığı sağlayabilmek ve sütü bakteriyolojik kalitesine uygun bir işleme tabi tutmak amacı ile UHT ve pastörizasyon işleminden sonra da sütün başlangıçta taşıdığı gram negatif bakteri yükünü saptamak önem taşımaktadır. Süt ve süt ürünlerinde gram negatif bakterilerin saptanması amacı ile koli titresi (MPN),

koliform bakteri sayımı, pseudomonas ve psikrofilik mikroorganizma sayımı ile izole edilen kolonilerde aminopeptidaz aktivitesi tayini gibi yöntemler kullanılmaktadır (23). Ancak bu yöntemler canlı ve üreme yeteneğinde olan gram negatif bakterilerin saptanmasına olanak sağlamaktadırlar. Son yıllarda gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponentlerinin kantitatif tayinine dayanan ve bu yolla canlı olmayan gram negatif bakteri yükü hakkında da bilgi sahibi olunabilen Limulus testin özellikle hayvansal orijinli gıda maddelerinde kullanılabilirliği üzerinde araştırmalar yürütülmüştür (5, 6, 8, 9).

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı komponentlerinden olan lipopolisakkarit formundaki endotoksinler gıda hijyeni bakımından iki yönden önem taşımaktadırlar. Birincisi, bunlar bakterilere kıyasla thermorezistanstırlar ve ısı işlemi görmüş gıdalardaki miktarları çiğ materyaldeki gram negatif bakteri yükü ile ilgili önemli bir indeks oluşturmaktadır. İkincisi, gıdalarla alınmalarından sonra çeşitli maddelerle etkilerinin kuvvetlenmesinden ve sağlıklı insanlarda hastalıklara neden olmasından şüphe edilmektedir (26). Gram negatif bakteri endotoksinlerinin tayini amacı ile son yıllara kadar tavşanlarda pyrogen test, fare letalite testi, civciv embriyo testi gibi çeşitli in vivo yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler, kullanılan hayvan türlerinde reaksiyonların daima aynı olmaması ve bir tür içerisinde önemli farklılıkların bulunabilmesi gibi dezavantajlara sahiptirler (6). Gram negatif bakteri endotoksini ve Limulus polyphemus adlı yengeçlerin amöbozit lizat'ları arasındaki reaksiyona dayanan ve 1964 yılında Levin ve Bang (16) tarafından geliştirilen Limulus test, son yıllarda çok hassas ve pratik olması bakımından öncelikle farmasötik endüstride paranteral verilen ilaçlarda pyrogenlerin saptanmasında, insanlarda kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında gram negatif hastalık etkenlerinin teşhisinde, içme sularının hijyenik kontrollerinde ve atık su temizleme tesislerindeki kontrollerde kullanılmaktadır (10, 15, 21, 25). Limulus test Bang'ın 1956 yılında Kuzey Amerika'da yaşayan Limulus polyphemus adlı yengeçlerin vibriolarla enfeksiyonuna bağlı intravasküler koagülasyon sonucu ölümleri ile ilgili gözlemlerine dayanılarak geliştirilmiştir (10, 15, 23, 25). Daha sonra yapılan araştırmalar gram negatif bakteri lipopolisakkaritlerine (endotoksin) karşı söz konusu yengeçlerin bir savunma reaksiyonu olan bu koagülasyonda yengeçlerin kanında dolaşan ve amöbozit adı verilen kan hücrelerinin ve bu hücrelerden açığa çıkan koagüle olabilir proteinlerin önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Parçalanmış amöbozitlerden çok mik-

tarda koagule olabilir proteinler (coagulogen) elde edilmiş ve endotoksin tayinlerinde amöbozit lizat olarak kullanılmıştır. Endotoksin ve koagule olabilir protein arasındaki reaksiyon, endotoksinin bir proenzimi (proclotting enzim) aktive etmesine ve aktive olmuş enzimin proteini koagule etmesine dayanmaktadır (4, 16, 23, 25).

Testin uygulanmasında ticari olarak temin edilen liyofilize amöbozit lizat, bilinen hacimde pyrogensiz su ile sulandırılmakta, eşit hacimde lizat ve uygun şekilde sulandırılmış muayene materyali 37°C' de 1 saat inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonunda jel oluşan en yüksek sulandırma titre değeri olarak kaydedilmektedir. Standard endotoksinin kullanılan amöbozit lizata karşı verdiği titre değerine dayanılarak muayene edilen materyaldeki endotoksin konsantrasyonu saptanmaktadır. Gram negatif bakteri türleri arasında farklar mevcut olmakla birlikte genel olarak 0.05—1.0 ng/ml (0.5—1 EU/ml) endotoksin konsantrasyonunun muayene edilen materyalde 10^2 — 10^3 gram negatif bakteri/ml mevcudiyetini gösterdiği kabul edilmektedir (5, 9, 26). Südi ve Heeschen, (23) 1 ng endotoksin konsantrasyonunun çiğ sütlerde 5000—10.000 gram negatif bakteri/ml'ye eşdeğer olduğunu belirtmektedirler.

Limulus testin sütlerde gram negatif bakterilerin saptanmasında kullanılabilirliğinin Terplan ve ark. (26) tarafından belirlenmesinden sonra çeşitli araştırmacılar bu testin süt ve süt ürünlerinde kullanılabilirliğini doğrulamışlardır (11, 21, 22, 24, 27). Limulus testin yağsız balıklarda kalitenin saptanmasında aerob genel canlı sayısı ve diğer kimyasal bozulma kriterleri ile uyum sağladığı ve özellikle total volatil bazlar ile çok iyi korelasyon verdiği gözlenmiştir (25). Teufel ve ark. (28) balık konservelerinde ham maddenin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde Limulus testin kullanılabileceğini saptamışlardır. Sığır kıymalarının mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde basit, hızlı ve uygun bir test olarak bulunmuştur (12, 13, 14). Limulus testle, vakumla paketlenmiş pişmiş hindi etlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesinde, enterobacteriaceae sayısı ile endotoksin konsantrasyonu arasında doğrusal bir korelasyonun olduğu ve etlerde bozulmanın ölçülmesinde bu testin kullanılabileceği saptanmıştır (6, 8).

Bu araştırma, Ankara piyasasında satılan UHT ve pastörize sütlerin mikrobiyolojik kalitelerini ve bunların üretiminde kullanılan çiğ sütlerin gram negatif bakteri sayısını Limulus test ile saptamak amacıyla ele alınmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada Ankara piyasasından Haziran ve Eylül ayları arasında temin edilen UHT ve pastörize süt örnekleri kullanılmıştır. İki ayrı süt fabrikasına ait toplam 30 adet pastörize süt örneği ve üretim tarihleri itibariyle 30,60 ve 90 günlük 10'ar adet UHT süt örneği tüketicilere sunuldukları şekilde sağlanarak aynı gün denemeye alınmıştır. Örnekler UHT ve pastörizasyon işlemi öncesi çiğ sütlerin taşıdığı gram negatif bakteri yükü bakımından Limulus test; total aerobik canlı, koliform grubu mikroorganizmalar, psikrofilik mikroorganizmalar ve pseudomonaslar yönünden mikrobiyolojik metotlarla incelenmişlerdir.

Limulus Test

Örneklerin Limulus testle incelenmesinde Südi ve ark. (21, 22, 23) tarafından geliştirilen mikrotitrasyon plak yöntemi uygulanmıştır. Testte Sigma firması tarafından üretilen E-Toxate (Limulus Amoebocyt Lysate-Stok No. 210—2), standart endotoksin (Stok No. 210-SE), pyrogensiz su (Stok No. 210—7) ve Nunc firmasına ait mikrotitrasyon plakları kullanılmıştır.

Test plaklarının hazırlanışı

E-Toxate firma önerilerine uygun olarak pyrogensiz suda çözülmüş ve çözelti her plaktaki 30 ayrı bölüme Şekil 1'deki gibi 30'ar μ l miktarlarda dağıtılarak, plaklar alüminyum folye ile kaplı halde -20°C 'de dondurularak muhafaza edilmiştir.

Örneklerin hazırlanması

Hücre duvarına bağlı lipopolisakkaritlerin serbest kalması için pastörize süt örnekleri 80°C 'de 1 saat ısıtılmış, UHT sütlerde ısı işlemi uygulanmamıştır.

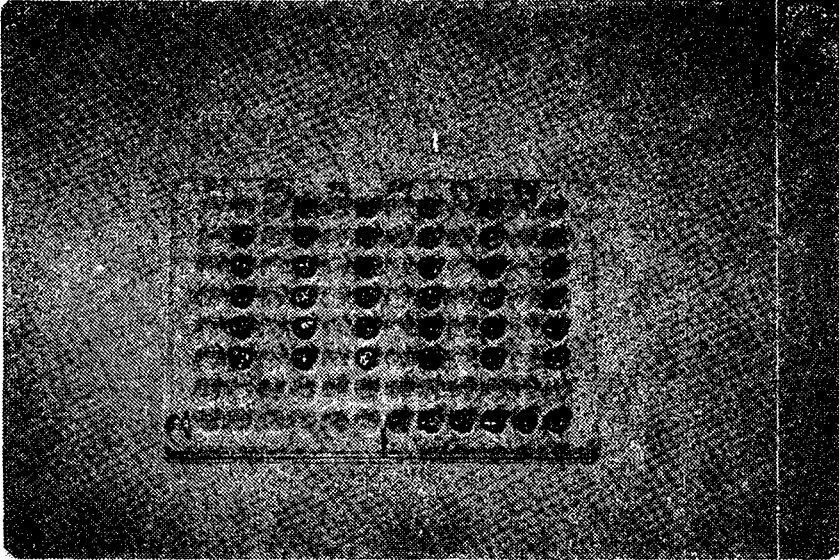
Testin yapılışı

Örneklerin test plaklarında Şekil 1'de belirtilen şekilde pyrogensiz su ile 10 katlı sulandırılmaları yapılmış ve örneğe ait 30 μ l miktarındaki her bir sulandırma eşit miktarda E-Toxate ile karıştırılmıştır. Test plakları parafilmle kaplanarak su banyosunda 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir teste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		örnek 1		örnek 2		örnek 3		örnek 4		örnek 5		
10^1 B		10 ö + 90 s → 30		→		→		→		→		
$10^{1.5}$ C		30 ö + 64.8 s → 30		↓		↓		↓		↓		
10^2 D		30 ö + 64.8 s → 30		↓								
$10^{2.5}$ E		30 ö + 64.8 s → 30		↓								
10^3 F		30 ö + 64.8 s → 30		↓								
$10^{3.5}$ G		30 ö + 64.8 s → 30		↓								
H												

Ö: örnek S: su

Şekil 1. Limulus testte örnek ve reaktiflerin mikrotitrasyon plaklarına uygulanışı.



Şekil 2. Limulus testte pozitif ve negatif reaksiyonlar

% 1 Tween 20 içeren % 0,2 lik sulu Toluidinbluc damlatılmış ve su trompuna bağlı bir pastör pipeti ile her bir bölümün duvarı boyunca test içeriği delinerek dışarı emilmiştir. Pastör pipetinin sokulduğu bölgede mavi renkte jel ile çevrili delik oluşumu pozitif reaksiyon, test içeriğinin tamamen boşalması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir.

Örneklerdeki endotoksin miktarının ve standard endotoksin hassasiyetinin hesaplanması

Örneklerdeki endotoksin miktarının hesaplanmasında pozitif reaksiyon veren en yüksek sulandırma dikkate alınmıştır. Kısmi pozitif reaksiyon oluşumunda pozitif reaksiyon veren bir önceki sulandırma değerlendirilmiştir. Testin referans endotoksin karşısındaki hassasiyeti de aynı şekilde tayin edilmiş ve endotoksin miktarı aşağıdaki formüle göre saptanmıştır.

Endotoksin miktarı = Örneğin titresi \times endotoksin hassasiyeti.
Gram negatif bakteri sayısının hesaplanmasında 1 ng endotoksinin 10^3 adet/ml bakteriye eşdeğer olduğu kabul edilmiştir.

Mikrobiyolojik muayeneler

Örneklerde total aerobik canlı sayımı PCA'da yüzeysel sayım metoduna göre, koliform grubu mikroorganizmalar VRBA'da plak dökme metoduna göre, psikrofilik mikroorganizmalar PCA da yüzeysel sayım metoduna göre ekim 7°C 'de 10 gün inkübasyondan sonra, pseudomonaslar Glutamat Stärke Phenolred Agar (GSP) da yüzeysel sayım metoduna göre saptanmıştır.

Bulgular

İncelenen UHT ve pastörize süt örneklerinin mikrobiyolojik muayene ve endotoksin miktarına ait bulgular Tablo 1—3'de gösterilmiştir. Tablolar incelendiğinde pastörize süt örneklerinde total aerobik canlı sayısının 4×10^2 — $7,5 \times 10^6$ / ml arasında değiştiği ve örneklerin % 60'ında (18 örnek) 4×10^4 / ml'nin üstünde olduğu, psikrofilik mikroorganizma sayısının 1×10^2 — 3×10^5 / ml arasında ve örneklerin % 60'ında 10 / ml olduğu görülmektedir. Pastörize süt örneklerinin % 50'sinde 10 / ml'nin üstünde koliform bakteri ürettiği ve sayılarının

2×10^2 — 4×10^5 / ml arasında değiştiği saptanmıştır. İncelenen örneklerin hiçbirinde pseudomonas bulunmamıştır. Limulus testle pastörize süt örneklerinin taşıdığı endotoksin miktarının 5×10^2 — 5×10^5 ng / ml arasında değiştiği ve ortalama 2×10^5 ng / ml olduğu bulunmuştur. Limulus testle saptanan endotoksin miktarlarına göre incelenen pastörize süt örneklerinin pastörizasyon işlemi öncesinde 5×10^5 — 5×10^8 / ml (ortalama 2×10^8 / ml) arasında değişen sayıda ve % 36,6 sının 10^8 / ml den fazla gram negatif bakteri içerdikleri saptanmıştır.

İncelenen UHT süt örneklerinin hiçbirisinde mikrobiyolojik muayeneler sonucunda total aerobik canlı, psikrofilik mikroorganizma, koliform grubu mikroorganizma, pseudomonas bulunmamıştır. UHT süt örneklerinde Limulus testle 5×10^2 — 5×10^5 ng / ml arasında değişen miktarda ve ortalama 2×10^5 ng / ml endotoksin saptanmıştır. Saptanan endotoksin miktarlarına göre UHT sütlerin 5×10^8 — 5×10^8 / ml arasında değişen sayıda (ortalama 1.4×10^8 / ml) gram negatif bakteri içeren sütlerden yapıldıkları bulunmuştur.

Limulus testte kullanılan referans endotoksin hassasiyetinin 0.5 ng / ml olduğu saptanmış ve hesaplamalarda bu değer dikkate alınmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Çiğ sütlerin UHT ve pastörizasyon işlemlerine uygunluğu mikrobiyolojik yönden thermorezistans spor miktarı yanısıra psikrofilik bakteri sayısının azlığı ile belirlenmektedir. Vegetatif bakteri hücreleri UHT işlemi ile tahrip olmakla birlikte çiğ sütlerde 10^5 /ml'nin üzerindeki popülasyonlarda üründe gram negatif bakteriler tarafından oluşturulan ve çeşitli bozukluklara neden olan proteinaz ve lipaz aktivitesi dikkate alınmaktadır. Çiğ sütteki bakteri sayısı ne kadar fazla ise pastörizasyondan sonra canlı kalabilen bakteri sayısı o ölçüde fazla olacaktır. Pastörize sütlerin maksimum dayanıklılıkları bakımından ısı işleminin gram negatif bakterileri öldürecek şekilde ayarlanması önerilmektedir. UHT ve pastörize sütlerde gram negatif bakterilerin bulunuşu hijyenik önlemlerin yetersizliğine bağlı rekontaminasyona işaret ettiği gibi bu bakteriler soğukta muhafaza sırasında sütlerin bozulmasına neden olmaktadır.

Birinci sınıf çiğ sütlerin taşıdıkları bakteri sayılarının Avustralya, Finlandiya, Yeni Zelanda, A.B.D., İsviçre, Danimarka, İrlanda ve

Tablo 1. Pastörize süt örneklerindeki çeşitli mikroorganizma sayıları ve endotoksin miktarı ile buna bağlı olarak çiğ sütlerde hesaplanan gram negatif bakteri sayıları.

Örnek No	Total aerobik canlı	Psikrofilik mikroorganizma	Koliform grubu mikroorganizma	Pseudomonas	LAL titresi	Endotoksin miktarı (ng / ml)	Çiğ sütlerde hesaplanan bakt. sayıl.
1	2.5×10^2	—	—	—	10^6	5×10^2	5×10^8
2	2×10^3	—	2.4×10^2	—	10^3	5×10^2	5×10^5
3	1×10^3	—	—	—	10^3	5×10^2	5×10^5
4	3.5×10^4	1×10^2	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
5	3×10^2	—	2×10^2	—	10^3	5×10^4	5×10^7
6	2.5×10^2	—	1.2×10^3	—	10^6	5×10^2	5×10^8
7	2×10^5	—	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
8	5×10^3	—	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
9	2×10^2	—	—	—	10^5	5×10^4	5×10^7
10	2.5×10^3	1×10^2	1.3×10^2	—	10^6	5×10^5	5×10^8
11	1.5×10^3	—	3×10^2	—	10^6	5×10^5	5×10^8
12	1.5×10^3	—	—	—	10^6	5×10^5	5×10^8
13	7.5×10^2	—	—	—	10^6	5×10^5	5×10^8
14	2×10^3	—	—	—	10^6	5×10^5	5×10^8
15	6×10^2	—	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
16	4.5×10^4	—	1.5×10^2	—	10^5	5×10^4	5×10^7
17	4×10^6	—	4×10^2	—	10^6	5×10^5	5×10^8
18	1×10^5	1.3×10^4	9×10^2	—	10^6	5×10^5	5×10^8
19	4.5×10^4	1×10^3	1.3×10^3	—	10^4	5×10^3	5×10^6
20	3.5×10^5	5×10^4	1.5×10^4	—	10^6	5×10^5	5×10^8
21	4×10^3	—	2×10^2	—	10^3	5×10^2	5×10^5
22	1.5×10^4	—	9×10^2	—	10^3	5×10^4	5×10^7
23	1.5×10^6	3×10^2	—	—	10^6	5×10^2	5×10^8
24	1×10^5	2.5×10^4	3×10^3	—	10^2	5×10^4	5×10^7
25	1×10^4	1×10^3	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
26	7.5×10^6	6×10^4	3×10^2	—	10^4	5×10^2	5×10^6
27	4×10^2	—	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
28	1.6×10^5	1×10^3	1.3×10^4	—	10^2	5×10^4	5×10^7
29	7.5×10^3	5×10^2	—	—	10^4	5×10^2	5×10^6
30	4.5×10^4	4.5×10^2	—	—	10^4	5×10^3	5×10^6
Ortalama	5×10^3	4.7×10^4	2.9×10^4	—	—	2×10^2	2×10^8

Tablo 2. UHT süt örneklerindeki endotoksin miktarı ile buna bağlı olarak çiğ sütlerde hesaplanan gram negatif bakteri sayıları

Örnek No	LAL titresi	Endotoksin miktarı (ng / ml)	Çiğ sütlerde hesaplanan gram negatif bakteri sayıları
1	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
2	10 ³	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁷
3	10 ³	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁷
4	10 ³	5 × 10 ²	5 × 10 ³
5	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
6	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
7	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
8	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
9	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
10	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
11	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
12	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
13	10 ³	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁷
14	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
15	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
16	10 ³	5 × 10 ²	5 × 10 ³
17	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
18	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
19	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
20	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
21	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
22	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
23	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
24	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
25	10 ⁶	5 × 10 ³	5 × 10 ⁸
26	10 ⁵	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁷
27	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
28	10 ³	5 × 10 ²	5 × 10 ³
29	10 ³	5 × 10 ²	5 × 10 ³
30	10 ⁴	5 × 10 ³	5 × 10 ⁶
Ortalama	—	3 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁸

Tablo 3. UHT ve pastörize süt örneklerindeki mikroorganizma sayıları ve endotoksin miktarına göre çiğ sütlerde hesaplanan gram negatif mikroorganizma sayılarının dağılımı.

Mikroorganizma sayıları ve endotoksin miktarı (ng/ml)	Pastörize süt										UHT süt			
	Total aerobik canlı		Psikrofilik mikroorganizma		Koliform grubu mikroorganizma		Endotoksin miktarı		Çiğ sütlerde hesaplanan gram neg. bakteri		Endotoksin miktarı		Çiğ sütlerde hesaplanan gram neg. bakteri	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
< 10	—	—	18	60.0	15	50.0	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ¹ - 10 ²	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ² - 10 ³	3	10.0	3	10.0	8	26.7	3	10.0	—	—	3	10.0	—	—
10 ³ - 10 ⁴	6	20.0	3	10.0	4	13.3	10	33.3	—	—	14	46.7	2	6.7
10 ⁴ - 10 ⁵	6	20.0	4	13.3	2	6.7	6	20.0	—	—	4	13.3	—	—
10 ⁵ - 10 ⁶	12	40.0	2	6.7	1	3.3	11	36.7	3	10.0	8	26.7	3	10.0
10 ⁶ - 10 ⁷	3	10.0	—	—	—	—	—	—	8	26.7	1	3.3	14	46.7
10 ⁷ - 10 ⁸	—	—	—	—	—	—	—	—	8	26.7	—	—	4	13.3
> 10 ⁸	—	—	—	—	—	—	—	—	11	36.6	—	—	7	23.3

Hollanda'da 50.000 / ml; Norveç, İskoçya ve İsveç'de 80.000 / ml; Belçika'da 200.000 / ml'den az olmaları Doğu Almanya ve Federal Almanya'da 300.000 / ml; İtalya ve Avusturya'da 500.000 / ml den az olması gerektiği bildirilmektedir (20).

Ülkemizde UHT ve pastörize edilecek çiğ sütler için izin verilen maksimum gram negatif bakteri miktarı ile ilgili kriterler ve yasal düzenlemeler mevcut değildir. TSE pastörize süt standartlarında A sınıfı pastörize sütlerin mililitresinde 20.000'den çok bakteri ve koliform grubu mikroorganizma bulunmaması, B sınıfı pastörize sütlerin mililitresinde 40.000'den çok bakteri ve 0,5 mililitresinde koliform grubu mikroorganizma bulunmaması gerektiği belirtilmektedir (29). Uzunhasanoğlu (30), Ankara piyasasına gelen 50 adet çiğ süt örneği üzerinde yaptığı araştırmada çiğ süt örneklerinin sağımdan sonra ortalama 2.4×10^5 / ml total bakteri içerdiğini, piyasaya intikal eden çiğ sütlerde bu miktarın 1.3×10^8 / ml'ye yükseldiğini saptamıştır. Piyasadaki çiğ sütlerin senelik ortalama 6.4×10^7 / ml bakteri taşıdığını ve yaz mevsiminde bu miktarın 2×10^8 / ml bakteriye çıktığını belirtmektedir. Senelik ortalama 10^6 / ml'den fazla bakteri içeren sütlerin tüm çiğ sütlere oranının % 48,92 olduğunu ve yaz mevsiminde bu oranın % 86,95'e çıktığını ortaya koymuştur. Piyasada satılan çiğ sütlerin % 63,54'ünün 10^5 / ml veya daha fazla koliform grubu mikroorganizma taşıdığını saptamıştır. Ambarcı (2), Ankara piyasasında satılan 174 pastörize süt örneğinden % 67,6'sında 2×10^4 / ml'den fazla total bakteri, % 78,92'sinde 10 / ml den fazla koliform grubu mikroorganizma, % 72,5'inde 100 / ml'den fazla proteolitik mikroorganizma, % 60,8'inde 100 / ml'den fazla lipolitik mikroorganizma saptamıştır. Özalp (18) Ankara'da mevcut dört pastörize süt fabrikasında yapmış olduğu araştırmada, çiğ sütlerde ortalama total bakteri sayısını $2,9 \times 10^{10} \pm 7,3 \times 10^9$ / ml, koliform sayısı ortalamasını $5,6 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$ / ml; şişelenmiş pastörize sütlerde ise total bakteri sayısını $6 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ / ml; koliform sayısını $14,14 \pm 4,96$ / ml olarak saptamıştır. Ergüllü (7), çiğ süt örneklerinde toplam mikroorganizma sayısını en az $3,3 \times 10^4$ / ml, en çok $8,2 \times 10^8$ / ml, tüm örneklerde ortalama $2,9 \times 10^4$ / ml olarak saptamış, koliform grubu mikroorganizma sayısını en az 1×10^6 / ml, en çok $1,6 \times 10^8$ / ml ve ortalama $3,1 \times 10^7$ / ml olarak bulmuştur. Öztan (19), değişik kaynaklardan sağlanan çiğ sütlerin kalitesi üzerinde yaptığı araştırmada toplam bakteri sayısını en az $2,63 \times 10^5$ / ml, en çok $4,4 \times 10^8$ / ml ve ortalama $4,59 \times 10^7$ / ml olarak

saptamış, psikrofilik mikroorganizma sayısını en az $0,04 \times 10^5$ / ml, en çok $1,8 \times 10^8$ / ml ve ortalama $6,8 \times 10^6$ / ml olarak bulmuştur.

Tarafımızdan yapılan araştırma sonuçlarına göre çiğ sütlerin UHT ve pastörizasyon işlemi öncesinde önemli sayıda gram negatif bakteri içerdikleri ve elde edilen bulguların daha önce yapılan araştırma sonuçlarına uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca incelenen pastörize süt örneklerinin % 60'ının total aerobik canlı, % 50'sinin koliform grubu mikroorganizmalar bakımından pastörize süt standardına uygun olmadıkları görülmektedir. UHT süt örnekleri ise uygulanan mikrobiyolojik muayenelere göre spor sayıları dışında UHT süt standartlarına uygun bulunmuşlardır. Ancak her iki çeşit sütlerin önemli miktarda bakteriyel endotoksin içerdikleri saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Adams, D.M., Brawley, T.G. (1981): *Heat resistant bacterial lipases and ultrahigh temperature sterilization of dairy products*. J. Dairy Sci., 65, (10): 1951—1957.
2. Ambarcı, İ. (1972): *Ankara piyasasında satılan pastörize sütlerin mikrobiyolojik nitelikleri üzerinde araştırmalar*. Born. Vet. Araş. Enst. Derg., 13 (24): 4—49.
3. Andersson, R.E., Danielsson, G., Hedlung, C.B. (1981): *Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultrahightemperature sterilized milk*. J. Dairy Sci., 64 (3): 375—379.
4. Bucholz-Berchtold, S. (1977): *Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit dem Limulus-Test*. Vet. Med. Diss. München.
5. Coates, D.A. (1977): *Enhancement of the sensitivity of the limulus assay for the detection of gram negative bacteria*. J. Appl. Bact., 42: 445—449.
6. Dodds, K.L., Holley, R.A., Kempton, A.G. (1983): *Evaluation of catalase and Limulus Amoebocyte Lysate Tests for rapid determination of the microbial quality of vacuum-packed cooked Turkey*. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 16 (3): 167—172.
7. Ergüllü, E. (1982): *Çiğ sütte koliform grubu bakteri florası üzerinde araştırmalar*. Gıda Derg., 7 (6): 263—266.
8. Fallowfield, H.J. Patterson J.T. (1985): *Potential value of the Limulus lysate assay for the measurement of meat spoilage*. J. Food Technol., 20: 467—479.
9. Fleischer, A., Schmid, E.E., Müller, A. (1981): *The limulus test in microbiological quality control*. Pharm. Acta Helv., 56 (7): 186—189.
10. Frauch, P. (1974): *Der Limulus-Tests zum in vitro Nachweis von Endotoxin*. Die Krankenhaus Apotheke, 24 (1): 1—2.

11. Jaksch, P., Zaadhof, K.J., Terplan, G. (1982): *Zur Bewertung der hygienischen Qualität von Milchprodukten mit dem Limulus-Test.* Molk-Ztg. Welt der Milch. 36 (1): 5—8.
12. Jay, J.M. (1977): *The Limulus lysate endotoxin assay as a test of microbial quality of ground beef.* J. Appl. Bact., 43:99—199.
13. Jay, J.M., Margitic, S., Shereda, A.L., Covington, H.V. (1979): *Determining endotoxin content of ground beef by the Limulus Amoebocyte Lysate as a Test rapid indicator of microbial quality.* Appl. Environ. Microbiol., 38 (5): 885—890.
14. Jay, J.M. (1981): *Rapid estimation of microbial numbers in fresh ground beef by use of the Limulus test.* J. Food Protec., 44 (4): 275—278.
15. Krüger, D. (1981): *Der Pyrogennachweis mittels des Limulustests-Methoden, Ergebnisse, Möglichkeiten und Grenzen eines In-vitro-Tests.* Pharm. Ind., 43: 1—8.
16. Levin, J., Bang, F.B. (1964): *The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood.* Bull. Johns Hopkins Hosp., 115: 265—274.
17. Mckeller, R.C. (1981): *Development of off-flavours in ultrahigh temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis.* J. Dairy Sci., 64 (11): 2138—2145.
18. Özalp, E. (1975): *Ankara süt fabrikalarında pastörizasyonda sağlanan mikrop reduksiyonu ve pastörizasyondan sonraki kademelerde bulaşma durumu üzerinde araştırmalar.* A.Ü. Vet. Fak. Derg., 21 (1—2): 47—69.
19. Öztan, A. (1988): *A.Ü. Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Eğitim Araştırma ve Uygulama İşletmesine Değişik Kaynaklardan Sağlanan Çiğ Sütlerin Kalitesi.* Yüksek lisans tezi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
20. Suhren, G., Hesschen, W. (1984): *Bakteriologische Wertigkeit und Güte-VO.* Dtsch. Molkerei-Ztg. 105: 1126—1131.
21. Südi, J., Suhren, G., Heeschen, W., Tolle, A. (1981): *Entwicklung eines miniaturisierten Limulus-Tests im Mikrotiter System zum quantitativen Nachweis gramnegativer Bakterien in Milch und Milchprodukten.* Milchwiss. 36 (4): 193—198.
22. Südi J. (1982): *Limulus assay of bacterial lipopolysaccharides in UHT Milk.* Kieler Milchw. Forschber., 34 (1): 141—146.
23. Südi J., Heeschen, W. (1983): *Anwendung des Limulus-Tests zur Beurteilung der Milch von der Erzeugung bis zum Konsum.* Dtsch. Milchwirtsch., 21: 692—698.
24. Südi, J., Heeschen, W. (1984): *Untersuchungen zur quantitativen Aussage des Limulus-Tests über die mikrobiologische-Beschaffenheit von Milch und Milchprodukten.* Arch. Lebensmittelhyg., 35 (2): 32—35.
25. Sullivan, J.D., Ellis, P.C., Lee, R.G., Combs, W.S., Watson, S.W. (1983): *Comparison of the Limulus Amoebocyte Lysate Test with plate counts and chemical analyses for assessment of the quality of lean fish.* Appl. Environ. Microbiol., 45 (2): 720—722.
26. Terplan, G., Zaadhof, K.J. Buchholz Berchtold, S. (1975): *Zum Nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit dem Limulus-Test.* Arch. Lebensmittelhyg., 26 (6): 217—221.
27. Terplan, G., Bieri, J., Grove, H.H., Zaadhof, K.J. (1981): *Zur Bewertung der Hygiene bei Gewinnung und Verarbeitung von Lebensmittel mit dem Limulustest.* Arch. Lebensmittelhyg., 32 (1) 15—19.

28. Teufel, P., Sacher, V., Kolb, H. (1982): *Untersuchungen von Thunfischkonserven mit dem Limulus-Test*. Vortrag anlässlich der 23. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVD. 28 Sept. -10 Okt., Garmisch Partenkirchen.
29. Türk Standartları Enstitüsü (1971): *Pastörize Süt, Türk Standartları TS: 1019*. TSE. Ankara.
30. Uzunhasanoğlu, H. (1967): *Ankara piyasasına gelen çiğ sütün hijyenik kaliteleri üzerinde araştırmalar*. Ogun Kardeşler Matbaası, Ankara.