

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİĞ SÜTTE *Pseudomonas aeruginosa* SAYILMASI İÇİN YÖNTEM
MODİFİKASYONLARI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Aylin (ŞEN) AKOĞLU

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2006

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇİĞ SÜTTE *Pseudomonas aeruginosa* SAYILMASI İÇİN YÖNTEM MODİFİKASYONLARI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Aylin AKOĞLU

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Bu çalışmada ilk olarak *P. aeruginosa* için selektif olan GSP Agar ve Ceftrimide Agar'da *P. aeruginosa* dışındaki refakatçi flora izole edilmiştir. 20 çiğ süt örneğinden elde edilen 28 izolattan 8'i *Pseudomonas* spp., 6'sı *Aeromonas* spp., 6'sı *Enterobacter* spp., 3'ü *Escherichia* spp., 2'si *Citrobacter* spp., 2'si *Klebsiella* spp. ve 1'i de *Erwinia* spp. olarak tanımlanmıştır.

Sonraki aşamada, *P. aeruginosa*'nın ve *Pseudomonas* spp.'nin denemelerde kullanılan penisilin G potasyum (PGP), ampicilin ve benzalkonyum klorüre (BC) dirençli olduğu belirlenmiş ve refakatçi floranın inhibisyonu için PGP, ampicilin ve BC kullanılarak GSP Agar'da modifikasyon yapılmıştır. GSP Agar'a farklı konsantrasyonlarda katılan PGP (50000, 100000, 150000 ve 200000 IU/L) ve ampicilin (800, 1600 ve 2400 µg/L) refakatçi floranın baskılanmasında yetersiz kalmıştır. GSP Agar'da 512 µg/mL düzeyindeki BC'nin, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. ve *Erwinia* spp.'nin gelişimini inhibe etmediği ancak diğerlerinin gelişimini inhibe ettiği görülmüştür. BC-GSP Agar'daki sayım sonuçlarına göre, *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp. ve *Klebsiella* spp. sayılarında büyük bir düşüş (% 89) olduğu, *Citrobacter* spp. sayısında yarı yarıya bir düşüş (% 48) olduğu, *P. aeruginosa* ve *Erwinia* spp. sayısında ise değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu durum, BC-GSP Agar'ın, refakatçi floranın büyük bir çoğunluğunu tamamen inhibe ettiğini göstermiş ve BC'nin *P. aeruginosa* sayımında kullanılabilecek uygun bir inhibitör olduğuna işaret etmiştir.

Çalışmanın son aşamasında 512 µg/mL düzeyinde BC-GSP Agar ile piyasa taraması yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda çiğ süt örneklerinin BC-GSP Agar'daki sayım sonuçlarının, kontrol besiyerindeki sayım sonuçlarına göre daha düşük olduğu ve aradaki bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (p<0,05).

Tüm bu veriler doğrultusunda; BC-GSP Agar besiyerinin, *P. aeruginosa*'nın gelişimini baskılamaması ve refakatçi floranın büyük bir çoğunluğunu inhibe etmesi nedeniyle, çiğ süttten *P. aeruginosa* izolasyonu ve sayımında kolaylık sağlayacağı sonucuna ulaşılmıştır.

2006, 60 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *P. aeruginosa*, GSP Agar, çiğ süt, benzalkonyum klorür

ABSTRACT

Master Thesis

STUDIES ON METHOD MODIFICATIONS FOR ENUMERATION OF *Pseudomonas aeruginosa* IN RAW MILK

Aylin AKOĞLU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

In this study, initially isolation of competitive flora, except *P. aeruginosa*, grown on GSP Agar and Cetrinide Agar those are selective media for *P. aeruginosa*, were performed. At this stage, 20 raw milk samples were used and 28 isolates were obtained. Of the 28 isolates, 8 were identified as *Pseudomonas* spp., 6 as *Aeromonas* spp., 6 as *Enterobacter* spp., 3 as *Escherichia* spp., 2 as *Citrobacter* spp., 2 as *Klebsiella* spp. and 1 as *Erwinia* spp.

At the second stage, it was determined that *P. aeruginosa* and *Pseudomonas* spp. were resistant to penicilin G potassium (PGP), ampicillin and benzalkonium chloride (BC). For the inhibition of competitive flora, GSP Agar were modified using PGP, ampicillin and BC. PGP (50000, 100000, 150000 and 200000 IU/L) and ampicillin (800, 1600 and 2400 µg/L) added into GSP Agar at different concentrations were insufficient to depress the competitive flora. BC that is another inhibitory substance was added into GSP Agar at the level of 512 µg/mL, it did not inhibit the growth of *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. and *Erwinia* spp., whereas it inhibited that of *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Klebsiella* spp., and *Citrobacter* spp. Evaluation of enumeration results obtained on BC-GSP Agar revealed that counts of *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp. and *Klebsiella* spp. were decreased significantly (89 %), *Citrobacter* spp. was reduced by 48 %, although *P. aeruginosa* and *Erwinia* spp. counts were remained unchanged. These findings showed that BC-GSP Agar inhibited most of the competitive flora completely and BC is a suitable inhibitory substance for enumeration of *P. aeruginosa*.

At the last stage of the study, market survey was carried out using GSP Agar containing BC at the level of 512 µg/mL. According to statistical analyses results, enumeration results of raw milk samples on BC-GSP Agar were lower than those on control media, and this difference was found statistically significant ($p < 0.05$).

By the light of all these findings, it was concluded that BC-GSP Agar could facilitate isolation and enumeration of *P. aeruginosa* in raw milk, because it did not suppress the growth of *P. aeruginosa* and inhibited most of the competitive flora.

2006, 60 pages

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, GSP Agar, raw milk, benzalkonium chloride

TEŞEKKÜR

Bana bu alanda kendisiyle birlikte çalışma şansını tanıyan ve çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN' a,

Tezim sırasında desteklerini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÇAKIR ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Arş. Grv. Ekrem KILIÇ' a,

Anlayışlarını, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşlarım Arş. Grv. Gökçe POLAT, Deniz KOÇAN, Selin KALKAN' a,

Çalışmalarında bana yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Serap COŞANSU, Mustafa GAYRETLİ ve sevgili arkadaşım Emel KAHRAMAN' a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bugüne gelmemi sağlayan canım aileme, her zaman yanımda olup bana güven veren sevgili eşim Arş. Grv. İlker AKOĞLU' na sonsuz teşekkürler ederim.

Aylin AKOĞLU
Ankara, Temmuz 2006

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | vii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 3 |
| 2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Özellikleri..... | 4 |
| 2.1.1 Tarihçesi..... | 4 |
| 2.1.2 Morfolojik özellikleri..... | 5 |
| 2.1.3 Kültürel ve biyokimyasal özellikleri..... | 5 |
| 2.1.4 Çeşitli ajanlara karşı dirençlilik..... | 8 |
| 2.1.5 Yaptığı hastalıklar..... | 13 |
| 2.2 <i>Pseudomonas</i> 'ların Süt ve Süt Ürünlerinde Neden Olduğu Sorunlar..... | 14 |
| 2.3 <i>Pseudomonas</i> 'lar Tarafından Üretilen Ekstraselüler Enzimler ve Meydana Gelen Değişimler..... | 16 |
| 2.3.1 Proteaz enzimi..... | 16 |
| 2.3.2 Lipaz enzimi..... | 17 |
| 2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Sayımına Yönelik Yapılan Çalışmalar ve Kullanılan Besiyerleri..... | 19 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM..... | 27 |
| 3.1 Materyal..... | 27 |
| 3.1.1 Mikroorganizmalar..... | 27 |
| 3.1.2 Süt..... | 27 |
| 3.1.3 Besiyeri modifikasyonu denemelerinde kullanılan materyal..... | 27 |
| 3.2 Yöntem..... | 28 |
| 3.2.1 Çiğ süttten gelen refakatçi floranın izolasyonu..... | 29 |
| 3.2.2 Çiğ süttten gelen refakatçi floranın tanımlanması..... | 29 |
| 3.2.3 Besiyeri modifikasyonu denemeleri..... | 30 |
| 3.2.3.1 Antibiyotik kullanımının refakatçi flora ve <i>P. aeruginosa</i> üzerine etkisi.. | 30 |
| 3.2.3.2 BC kullanımının refakatçi flora ve <i>P. aeruginosa</i> üzerine etkisi..... | 32 |
| 3.2.4 Piyasa taraması..... | 35 |
| 3.2.4.1 Çiğ süttten <i>P. aeruginosa</i> izolasyonu..... | 35 |
| 3.2.4.2 Laboratuvar koşullarında çiğ süte ilave edilen <i>P. aeruginosa</i> 'nın çiğ süttten geri alınması..... | 35 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA..... | 37 |
| 4.1 Çiğ Süttten Gelen Refakatçi Floranın İzolasyonu ve Tanımlanması..... | 37 |
| 4.2 Besiyeri Modifikasyonu Denemeleri Sonuçları..... | 39 |
| 4.2.1 PGP kullanımının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi..... | 39 |
| 4.2.2 Ampisilin kullanımının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi..... | 41 |
| 4.2.3 Benzalkonyum klorür kullanımının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3 Piyasa Taraması Sonuçları..... | 49 |
| 4.4 Laboratuvar Koşullarında Çiğ Süte İlave Edilen <i>Pseudomonas aeruginosa'</i> nın Çiğ Sütten Geri Alınması Denemesindeki Sayım Sonuçları..... | 50 |
| 5. SONUÇ..... | 52 |
| KAYNAKLAR..... | 55 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 60 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 3.1 Disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram testi sonucunda meydana gelen zon çapları..... | 31 |
| Şekil 3.2 <i>P. aeruginosa</i> ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları..... | 34 |
| Şekil 3.3 <i>P. aeruginosa</i> ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları..... | 34 |
| Şekil 3.4 <i>P. aeruginosa</i> ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında 100.000 IU/L PGP içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları..... | 34 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1 <i>P. aeruginosa</i> suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları..... | 12 |
| Çizelge 2.2 <i>Pseudomonas</i> spp. izolasyonunda çoğunlukla kullanılan ortamlar..... | 26 |
| Çizelge 4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve refakatçi flora tanımlaması için yapılan biyokimyasal test sonuçları..... | 38 |
| Çizelge 4.2 PGP ile yapılan antibiyogram testi sonucunda elde edilen zon çapları (mm)..... | 39 |
| Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda PGP içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)..... | 40 |
| Çizelge 4.4 Ampisilin ile yapılan antibiyogram testi sonucunda elde edilen zon çapları (mm)..... | 42 |
| Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda ampisilin içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)..... | 43 |
| Çizelge 4.6 <i>P. aeruginosa</i> 'nın ve refakatçi floranın farklı konsantrasyonlarda BC içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları..... | 46 |
| Çizelge 4.7 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)..... | 47 |
| Çizelge 4.8 Tüm izolatların BC, PGP ve BC+PGP içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumlar..... | 48 |
| Çizelge 4.9 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/ml)..... | 49 |
| Çizelge 4.10 10^5 - 10^6 kob/mL düzeyinde <i>P. aeruginosa</i> içeren çiğ sütün BC-GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları(logkob/mL)..... | 50 |

1. GİRİŞ

Kompleks biyokimyasal yapısı ve yüksek su aktivitesi nedeniyle çiğ süt, patojen mikroorganizmalar için son derece uygun bir besin ortamıdır. Sağlıklı bir hayvandan aseptik koşullarda sağılan taze süt çok az sayıda bakteri içerir. Süte mikrobiyel bulaşma sağım ile başlar. En önemli bulaşma kaynakları hayvanın memesi, deri, kıl, insan eli, sağım makineleri, süt kapları ve soğutuculardır. Süte bu çevrelerden genellikle hava, toz, toprak, su ve gübre kaynaklı mikroorganizmalar bulaşır. Bunun yanında süttten yapılan çeşitli süt mamulleri, süte daha önceden bulaşan mikroorganizmalara ilave olarak üretim sırasında insan eli, su, alet ve ekipman, katkı maddeleri ve paketleme materyalinden gelen mikroorganizmalarla bulaşır.

Pseudomonas' lar doğada toprak ve suda yaygın olarak bulunan aynı zamanda hayvan derisi üzerinde sıkça rastlanan bakteriler olduğundan süttün sağımı sırasında hijyenik koşullara dikkat edilmediği takdirde süte bulaşabilmektedirler. *Pseudomonas'* lar sütt ekipmanları ve hortum başlarında kolonizasyon yapabilmektedirler.

Soğukta bekletilen sütlerde, *Pseudomonas* grubu bakterilerin salgıladıkları proteaz ve lipaz gibi ekstraselüler enzimlerin varlığı, bu enzimlerin ısıya son derece dirençli olmaları ve aktivitelerinin UHT (Ultra High Temperature) işlemine bile dayanabilmeleri ürün bazında sorunlar yaratmaktadır. Isıl işlem sonrası sütt içerisindeki mikroorganizmaların büyük bir çoğunluğu canlılıklarını kaybetmekte ancak bu enzimler aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Lipaz enzim aktivitesi sonucunda gliserin ve yağ asitleri açığa çıkmakta, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu diğer reaksiyonlarla birlikte aldehit, keton ve asit bileşiklerinin oluşmasına neden olmakta ve sonuçta acı tat ve kötü koku oluşmaktadır. Proteaz enzim aktivitesi nedeniyle ise UHT sütte asitlik gelişmeksizin tatlı pıhtılaşma denilen enzimatik bir hata oluşmakta, proteinler parçalanmakta ve kabın dibinde pıhtı oluşmaktadır.

Pseudomonas aeruginosa sayılmasına bağlı olarak sütte olası proteaz ve lipaz enzim varlığının tahmini ve buna göre bu sütlerin UHT süte verilip verilmeyeceğine karar

verilmesi ise mikrobiyolojik analizlerin en az 24 saat sürdüğü dikkate alındığında pratik bir anlam taşımamaktadır. Bu enzimlerin kantitatif tayini üzerinde çalışmalar yapılmış ve kitler geliştirilmiştir. Ancak enzimlerin belirlenmesi için gerekli olan bu analizlerin sütlerin rutin kontrolü sırasında yapılmasına, hayvan sağlığı ve süt toplama gibi konulardaki gelişmeler sonucunda gerek kalmamıştır.

Türkiye'nin kırsal yapısına bakıldığında sütün çiftliklerden ziyade köylülerden toplandığı görülmektedir. Bu aşamada enzimlerin varlığı değil, ancak bu enzimleri üreten bakteri varlığının doğru şekilde belirlenmesi, bölgelere göre hangi sütün UHT'ye verilmesi kararında önemlidir. Bu belirleme sonunda bölgeye yönelik gerekli eğitim ve düzeltici-önleyici faaliyet ile UHT sütlerdeki raf ömrü uzatılacaktır.

Bu nedenlerle *Pseudomonas*'ların gıdalardan izolasyonu ve sayımı önem kazanmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın çeşitli gıda örneklerinde sayımı için Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) ve Cetrinide Agar besiyerleri önerilmekle beraber, sanayiden gelen veriler bu besiyerlerinin selektivitesinin *Pseudomonas*'lar için yeterli olmadığı yönündedir.

Bu çalışmada, *Pseudomonas*'ların ve çiğ sütteki refakatçi floranın antibiyotik direnci ve diğer biyokimyasal özellikleri dikkate alınarak, mevcut besiyerleri üzerinde çeşitli modifikasyonlar yaparak *Pseudomonas*'lar için daha selektif bir besiyeri elde etmek amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pseudomonas cinsi bakteriler, *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alırlar. Bu bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir. Son derece önemli olan bu cinsin türlerinin bazıları oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatiftir. Glikozu oksidasyon yoluyla parçalayan bakterilerdir. Türlerin tamamı katalaz pozitif, Gram negatif, aerobik, polar flagellasıyla hareket edebilen çubuk şekilli bakterilerdir. *Pseudomonas'* ları gıdalar için önemli kılan pek çok özellik vardır. Bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktivite göstermektedir. Aerobik olmaları nedeniyle gıdaların yüzeyinde hızla gelişirler ve sonuçta okside ürünler ve mukoz madde oluştururlar. Kendi gelişmeleri için gerekli olan gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğindedirler. Psikrofil, mezofil ve psikrotrof türleri vardır. Özellikle soğukta saklanan süt, et, yumurta ve deniz ürünlerinin birinci derecede bozulma etmenidirler. Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olabilmektedirler. Oksijensiz koşullarda ve 42 °C' nin üzerinde çoğalamazlar. Kurumaya dirençlilikleri zayıftır. Bazı gıdalar üzerinde *Pseudomonas fluoresans* yeşilimsi, *Pseudomonas nigrificans* siyah, diğer türleri ise kahverengi pigment oluşturur (Pelczar and Reid 1958, Tortora *et al.* 1992, Ayhan 2000).

Bu cinsin üyeleri, birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından ve ancak birkaç bakterinin tolere edebildiği koşullarda canlılıklarını sürdürebilmeleri nedeni ile klinik açıdan önemlidirler (<http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004).

Pseudomonas cinsi bakteriler buzdolabı sıcaklığında depolanan gıdalardaki bozulmaların birçoğundan sorumludurlar. Buzdolabında birkaç gün depolanmış taze etlerde hakim florayı oluştururlar. Raf ömrünün başlangıcında toplam mikroflorada az bir yer kaplarlar ancak yüksek su aktivitesi, nötr pH, uygun sıcaklık ve O₂ kaynağının bulunması gibi şartların sağlanması durumunda hızlı bir gelişme gösterirler. *Pseudomonas'* lar lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucunda gıdalarda istenmeyen tat, renk ve koku oluştururlar. Taze etlerde ve diğer gıdalarda kalite kriterlerini

belirlemede *Pseudomonas*' ların izolasyonu ve sayımı önemlidir (Solberg *et al.* 1972, Jeppesen 1995).

Pseudomonas cinsi bakterilerden en sık izole edilen insan patojeni *P. aeruginosa*' dır. Çevre koşullarına ve dezenfektan maddelere dirençlidirler, iyotlu solüsyonlarda bile üreyebilirler. Hastane ortamında sık bulunurlar. Bu nedenle birçok hastane infeksiyonu etkeni arasında ön sıralarda yer alırlar (Şengöz vd. 2005).

Pseudomonas' ların türleri oldukça fazla olduğu için görünümüne, pigment oluşturup oluşturmamalarına ve metabolizmalarına göre sınıflandırmaları yapılmıştır. RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre, bu iki nükleik asidin gösterdiği uyumlara bakarak, bu bakteriler I, II, II, IV, V rRNA gruplarına ayrılmışlardır. *Pseudomonas aeruginosa* rRNA grup I' e dahil olmuştur (Özan 1996, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004).

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*' nın Özellikleri

2.1.1. Tarihçesi

P. aeruginosa ilk olarak 1850' de Sedillot tarafından cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişikliği yapan bir ajan olarak tanımlanmıştır. İlk olarak *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. Piyosiyanın izolasyonu Lucke tarafından 1862' de yapılmıştır, ancak bu organizma, Gessard' ın klasik çalışmaları ile 1882' de saf kültür olarak izole edilmiştir. 1897' de Hitschman ve Kreibich, 1917' de Frenkel ve 1925' te Osler patojen bir bakteri olduğunu tanımlamışlardır. 1926 yılında Dooren de Jong, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmıştır. 1966' da Buchanon, Holt ve Lessel *Pseudomonas* türlerini fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. Daha sonra DNA hibridizasyon çalışmaları başlamıştır. 1973 yılında Palleroni ve arkadaşları, nükleik asit hibridizasyon çalışmalarını genişleterek *Pseudomonas*' ları rRNA homolojilerine göre 5 gruba

ayırılmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu cinsin sınıflandırılması yeniden düzenlenmiştir (Aydın 2001).

2.1.2. Morfolojik özellikleri

Uzunlukları çok değişik olmakla beraber 1,5–3 µm genişliğinde, bazen ikili bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde, aerob bakteridirler. Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet flagellaları vardır ve çok hareketlidirler. Kolay boyanırlar ve Gram negatiftirler. Uzun süre beklemiş kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanları, R (rough) tipinde üreyenlerin bulunduğu bildirilmiştir (Frobisher 1968, Davis *et al.* 1968, Özcan 1996).

2.1.3. Kültürel ve biyokimyasal özellikleri

Uygun besiyerinde optimum 30–37 °C' lerde ve düşük alkali ortamlarda gelişir. 41 °C' de üreyebilme yeteneği *P. aeruginosa* için önemli bir özellik olup arka arkaya 3 pasajda 42 °C' de üreyebilmesi *P. fluorescens*' den ayırt edici bir özelliğidir. Aerob olmakla beraber denitrifikasyon özelliğinde olduğundan anaerob üreyen türlerine de rastlanabilir. Sıvı besiyerinde yüzeyde zar yapmak üzere yoğun ve homojen bir üreme gösterir ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti ayırt edilir. Uzun süre beklemiş kültür ortamları zamanla alkali duruma geldiğinden bakteriler litik fermentlerle erir ve sıvı besiyerini berraklaştırır. Peptonlu suda aynı şekilde ürerler. *P. aeruginosa* katı besiyerinde 3 tip koloni oluşturur. Tip 1 koloni, 2-3 mm çapında yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, yassı, beyaz renkli karşıdan bakılınca floresan özelliği olan ve besiyerinin her tarafına yayılmış olan yeşil-mavi pigmentleri göze çarpan kolonilerdir. Bu tip koloniler genellikle klinik örneklerden izole edilir. Çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilen tip 2 koloni, daha küçük, kabarık, konveks ve düzensiz koliform kolonilerine benzeyen kolonilerdir. Tip 3 koloni ise, *P. aeruginosa*' nın bazı suşlarının hücre dışı alginat salgılaması nedeniyle mukoid görünümde bakterinin oluşturduğu R kolonilerdir. Kültürlerde triptofan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı

olarak karakteristik bir meyve kokusu vardır ve Petri kutusunun kapağı açıldığında üzüm kokusu veya trimetilamin kokusu şeklinde hissedilir (Wilson and Miles 1964, Davis *et al.* 1968, Ilgaz 1999, Aydın 2001).

P. aeruginosa' nın bazı biyokimyasal özellikleri şöyledir;

-Kanlı agarda hemoliz yaparlar. Kanlı agarda üreyen klinik izolatlar sıklıkla beta hemolitiklerdir.

-Jelatin ve koagule plazmayı eriterek parçalarlar.

-Glikozu oksidatif yolla parçalayıp asit yaparlar. Laktoz ve sakkarozu kullanamazlar.

-Oksidaz pozitif olmaları ile *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden ayrılırlar.

-Asetamini deamine ederek amonyak oluştururlar.

-Nişastaya etki etmezler.

-Katalaz ve sitrat reaksiyonları pozitifdir.

-L-arjinin dihidrolaz oluştururken, lisin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmazlar.

-İndol ve H₂S oluşturmazlar.

-Metil Red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) negatifdir.

-Nitrati nitrite redükte ederler.

-Tetrazolyum tuzlarını ve seleniti redükte ederler.

-Potasyum siyanüre dirençlidirler.

-*P. aeruginosa*, *P. fluorescens'* den ayrı olarak metilen mavisini ve prontosilin rengini giderir (Wilson and Miles 1964, Frobisher 1968, Özan 1996, Ilgaz 1999, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004).

Pseudomonas suşlarının çoğu kültür ortamında pigment üretirler. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Mutasyonla bu özellik kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar, oda sıcaklığında daha iyi oluşurlar (Davis *et al.* 1968, Aydın 2001).

Floresan pigmentler, floresan özellik taşıyan *Pseudomonas*' ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir. Bu pigmentler sideroforlardır ve kültür ortamında düşük demir konsantrasyonlarında bol miktarda üretilirler. King B kültür ortamı, floresan pigmentlerin üretimini uyarmakta kullanılır.

Floresin, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen sarımsı renkte bir floresan pigmentidir. Bu pigmentin görülebilmesi için bazen UV (Ultra Viyole) ışığa ihtiyaç duyulur. King B besiyerinde klinik izolatların % 70' i bu pigmenti oluşturur. Floresan bir pigment olan piyoverdin, referans bir *Pseudomonas* suşundan (PAO1) izole edilmiştir (Wilson and Miles 1964, Aydın 2001).

Piyosiyenin, mavi bir fenazin türevidir. *P. aeruginosa* için karakteristiktir. Asidifikasyonla rengi önce sarıya sonra da kırmızıya dönebilir, alkali ortamlarda ise renksizleşebilir. Suda ve kloroformda çözünür. Sıvı besiyerlerinden yapılmış bakteri kültürlerine eşit miktarda kloroform eklenir ve çalkalanırsa bu pigment besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak koyu mavi renkte gözlenir. Piyosiyenin üretimi King A besiyeri kullanılarak artırılabilir. *P. aeruginosa* suşları 37 °C' de 5 gün inkübe edildiğinde, suşların % 80' i piyosiyonin oluşturur. Oda sıcaklığında 3-4 gün bırakıldığında agar kültürlerinde pigmentasyonda artış gözlenir (Wilson and Miles 1964, Aydın 2001).

Piyorubin, bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen parlak kırmızı renkte, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen bir fenazin pigmentidir. Düşük oksijen konsantrasyonunda geri dönüşümsüz olarak rengini yitirir. Piyorubin klinik izolatların % 2' sinde üretilir (Wilson and Miles 1964, Aydın 2001).

Piyomelanin, *P. aeruginosa* tarafından üretilen kahverengi-siyah renkli sık gözlenmeyen bir pigmenttir (Aydın 2001).

Besiyerinde özellikle piyosiyanın ve floresin pigmentlerinin oluşumu *P. aeruginosa'* nın tanısı yönünden oldukça önemli bir özelliktir (İlgaz 1999).

P. aeruginosa suşları bakteriyosinler üretir ve bunlar aynı türün diğer suşlarını öldürücü etkiye sahiptir. *P. aeruginosa* bakteriyosinleri piyosin adını alır. Brandy' nin (1967) yaptığı sınıflandırmaya göre *P. aeruginosa'* nın bakteriyosinleri R, S ve F tipindedir. S tipi; şekilsiz görünümlü ve proteolitik enzimlere duyarlı, R tipi; faj komponentleri yapısında ve proteolize duyarlı değildir. Bakteriyosin tiplendirilmesinde, duyarlı indikatör suşlara karşı bilinmeyen bir organizmanın ekstraktı ya da bilinen bakteriyosinlere karşı bilinmeyen suşun duyarlılığı denenir.

P. aeruginosa' larda birçok litik fajlar tanımlanmıştır ve bu fajların morfolojik çeşitliliği en azından diğer bakteri cinslerindeki kadar önemlidir. Aynı somatik grup *P. aeruginosa* suşları arasında ayırım yapmak için faj tiplendirme tekniği kullanılır. Faj tiplendirmesinde test suşu üzerine bilinen faj süspansiyonları damlatılarak inkübasyondan sonra lizis saptanır.

P. aeruginosa' nın 17 somatik (O) ve 6 flagella (H) antijeni vardır. O antijeni ısıya dayanıklı, flagella ve fimbria antijenleri ısıya dayanıksızdır. Fosfatazlar, proteazlar ve fosfolipazlar da antijen olarak rol oynarlar (İlgaz 1999).

2.1.4. Çeşitli ajanlara karşı dirençlilik

Pseudomonas' lar ısıya dirençsiz bakterilerdir. 55 °C' de 1 saat ve 60 °C' de 15 dakikada ölürlür. Uygun çevre sıcaklığı koşullarında sularda aylarca canlı kalırlar. Özellikle hastane ortamında cerrahi ve yanık servislerinde organik kalıntıların bulunmasına bağlı olarak uzun süre canlı kalabilirler. Diğer patojenlere göre kimyasal dezenfektanlara daha dirençlidirler. Uygun nem koşullarında çeşitli yerlerde üreyebilirler. Dörtlü amonyum bileşiklerinde, heksaklorofenli sabunlarda, iyotlu solüsyonlar içinde bile üreyebilirler, hatta dörtlü amonyum bileşiklerini besin kaynağı olarak kullanabilirler.

Fenoller ve glutaraldehit genellikle *Pseudomonas'* lara etkili olan dezenfektanlardır (Tortora *et al.*1992, Aydın 2001).

Pseudomonas' lar, özellikle de *P. aeruginosa* yaygın olarak kullanılan antimikrobiyel etkenlerin büyük çoğunluğuna dirençlidir. Antibiyotiklere, kimyasal ve fiziksel ajanlara direnç; plazmitler aracılığı ile olur. Örneğin karbenisilin, kloramfenikol, tetrasiklin, sülfonamid, aminoglikozit gibi antibiyotiklere borat, kromat, civa iyonları, tellürit ve UV ışınlarına direnç böyledir (Koçoğlu 1994, Baştürk 2005).

P. aeruginosa bulunduğu her nemli ortamda kolaylıkla üreyebilen, antibiyotiklere ve antiseptiklere oldukça direnç gösteren bir mikroorganizmadır. Bu çoğul dirençten sorumlu en önemli mekanizma antibiyotiğe karşı bakteriyel dış membranda geçirgenlik azalması ve aktif pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılmasıdır. *P. aeruginosa'* da indüklenebilir kromozomal AmpC tipi beta laktamaz mevcuttur. Bu beta laktamazlar penisilin ve sefalosporinlere dirençte önemli rol oynarlar (Baştürk 2005). Ayrıca *P. aeruginosa* tarafından kodlanan porin proteinleri çevre koşullarına göre kanalların daralmasına neden olur. Bu durum antibiyotiklerin geçişini sınırlar ve antibiyotiklere karşı direnci artırmada yardımcı olur (Arda 2006).

Ülkemizde son yıllarda yapılan çok merkezli çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda izole edilen mikroorganizmalar arasında *Pseudomonas'* ların ilk sırayı aldığı öne sürülmüştür. Bu bakteriler, gerekli sterilizasyon ve dezenfeksiyonun yapılamadığı hastane ortamında, ameliyathane ve yoğun bakım ünitelerinde kullanılan araç ve gereçlerde kolonize olarak antibiyotiklere dirençli ciddi hastane enfeksiyonlarına neden olabilirler (Özsoy vd. 2001).

Pseudomonas suşlarının antimikrobiyel ajanlara duyarlılığı üzerine yapılan bir çalışmada; izole edilen *P. aeruginosa* suşlarına karşı Sceptor Pseudomonas/Resistant MIC/ID Panelinde saptanan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda trimet/sulfa 1/19, aztreonam, seftriakson, sefalotin, sefuroksim amoksilin/klavulan, ampisilin, ampisilin/sulbaktam, sefotetan, tetrasiklin, nitrofurantoin, trimetofrin, sulfisoksazol

% 100 oranıyla en dirençli mikrobiyel ajanlar olarak saptanmıştır. Hassasiyet durumları araştırılan diğer mikrobiyel ajanlar ise *P. aeruginosa* suşlarına karşı % 93,50 ile % 9,38 arasında dirençli bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada siprofloksasin % 81,25, imipenem % 86,20, amikasin % 71,88, tikarsilin/klavulan % 68,85 oranıyla en etkili mikrobiyel ajanlar olarak saptanmıştır. Hassasiyet durumları araştırılan diğer mikrobiyel ajanlar ise *P. aeruginosa* suşlarına karşı % 57,81 ile % 6,15 arasında etkili bulunmuştur (Yılmaz 1999).

P. aeruginosa suşlarının Sceptor Pseudomonas/Resistant MIC/ID Panelinde saptanan bazı antibiyotiklere duyarlılık durumları Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Hastanede yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen 94 *P. aeruginosa* suşunun siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, enoksasin ve pefloksasine duyarlılık durumlarının disk difüzyon yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada, siprofloksasin, ofloksasin, norfloksasin, enoksasin ve pefloksasine karşı direnç oranı sırasıyla % 13,8, % 20,2, % 14,9, % 21,2 ve % 39,3 olarak belirlenmiştir. Pefloksasine karşı olan direnç oranı, çalışılan diğer florokinolonlara karşı olan direnç oranlarından anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Pefloksasin dışındaki diğer florokinolonlara karşı olan direnç oranları arasında ise fark bulunmamıştır (Mansuroğlu vd. 1998).

İnsan serumunun antibakteriyel etkinliğini saptamak amacıyla 86 *P. aeruginosa* suşunun insan serumuna duyarlılığı Benge yöntemi ile incelendiği bir çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının 72' si (% 83,7) serum-dirençli, 8' i (% 9,3) serum-orta duyarlı ve 6' sı (% 6,9) ise serum-duyarlı bulunmuştur (Mete vd. 1998).

Tunçbilek vd. (1998), nosokomiyal infeksiyonlardan izole edilen 94 *P. aeruginosa* suşunun bazı antipseudomonal antibiyotiklere duyarlılığını araştırmışlardır. İdentifikasyon klasik bakteriyolojik yöntemlerle yapılmıştır. Tiplendirilemeyen suşlar için Sceptor "Becton and Dickinson" kullanılmıştır. Minimal inhibitör konsantrasyon tayini Mueller Hinton Broth kullanılarak NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) standartlarına uygun olarak yapılmıştır. Ayrıca suşların grup 1 β -

laktamaz aktivitesi disk yakınlaştırma metodu ile test edilmiştir. İmipenem, amikasin, seftazidim, siprofloksasin ve sulperazonun *P. aeruginosa*' ya duyarlılıkları % 91, % 80, % 49, % 76, % 86 şeklinde bulunmuştur. Sonuç olarak; imipenem, amikasin ve sulperazonun nozokomiyal *P. aeruginosa* suşlarına etkinliğinin iyi olduğu gözlenmiştir.

Yapar vd. (1999), çeşitli klinik örneklerden etken olarak izole edilen 150 *P. aeruginosa* suşunun, beta-laktam direncine neden olabilen beta-laktamaz enzim üretimi ile beta-laktam ve diğer antipseudomonal antibiyotiklere karşı direnç durumunu saptamayı amaçlamışlardır. İncelenen 150 *P. aeruginosa* suşunda, % 56 oranında beta-laktamaz üretimi saptanırken, piperasiline % 31, seftazidime % 33, aztreonama % 13, imipeneme % 16, tobramisine % 40, amikasine % 12, ofloksasine % 37 ve siprofloksasine % 35 oranında direnç belirlenmiştir. Sonuç olarak; *P. aeruginosa* suşlarının aminoglikozit, kinolon ve beta-laktam grubu antibiyotiklere önemli derecede dirençli olduğu görülmüştür.

İnan vd. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi' nde hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen 100 *P. aeruginosa* suşunun imipenem, seftazidim, siprofloksasin, gentamisin ve amikasine duyarlılıkları incelenmiştir. E-test yöntemi kullanılarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri araştırılmış ve suşların imipeneme % 26, seftazidime % 34, siprofloksasine % 16, gentamisine % 67 ve amikasine % 12 oranında direnç gösterdiği saptanmıştır.

Klinik örneklerden elde edilen 100 *P. aeruginosa* suşunda, NCCLS önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemi kullanarak, levofloksasin ve diğer kinolon grubu antibakteriyeller olan ofloksasin ve siprofloksasin direncinin karşılaştırmalı olarak araştırıldığı bir çalışmada; kinolonlara karşı direnç oranları, levofloksasin ve ofloksasin için % 36, siprofloksasin için ise % 17 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, hastanede, kinolon grubu antibiyotiklere karşı *P. aeruginosa* suşlarında önemli oranda direnç geliştiğini göstermiştir (Vardar ve Ünlü 2001).

Çizelge 2.1 *P. aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları (Yılmaz 1999)

| | | | Hassasiyet | | Direnç | | Orta derecede hassasiyet | |
|------|----------------------------|----|------------|-------|--------|-------|--------------------------|-------|
| Sayı | Antibiyotik | n | Sayı | % | Sayı | % | Sayı | % |
| 1 | İmipenem | 58 | 50 | 86,20 | 8 | 13,79 | - | - |
| 2 | Siprofloksasin | 64 | 52 | 81,25 | 12 | 18,75 | - | - |
| 3 | Amikasin | 64 | 46 | 71,88 | 6 | 9,39 | 12 | 18,75 |
| 4 | Tikarsilin/klavulonik asit | 61 | 42 | 68,85 | 16 | 26,22 | 3 | 4,91 |
| 5 | Tobramisin | 64 | 37 | 60,34 | 24 | 37,5 | 3 | 4,69 |
| 6 | Tikarsilin | 58 | 35 | 57,81 | 23 | 39,66 | - | - |
| 7 | Seftazidim | 56 | 31 | 55,36 | 20 | 35,71 | 5 | 8,93 |
| 8 | Norfloksasin | 6 | 3 | 50,00 | 3 | 50,00 | - | - |
| 9 | Gentamisin | 64 | 31 | 48,43 | 29 | 45,31 | 4 | 6,25 |
| 10 | Sefoperazom | 55 | 26 | 47,58 | 21 | 38,18 | 8 | 14,54 |
| 11 | Piperasilin | 58 | 4 | 6,90 | 54 | 93,10 | - | - |
| 12 | Sefotaksim | 65 | 4 | 6,15 | 34 | 52,30 | 27 | 41,53 |
| 13 | Trimet/sulfa 1/19 | 65 | - | - | 65 | 100 | - | - |
| 14 | Aztreonam | 58 | - | - | 58 | 100 | - | - |
| 15 | Seftriakson | 55 | - | - | 55 | 100 | - | - |
| 16 | Sefalotin | 36 | - | - | 36 | 100 | - | - |
| 17 | Sefuroksim | 35 | - | - | 35 | 100 | - | - |
| 18 | Amoksilin/klavulant | 35 | - | - | 35 | 100 | - | - |
| 19 | Ampisilin | 33 | - | - | 33 | 100 | - | - |
| 20 | Ampisilin/sulbaktam | 31 | - | - | 31 | 100 | - | - |
| 21 | Sefotetan | 25 | - | - | 25 | 100 | - | - |
| 22 | Tetrasiklin | 13 | - | - | 13 | 100 | - | - |
| 23 | Nitrofurantoin | 6 | - | - | 6 | 100 | - | - |
| 24 | Trimetofrin | 6 | - | - | 6 | 100 | - | - |
| 25 | Sulfisoksazol | 5 | - | - | 5 | 100 | - | - |
| 26 | Seftizoksim | 3 | - | - | 1 | 33,33 | 2 | 66,66 |

n: Testte kullanılan suş sayısı

Özsoy vd. (2001), tarafından yapılan bir çalışmada, antiseptik amaçla kullanılan % 70' lik etil alkol, % 10' luk povidon iyot ve % 10' luk benzalkonyum klorürün 1/100' lük dilüsyonunun çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarına olan etkinliği araştırılmıştır. Dezenfektan etkinliğini belirlemek amacıyla 25' i yoğun bakım kaynaklı ve çoklu antibiyotik direnci gösteren suş olmak üzere toplam 65 *P. aeruginosa* klinik izolatu kullanılmıştır. Yoğun bakım birimi kaynaklı ve çoklu antibiyotik direnci gösteren *P. aeruginosa* suşları grup I, diğer suşlar ise grup II olarak tanımlanmıştır. Kullanılan dezenfektanların beş dakikalık süre içinde *P. aeruginosa* suşlarının tümüne etkin olduğu, grup I ve II arasında antiseptiklere duyarlılık açısından fark bulunmadığı saptanmıştır.

Evans ve arkadaşları 1985 yılında yaptıkları bir çalışmada, açık granülasyonlu yaralarda kullanılan absorbe edici pansumanların in vitro dezenfeksiyonunda klorheksidin, povidon iyot, setrimit ve sodyum hipokloridin *P. aeruginosa'* nın standart suşuna etkinliğini araştırmışlardır. Klorheksidin en etkili ajan olarak bulunurken, setrimit ve povidon iyot etkinliğinin orta derecede olduğu göstermiş, sodyum hipokloridin etkinliğinin ise oldukça az olduğunu belirlemişlerdir (Özsoy vd. 2001).

Oie ve arkadaşları tarafından 1996 yılında Japonya' da yapılan bir çalışmada, benzalkonyum klorürü en fazla kontamine eden mikroorganizmaların *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Pseudomonas fluorescens* olduğu saptanmıştır (Özsoy vd. 2001).

2.1.5. Yaptığı hastalıklar

P. aeruginosa' nın proteolitik enzim, letal ekzotoksin ve enterotoksin özellikli hücre dışı salgılarının olması ve fırsatçı patojen özelliğinin bulunması çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olur. *Pseudomonas'* lar; idrar yolu, göz, dış kulak, orta kulak, yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkopnömoni, septisemi, osteomyelit, psödomembranöz kolit gibi hastalıklardan izole edilebilirler (Frobisher 1968, Tortora *et al.* 1992, <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2004). Son yıllarda *Pseudomonas*

enfeksiyonlarının hastane ortamlarında gittikçe arttığı gözlenmektedir. Bunun nedeni; gittikçe artan oranda dirençli suşların ortaya çıkması ve bakterilerin daha kolay barınabilmesidir (Kılıç vd. 2000).

P. aeruginosa' nın yeni doğan çocukların ölümüyle sonuçlanan epidemik ishale neden olduğu bildirilmiştir. Hastane çevrelerinde özellikle immun sistemi zayıflamış hastalarda ishale neden olarak yaşamı tehdit edebilmektedir.

P. aeruginosa' nın 1946 yılında yapılan bir araştırmaya göre sütle alınması sonucu, akut epidermik gastroenteritidise sebep olduğu bildirilmiş, diyare, kramp, bulantı ve kusma semptomlarıyla seyreden 409 olay görülmüştür. Semptomlarının bebek ve çocuklarda daha şiddetli olduğu ve bebeklerde 9 ölüm meydana geldiği bildirilmiştir. *P. aeruginosa'* nın 10^6 dozunda ağızdan alımının gastroenteritidis sebebi olabileceği ifade edilmiştir (Özan 1996).

2.2. *Pseudomonas'* ların Süt ve Süt Ürünlerinde Neden Olduğu Sorunlar

Çiğ sütlerde psikrotrof bakterilerin bulunması; sütün üretim koşullarına, işlem öncesi depolama zamanına, sıcaklığına ve süt içerisindeki mikroorganizmaların türüne göre değişiklik göstermektedir (Kılıç vd. 2000).

Çiğ süt ve pastörize süt, buzdolabı koşullarında bozulabilmektedir. Bu bozulmanın esas nedenlerinden biri psikrotrof bakterilerdir. Bu bozulmalarda etken olan bakteri düzeyinin belirlenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda, bu düzeyin genel olarak 5×10^6 ile 2×10^7 adet/mL olduğu tespit edilmiştir. Sütte meydana gelen mikrobiyel bozulma, bakteri türüne ve sayısına, lag fazın süresine ve sütün saklama sıcaklığında, bakterinin üreme hızına ve türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Franklin 1970).

Pseudomonas' lar süt ürünlerinde en büyük tehlikeyi oluşturan psikrotrof bakteri türleri olarak bilinmektedir. Özellikle soğukta saklanmış çiğ sütlerden yapılan ürünlerde

rahatlıkla gelişebilmeleri ile pastörize ve sterilize sütlere uygulanan sıcaklık normlarında salgıladıkları ekstraselüler enzimler ve sahip oldukları kapsüller nedeniyle aktivitelerini sürdürebilmeleri bu bakterilerin en önemli özelliğidir (Barry 1979). Çiğ sütlerden ürüne geçen psikrotrofların özellikle de *Pseudomonas* türlerinin sentezledikleri proteaz ve lipazların, UHT sütlerde tam anlamıyla inaktive olmadıkları ve bu enzimlerin aktivitesi sonucunda UHT sütlerde koagülasyon (tatlı pıhtılaşma) meydana geldiği, sütün rengine, kokusunda, yapı ve kıvamında birçok değişiklikler olduğu tespit edilmiştir (Bigalke 1985, Kılıç vd. 2000).

Wiedmann *et al.* (2000), *Pseudomonas'* ların süt ürünlerinde iki şekilde bozulmaya neden olduğunu bildirmiştir. Bunlardan birincisi yukarıda anlatıldığı gibi proteaz ve lipaz gibi ekstraselüler enzimler nedeniyle, ikincisi ise pastrization sonrasında başta *P. aeruginosa* olmak üzere sütün birçok bakteri ile kontaminasyonu nedeniyle, süt ürünlerinin buzdolabı sıcaklığında depolanması sırasında bozulması olarak belirlenmiştir.

Psikrotroflardan *Pseudomonas fragi'* nin tereyağında meyvemsi kokulara ve bozulmaya neden olduğu, *Pseudomonas putrefaciens'* in proteoliz ve çürüme yaptığı, *Pseudomonas nigrificans'* ın tereyağı yüzeyinde siyah renkte koloniler oluşturduğu tespit edilmiştir. Özellikle soğukta muhafaza edilen sütlerden yapılan peynirlerin kalitesinde genelde bir problem görülmemekle birlikte, 10^3 - 10^6 kob/mL düzeyinde psikrotrof içeren sütlerden yapılan Camembert tipi peynirlerde kalite azalışı tespit edilmiş ve bu kalite azalışında özellikle *Pseudomonas* türlerinin etkili olduğu belirlenmiştir (Brandt and Ledford 1982).

Pseudomonas' ların sütün tazeliğini bozması yanında bazen de çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle fırsatçı patojen olarak bilinen *P. aeruginosa'* nın, sütün çok fazla tktildiği 0-3 yaş grubu çocuklarda süt kaplarının temizliğine dikkat edilmediğinde bulaşarak hastalıklara ve salgınlara yol açtığı ifade edilmiştir.

Wiedmann *et al.* (2000), ABD' de üretilen birçok sıvı süt ürününün aseptik koşullarda paketlenmediğini, ısıtma ünitesinden sonra farklı noktalarda bakteri bulaşması ihtimali olduğunu, son prosesteki kontaminasyonu elemine etmek ya da azaltmak için süt ürünlerindeki kontaminasyon kaynağının belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Ayrıca *Pseudomonas*' ların tanımlanması için kullanılan yöntemlerin yetersiz olması nedeniyle patojen olmayan *Pseudomonas*' ların patojenmiş gibi tanımlanabildiği ve bunun sonucunda üreticilerin ürünlerini gereksiz yere geri çağırma ve gereksiz masraflara neden olduğunu bildirmişlerdir.

P. aeruginosa doğada toprak ve suda yaygın olarak bulunan aynı zamanda hayvan derisi üzerinde sıkça rastlanan bir bakteri olduğundan, sütün sağımı sırasında hijyenik koşullara dikkat edilmediği takdirde süte bulaşabilmektedir. *Pseudomonas*' lar süt ekipmanlarında ve hortum uçlarında kolonizasyon yapabilmektedirler. İyot bazlı dezenfektanların düşük seviyelerde kullanılması gibi durumlarda *Pseudomonas*' lar yapışkan bir madde olan glioksal üretirler. Bu madde sayesinde organizma, yüzeye daha iyi tutunarak ekipman yüzeylerinde kolonizasyon oluşturabilmekte ve antimikrobiyel ajanlara, fagositlere ve surfektanlara dirençlerini arttırmaktadır. Sudan ve hortumlardan kontamine olmuş *Pseudomonas*' ların eliminasyonu, bakterinin direnç mekanizmasının güçlü olmasından dolayı oldukça zordur (Metin 2001, Dinsmore *et al.* 2004).

2.3. *Pseudomonas*' lar Tarafından Üretilen Ekstraselüler Enzimler ve Meydana Gelen Değişimler

2.3.1. Proteazlar

Süt ve ürünlerinde *Pseudomonas*' ların neden olduğu değişikliklerden bir tanesi proteolizdir. Bu değişiklik, enzimlerin etkisi ile süt proteinlerinin parçalanarak orijinal formlarını kaybetmesi ya da yapısal özelliğini yitirmesi olarak özetlenebilir.

Pseudomonas spp., özellikle de *Pseudomonas fluorescens* süttten izole edilen ve proteolitik aktivite gösteren psikrotrof bakteriler arasında en yaygın olanıdır.

Psikrotrofların UHT sütlerdeki proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda, söz konusu üründe β -kazein ile K-kazeinin geniş ölçüde degrade oldukları, α_{s1} -kazeinde gözlenen kayıpların düşük seviye olduğu belirlenmiştir. Peyniraltı suyu proteinlerinde ise meydana gelen kayıpların önemli olmadığı ifade edilmiştir. UHT sütlerde yapılan bir araştırmada *Pseudomonas* ve *Bacillus* proteazlarının UHT sütleri pıhtılaştırdığı bildirilmiştir.

Psikrotrofların en önemlisi olan *Pseudomonas*' lara ait proteazların, kazeini parçalağığı tespit edilmiş bu amaçla 9 adet çiğ süt örneği incelenmiştir. Söz konusu araştırmada; *Pseudomonas* popülasyonunun sayısının 10^4 kob/mL düzeyine ulaşması ile K-kazein parçalanmasının gerçekleştiği tespit edilmiştir (Kılıç vd. 2000).

Collins (1979), Cheddar ve Cottage peynirlerinde tespit edilen ve psikrotrof proteazlara bağlı olarak ortaya çıkan sorunların en çok *Pseudomonas fluorescens* P26 suşu ile ilişkili olduğunu, bu ilişkinin neticesinde ürünlerin kalitelerinin düştüğünü ve proteoliz değerlerinde artış olduğunu belirlemiştir.

Pseudomonas spp. MC60 suşuna ait proteazın ısıl işlemlere olan dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla yapılan araştırma sonucunda söz konusu suşa ait bu enzimin ısıya olan direncinin *Bacillus stearothermophilus* sporlarından 4000 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Kılıç vd. 2000).

2.3.2. Lipazlar

Süt ve ürünlerinde *Pseudomonas*' lar tarafından meydana gelen ikinci önemli yapısal değişiklik lipolizdir. Lipoliz kısaca trigliseritlerin lipaz enzimi etkisi ile parçalanarak yağ asitleri ve gliserine ayrılması olarak özetlenebilir. Çiğ sütlerden izole edilen lipolitik bakterilerin identifikasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, bu enzimin en yüksek aktivitesinin tıpkı proteazlarda olduğu gibi *Pseudomonas* türlerinde olduğu belirlenmiştir (Collins 1979).

Collins (1979), sütteki *Pseudomonas* lipazının yaklaşık olarak % 80' inin kremaya geçtiğini daha sonra da tereyağında yoğunlaştığını belirlemiş ve sonuçta tereyağında iki gün içerisinde acılaşıma ortaya çıktığını saptamıştır. Ayrıca tereyağı üzerinde tespit edilen lekelerin de özellikle *Pseudomonas* suşları ile direkt ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Lipolitik özellikteki psikrotroflar ile aşılınmış sütlerden yapılan peynirlerde, serbest yağ asidi konsantrasyonlarının oldukça yüksek seviyede olduğu belirlenmiş ve bunun ısıya dayanıklı lipolitik enzimler ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. İsviçre peynirleri üzerinde yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas fragi*' nin peynirlerdeki varlığı tespit edilmiş ve bunun neticesinde, peynirlerde önemli düzeyde tat bozukluklarının meydana geldiği belirlenmiştir. Depolanmış çiğ süttten yapılan Cottage peynirlerinde de söz konusu acılık tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada, Cheddar peyniri yapımında kullanılan çiğ sütte, 10^7 kob/mL' den daha yüksek oranda lipolitik psikrotrof bulunması nedeniyle acılaşıma meydana geldiği ve bu durumun 4 aylık bir depolamadan sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, *Pseudomonas fluorescens* AR11 suşu ile benzer bir çalışma gerçekleştirmiş ve 2 aydan daha uzun süre depolanmış çiğ sütlerde acılık belirlemişlerdir (Richardson and Tewhaiti 1978).

Psikrotroflara ait lipazların ısı dirençliliklerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda bu enzimlerin ısıya dayanıklılık gösteren ekstraselüler enzimler sınıfına dahil oldukları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda birçok psikrotrof lipazın yüksek sıcaklıkta kısa süreli pastörizasyon sonrasında ($72\text{ }^{\circ}\text{C} / 17$ saniye) canlı kalabildikleri ve lipazların da proteazlar gibi sütteki sulu tampon çözeltilerde daha fazla sıcaklığa dayandıkları tespit edilmiştir (Collins 1979).

Süt ürünlerinde psikrotrof bakterilerin kontaminasyonunun engellenmesinde üzerinde durulacak ilk konu alet-ekipman temizliğidir. Bu temizlik çiftlikten itibaren başlamalı ve alet-ekipmanlar buhar sterilizasyonu, sıcak hipoklorit solüsyonları ile dezenfekte edilmelidir. Bu tip uygulamalar ile Gram negatif bakterilerin kontrolü gerçekleştirilebilmektedir. Süt ve ürünlerinde olabilecek psikrotrof bakteri konsantrasyonunu azaltmada yararlanılan bir başka etken, sütün doğal koruma sistemi

olan laktoperoksidaz sistemdir. Sütte doğal olarak bulunan laktoperoksidaz ve tiyosiyanat, sütte doğal olarak bulunmayan ancak yapay olarak eklenen veya katalaz negatif bakteriler tarafından üretilen H₂O₂ ile birleştiğinde antimikrobiyel bir sistem oluşturmaktadır. Bu sistem özellikle streptokoklar ve Gram negatif bakteriler özellikle de *Pseudomonas* 'lar üzerine inhibe edici bir etki yaratmaktadır. Ancak bu sistemden tam anlamıyla yararlanabilmek için, optimum sıcaklık uygulanması gerekmektedir. Bu amaçla bazı araştırmacıların laktik asit kültürlerini ve laktobasil suşlarını dondurulmuş sütlerdeki psikrotrof gelişimi durdurmak için ilave ettikleri görülmektedir (Barry 1979). Bir araştırmada inek sütüne 0,25 mM tiyosiyanat ve eşdeğer miktarda H₂O₂ ilave edildiğinde çiğ sütün raf ömrünün 48 saatten 5 güne uzadığı belirlenmiştir (Ayhan 2000). Gerek *L. bulgaricus* gerekse diğer laktik asit bakterilerinin katalaz enzimi oluşturmadığı için, gelişim esnasında meydana getirdikleri H₂O₂' in de *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* spp. gibi patojen ve kontaminant bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğu ileri sürülmektedir (Aslım 2000).

2.4. *Pseudomonas aeruginosa* Sayımına Yönelik Yapılan Çalışmalar ve Kullanılan Besiyerleri

Pseudomonas' ların gıdalarda bozulmalara neden olması ve patojen türlerinin bulunması; çabuk sonuçlandırılabilen ve kolay uygulanabilecek izolasyon ve sayım yöntemlerinin tam olarak ortaya konulamaması ve yetersiz olmasından dolayı çok sayıda kuruluş tarafından *Pseudomonas*' ların izolasyon ve sayımına yönelik araştırmalara ağırlık verilmiştir.

King ve arkadaşları 1954 yılında yaptıkları bir çalışmada, *P. aeruginosa*' nın piyosiyanın üretimini arttırıcı King A ve piyoverdin üretimini arttırıcı King B besiyerlerini geliştirmişlerdir (Brown and Lowbury 1965).

Lowbury ve Collins 1955 yılında yaptıkları bir araştırmada, % 0,03 setrimit içeren Lemco Agar besiyerinin *P. aeruginosa*' nın selektif izolasyonunda kullanılabileceğini işaret etmişlerdir (Brown and Lowbury 1965).

Masurovsky *et al.* (1963), *Pseudomonas*' ların ayırımı ve sayımı için L-arjinin, yeast extract ve ion agar bileşenlerini içeren temel besiyeri içine eritromisin ve kloramfenikol ilave ederek yeni bir besiyeri tanımlamıştır (MAS Agar). Ancak besiyerine ilave edilen antibiyotiklerin membran filtrasyonda sterilize edilmesinden dolayı besiyeri hazırlama işleminin çok uzun sürdüğü, besiyeri solüsyonunun soğutulduğu zaman bileşenlerin çökme eğiliminde olduğu ve bu çökeltiden dolayı inkübasyonun 72. saatinde kolonilerin tanımlanamadığı bildirilmiştir.

Collins, 1964 yılında yaptığı çalışma sonucunda, gelişmiş bir ortama olan ihtiyaçtan dolayı % 1 setrimit içeren Nutrient Agar besiyerinin *Pseudomonas*' ların izolasyonunda selektif besiyeri olarak kullanılabileceğini önermiştir. Bu çalışma sonucunda setrimitin *P. aeruginosa*' nın selektif izolasyonunu ve pigment oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (Solberg *et al.* 1972).

Brown ve Lowbury (1965), % 0,03 setrimit içeren Lemco Agar (CTA1) ve King B Agar (CTA2) besiyerlerini karşılaştırmışlardır. Piyosyanin üretiminin CTA1' de CTA2' den daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir.

Goto ve Enomoto 1970 yılında yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas* bazal besiyerine 15 µg/mL nalidiksik asit ilavesiyle ve aynı zamanda setrimit miktarının 200 µg' a düşürülmesiyle *Pseudomonas* CN besiyerini geliştirmişlerdir ve besiyerinin performansının arttığını göstermişlerdir. Bu besiyerinin pigment oluşumunu desteklediğini, *Klebsiella*, *Proteus* ve *Providencia* gibi bakterilerin gelişimini baskıladığını bildirmişlerdir (<http://www.oxid.com>, 2004).

Floresan veren *Pseudomonas*' ların izolasyonu ile ilgili çalışmalarda genellikle King ve arkadaşları tarafından hazırlanan King B ortamı kullanılmaktadır. Bu ortamda piyoverdin oluşumu belirginleşir ve UV ışığı altında yayılan pigment oluşumu ile karakterize edilir (Jeppesen 1995). Sands ve Rovira (1970) tarafından King B ortamına penisilin G (75 IU/mL), novobiyosin (45 µg/mL) ve siklohegzimit (75 µg/mL)

ilavesiyle oluşan yarı seçici katı ortamlar önerilmiştir. Bu antibiyotiklerin floresan veren *Pseudomonas*' ların gelişimini engellemedikleri belirtilmiştir.

Rose *et al.* (1971), diamitin *Enterobacter*' lerin gelişimi üzerine etkisini ve *Pseudomonas*' ların izolasyonu için selektif bir ajan olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Diamitin *E. coli*, *Proteus* spp. ve *Salmonella enteritidis*' in saf kültürleri için bakterisidal etki gösterirken, *P. aeruginosa*' nın gelişiminde sadece 1-2 saatlik bir gecikme yaptığı ifade edilmiştir. Çalışmada *E. coli*, *Proteus* spp., *Salmonella enteritidis* ve *P. aeruginosa* içeren karışımdan 0,1 mL alınarak Selenit Sistin Broth, Tetrionate Broth ve % 0,05 diamit içeren Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerinden her birine inoküle edilmiş ve kültürler 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda gelişen mikroorganizmaların identifikasyonu yapılmış ve her bir örnek için Selenit Sistin ve Tetrionate Broth besiyerinde mikroorganizmaların beklenen selektif gelişimi gözlenirken diamit içeren TSB besiyerinde sadece *P. aeruginosa*' nın gelişimi gözlenmiştir. Aynı karışımın % 0,05 diamit içeren Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine sürme yöntemiyle ekimi yapılmış ve yine sadece *P. aeruginosa*' nın geliştiği tespit edilmiştir.

Aynı araştırmada Eosin Methylene Blue Agar ve % 0,05 diamit içeren TSA besiyerine 32 adet klinik *Pseudomonas* spp. inoküle edilmiştir. Örneklerden 29 tanesinin her iki besiyerinde geliştiği, bir tanesinin hiçbirinde gelişmediği ve iki tanesinin de diamit içeren TSA besiyerinde gelişmezken Eosin Methylene Blue Agar besiyerinde geliştiği belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak diamit içeren TSA besiyerinin *Pseudomonas*' ların izolasyonunda etkili olduğu ifade edilmiştir.

Solberg *et al.* (1972) çalışmalarında Tryptic Soy Agar içerisine 200 ppm 2-hidroksi-2',4,4'-triklor-difenil oksit (CH3565) ve 10 ppm setil-trimetil-amonyum bromit (setrimit) ilave ederek yeni bir besiyeri olan CETCH Agar besiyerini geliştirmişlerdir. Bu yeni besiyerini 19 saf *Pseudomonas* kültürü ve 20 farklı çeşit mikroorganizma üzerinde test etmişler ve sonuç olarak CETCH Agar besiyerinin *Pseudomonas*' ları geri

almada % 40–100 oranında başarılı olduğunu, besiyeri hazırlık aşamasının kolay olduğunu ve inkübasyon süresinin kısa sürdüğünü tespit etmişlerdir.

Mead ve Adams 1977 yılında yaptıkları bir çalışmada, ALCV (asetamit, laktoz, kristal viyole), MGV (malaşit yeşili, vankomisin), diamit içeren Heart Infusion Agar ve CETCH (setrimit, sefaloridin) ortamlarının hangisinin seçici olduğunu araştırmışlar ve sonuçta ALCV, MGV ve CETCH ortamlarının her üçünün de aşıl原因an 12 saf *Pseudomonas* spp. kültürünü tavuklardan geri almada eşit ölçüde başarılı olduğunu saptamışlardır. Bu besiyerleri Gram pozitif bakterileri baskılamakta ancak istenmeyen Gram negatif bakterileri baskılamadaki yetenekleri farklılık göstermektedir. ALCV besiyerinde çoğu Gram negatif bakterinin geliştiği, MGV besiyerinde *Serratia liquefaciens*, CETCH besiyerinde ise *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas* spp. ve *Serratia liquefaciens* 'in geliştiği belirtilmiştir. Heart Infusion Agar ise mayaların gelişimini desteklemesi ve pigment oluşturmeyen *Pseudomonas* spp. kolonilerini inhibe etmesinden dolayı en az başarılı olarak değerlendirilmiştir.

Mead ve Adams, Heart Infusion Agar besiyerine seçici ajan olarak sefaloridin (50 µg/mL), fusidin (10 µg/mL) ve setrimit (10 µg/mL) ilavesiyle hem pigmentli hem de pigmentsiz *Pseudomonas* spp. kolonilerinin sayımına olanak sağlayan yeni bir besiyeri (CFC) geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu besiyerinin *Pseudomonas* ların gelişimini etkilemediği, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerinin ise gelişimini baskıladığı sonucuna varılmıştır (Jeppesen 1995).

Kristiansen (1983), çiğ sütlerde yaptığı çalışmada *Pseudomonas* CN (setrimit, nalidiksik asit) ve *Pseudomonas* CFC (setrimit, fusidin, sefaloridin) besiyerini kullanmıştır. Çiğ süt örneklerine bu besiyerlerinde 25–30 °C' de 24 saat inkübasyon uygulanmıştır. *Pseudomonas* CN ve *Pseudomonas* CFC besiyerinde *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepecia* 'nın üreme gösterdiği saptanmıştır.

Mead (1985), CFC besiyerinin çeşitli gıda kaynaklarından *Pseudomonas* spp. sayımında kullanılabilceğini işaret etmiştir. Bu besiyeri ile hemen hemen istenmeyen tüm

mikroorganizmaların baskılanmasını hedeflemiştir. Besiyerini 25 °C' de 48 saat inkübe etmiştir ve inkübasyon sonunda Petri kutularında 2–5 mm çapında, pigmentli ve pigmentsiz koloniler oluşmuştur. Bu çalışmada doğrulama testlerine gerek duyulmamıştır ancak şüpheli durumlarda *Pseudomonas* spp.' yi *S. liquefaciens* ve mayalar gibi diğer mikroorganizmalardan ayırmak için oksidaz testi yapılmıştır.

Baird ve arkadaşları 1985 yılında yaptıkları çalışma sonucunda, özellikle mikroorganizma sayısının düşük olduğu durumlarda *Pseudomonas* spp. için hiçbir besiyerinin yeterince selektif olmadığı bildirmişlerdir. Bununla birlikte CFC besiyerinin gıdalardan *Pseudomonas* spp. izolasyonunda kullanılabileceğini tavsiye etmişlerdir (Jeppesen 1995).

Mickova *et al.* (1989) tarafından bir yıl boyunca toplanan 203 çiğ süt ve 50 pastörize süt örneğinde *Pseudomonas*' ların izolasyonunda malaşit yeşili ihtiva eden Pepton Broth, *Pseudomonas* F Agar ve Cetrimide Agar kullanılmıştır. Toplanan 203 çiğ süt örneğinden 18 tane *P. aeruginosa* suşu, 50 pastörize süt örneğinden ise 2 adet *P. aeruginosa* suşu elde edilmiştir. Çalışmada izolatlardan sadece 5 tanesi lipaz üretirken, tamamının proteaz ürettiği belirlenmiştir.

Stanbridge ve Board 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada, *Pseudomonas* CFC Agar besiyerinde *Pseudomonas*' ları enterobakterlerden ayırabilmek için modifikasyon yapmışlardır. *Pseudomonas* CFC Agar besiyerine % 1 oranında arjinin ve % 0,002 oranında fenol red ilave etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından *Pseudomonas*' ların arjininden amonyak oluşturması sonucu pembe renkli kolonilerin oluştuğu ve bu şekilde kolonilerin ayırt edilebildiği ifade edilmiştir (<http://www.oxid.com>, 2004).

Macaristan'da tanklardan toplanan soğutulmuş çiğ süt örneklerinde *Pseudomonas* türleri araştırılmıştır. Bu çalışmada Z Broth, Nitrofurantoin Broth ve Cetrimide Agar besiyerlerindeki üreme durumları değerlendirilmiştir. Z Broth ve Nitrofurantoin Broth besiyerinde *P. aeruginosa*' nın ürediği, *P. putrefaciens*, *P. putida* *P. cepacia*, *P.*

acidovorans, *P. testosteroni*, *P. maltophilia* ve *P. diminuta*'nın üreme göstermediği saptanmıştır (Szita 1998a).

Aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada *P. aeruginosa*'nın selektif izolasyonu için hem sıvı (Z-Broth) hem de katı (Z-Agar) besiyeri geliştirilmiştir. Çalışmada Z Broth ile Nitrofurantoin Broth ve Z Agar ile Ceftrime Agarı besiyerlerindeki üreme durumları karşılaştırılmıştır. Hazırlanan bu ortamlara engelleyici bir madde ilave edilmemiştir. Ortama katılan asetamitin, nitrojen ve karbon kaynakları sayesinde asetik asit ve amonyağa metabolize olduğu saptanmıştır. Asetamit *Pseudomonas*'ın diğer türlerinden *P. cepacia*, *P. acidovaranc*, *P. putida* tarafından metabolize edilebilse de bu türlerin nitratı indirgeme yetenekleri yoktur. Z Broth' un seçiciliğini test etmek için *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gruplarına ait saf kültürlerin inoküle edildiği bu ortam farklı sayılardaki *Pseudomonas aeruginosa* ile inoküle edilen iki süt örneği ile karşılaştırılmıştır. Birinci örneğin 10^3 kob/ml *P. aeruginosa*, ikinci örneğin ise 10^5 kob/ml *P. aeruginosa* içerdiği bildirilmiştir. İkinci örnekle yapılan test sonucuna göre Z Agar ve Ceftrime Agarı arasında önemli bir mikrobiyolojik ayırım bulunmazken birinci örnekte Z Agar besiyerinin önemli bir ayrıcalık gösterdiği bulunmuştur. Z Broth ve Nitrofurantoin Broth birlikte kıyaslandığında ise iki ortamın da *P. aeruginosa*'nın gelişimine izin verdiği, diğer *Pseudomonas* türlerinin ise gelişimine izin vermediği tespit edilmiştir (Szita 1998b).

Pseudomonas F Agar ve *Pseudomonas* P Agar, King ve arkadaşları tarafından 1954 yılında geliştirilen *Pseudomonas*'ların ayırımında pigment oluşumundan yararlanan King A ve King B besiyerlerinin modifikasyonlarıdır. *Pseudomonas* F Agar içerisinde yer alan kazein peptonu, *Pseudomonas*'ların floresin üretimine neden olur. Bu peptonlar, floresin üretiminde teşvik edici fosforları içerirler. Dipotasyum fosfat, besiyeri içerisindeki fosfor içeriğini artırırken, magnezyum sülfat, floresin üretimi için gerekli olan iyonları sağlar. *Pseudomonas* P agar içerisinde yer alan jelatin peptonu aminoasit ve diğer esansiyel azot kaynaklarını oluşturur. Jelatin peptonu fosfor açısından zayıftır buna karşılık besiyeri içerisinde piyosiyanın üretimini arttırıcı Mg^{++} , K^+ ve SO_4^{-2} iyonları bulunur. (Anonymous 1998). *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* P Agar besiyerinde, piyosiyanın üretimine bağlı olarak koloni etrafında mavi-yeşil zon ya da

piyorubin üretimine bağlı olarak kırmızı-kahverengi zon oluşturarak, *Pseudomonas* F Agar besiyerinde ise floresin üretimine bağlı olarak koloni etrafında sarı-yeşil zon oluşturarak gelişir (Anonymous 2006).

Levin ve Cabelli (1972) *P. aeruginosa* için selektif membran filtrasyon agar olan M-PA Agar besiyerini tasarlamışlardır. Besiyeri formülasyonuna kanamisin, nalidiksik asit, sulfapiridin ve siklohegzimit ilave edilerek daha selektif bir besiyeri elde edilmiştir. Bu orijinal formülasyonda yer alan bileşiklerin konsantrasyonları ya da bileşimleri değiştirilerek modifiye bir besiyeri olan M-*Pseudomonas aeruginosa*-B Agar geliştirilmiştir. Daha sonra Brodsky ve Ciebin 1978 yılında bu besiyerinden sulfapiridin ve siklohegzimit antibiyotiklerini çıkartarak M-*Pseudomonas aeruginosa*-C Agar besiyerini geliştirmişlerdir (Anonymous 1998).

P. aeruginosa klorlamadan zarar görmektedir. Bu nedenle yüzme havuzu sularında *P. aeruginosa* izolasyonunda Arginine Brilliant-green Glucose Peptone Broth (ABGP) besiyeri geliştirilmiştir. Bu ortamda arjinin bulunmaktadır ve *P. aeruginosa*'nın etkisiyle ortamın rengi gri-yeşilden mavi-menekşeye dönüşmektedir. Ortamda indikatör boya olarak bromtimol mavisi ve krezol kırmızısı kullanılmıştır. Bu yöntemde ya membran filtrasyon tekniği ya da direkt sıvı zenginleştirme tekniği kullanılmıştır. 37 °C'de 48 saat inkübasyonun ortamın rengindeki değişimi görmek için yeterli olduğu saptanmış, daha uzun sürelerde inkübasyonun yanlış sonuca götürdüğü görülmüştür (Keskin ve Ekmekçi 2003, Anonymous 2006).

Bharath *et al.* (2002) *P. aeruginosa* 'nın sulardan izolasyonunda ve sayımında MacConkey Agar kullanmışlardır.

P. aeruginosa izolasyonunda çoğunlukla kullanılan ortamlar Çizelge 2.2' de verilmiştir (Atlas 1997, Keskin ve Ekmekçi 2003, Anonymous 2006).

Çizelge 2.2 *Pseudomonas* spp. izolasyonunda çoğunlukla kullanılan ortamlar (Atlas 1997, Keskin ve Ekmekçi 2003, Anonymous 2006)

| Besiyeri adı | Mekanizması | Etkili maddeler | Hedef bakteri |
|---|---|---|--|
| Pseudomonas A (King A) | Mavi renkli piyosyanin oluşumu, | | <i>P. aeruginosa</i> |
| Pseudomonas B (King B) | Sarı renkli floresin oluşumu, | | <i>P. aeruginosa</i> |
| Pseudomonas F Agar (Flo Agar) | Kazein ve fosforlar kullanımı ile floresin üretiminin artırılması, | Kazein peptonu, Fosfor, MgSO ₄ , Gliserol | <i>P. aeruginosa</i> |
| Pseudomonas P Agar (Tech Agar) | Mg ⁺⁺ ve gliserolün piyosyanin pigment oluşumunu kuvvetlendirmesi, | Jelatin peptonu, Mg ⁺⁺ , K ⁺ , SO ₄ ⁺⁺ , Gliserol | <i>P. aeruginosa</i> |
| Cetrimide Agar | Dörtlü amonyum bileşiği tarafından diğer türlerin inhibe edilmesi, | Setil-trimetil-amonyum bromit | <i>P. aeruginosa</i> |
| Pseudomonas CN Agar | Setrimitin deaminasyonu ile NH ₄ oluşumu, | Setrimit (0,1 g/L) Nalidiksik asit (7,5 g/L) | <i>P. aeruginosa</i> |
| Pseudomonas CFC Agar | | Setrimit (0,01 g/L) Sefaloridin (0,05 g/L) Fusidin (0,01 g/L) | <i>P. aeruginosa</i> |
| Asetamid Agar | Asetamitin deaminasyonu ile NH ₄ oluşumu, | Asetamid | <i>P. aeruginosa</i> |
| Asparajin Broth | Büyüme destekleyici olarak asparajin kullanımı, | Asparajin | <i>P. aeruginosa</i> |
| Arginine Brilliant-green Glucose Pepton Broth | | | Yüzme havuzu sularında <i>P. aeruginosa</i> izolasyonu |
| MacConkey Agar | | | Sulardan <i>P. aeruginosa</i> izolasyonu |
| GSP Agar | | Glutamat Nişasta | <i>Pseudomonas</i> , <i>Aeromonas</i> |
| Malachite-green Broth | Boya tarafından diğer türlerin inhibisyonu, | Malaşit yeşili (0,01 g/L) | Çeşitli sulardan <i>P. aeruginosa</i> analizi |
| m- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Agar m-PA-B m-PA-C | Lisin deaminasyonu, sitrat ve ksilozun kullanımı, | Kanamisin (0,176 g/L), Siklohegzimit (0,15 g/L), Nalidiksik asit (0,037 g/L), Sulfapiridin (8,5 g/L) | Membran filtrasyon yöntemiyle sulardan <i>P. aeruginosa</i> izolasyonu ve sayımı |
| Pseudomonas İzolasyon Agar | | Irgasan (triklosan) (0,025 g/L) | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| C-390 Agar | <i>P. aeruginosa</i> olmayanların antimikrobikler ile inhibe edilmesi, | c-390 antimikrobiyel | <i>P. aeruginosa</i> |
| Skim milk Agar | Proteinlerin deaminasyonu, | Ortamda hiçbir madde yok. 2 °C'de inkübasyon | <i>P. aeruginosa</i> |
| Pseudomonas Denitrification Medium | Denitrifikasyon sırasında piyosyanin ve diğer floresan pigmentlerin üretilmesi, | FeCl ₃ solusyonu | <i>Pseudomonas</i> spp. |
| Pseudomonas ATCC 59 | | Pirrolidin (4 ml/L) | <i>P. fluorescens</i> |
| Pseudomonas ATCC 179 | | Süksinik asit (11,8 g/L) | <i>P. lemoinei</i> , <i>P. putida</i> |
| Pseudomonas ATCC 226 | | Sodyum asetat (0,5 g/L) | <i>P. indigofera</i> |
| Pseudomonas ATCC 609 | | Nitrilo-triasetik asit (1.91 g/L) | <i>Pseudomonas</i> spp. |

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Denemelerde şahit bakteri olarak kullanılan *P. aeruginosa*, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen RSK 95107 numaralı bakteridir. Bunun dışında, çalışma sürecinde izole edilip tanımlanan bakteriler de materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Süt

Denemelerde kullanılan çiğ süt örnekleri, Atatürk Orman Çiftliği Süt ve Mamulleri Fabrikası'ndan, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü' ne ait süt işletmesinden ve Ankara ili ve çevre ilçelerdeki sokak sütçülerinden temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyeri modifikasyonu denemelerinde kullanılan materyal

Besiyeri modifikasyonu denemelerinde, penisilin G potasyum (PGP) ve ampisilin ile ticari adı Zefiran olan benzalkonyum klorür (BC) dezenfektan maddesi kullanılmıştır.

Denemelerde kullanılan PGP ve ampisilin enjekte edilebilir antibiyotiklerdir ve eczanelerden temin edilmişlerdir. PGP için, her bir flakon 500.000 IU kristalize PGP (tamponlu-0.84 mEq potasyum), ampisilin için her bir flakon 500 mg ampisilin içermektedir.

Antibiyotikler, denemelerde belirlenen oranlarda, steril % 0,9' luk NaCl çözeltisi kullanılarak hazırlanmışlardır.

3.2. Yöntem

Çalışma 3 aşamada gerçekleştirilmiş ve tüm denemeler 2 paralel olarak yapılmıştır. Bu aşamalar;

-*P. aeruginosa* için selektif olan GSP Agar (Merck) ve Ceftrimide Agar (Merck) besiyerlerinde *P. aeruginosa*'nın dışında gelişim gösteren refakatçi floranın izolasyonu ve tanımlanması,

-Belirlenen refakatçi floranın inhibisyonu için çeşitli antibiyotikler ve dezenfektanlar kullanılarak besiyeri modifikasyonlarının yapılması,

-Elde edilen bulguların piyasa araştırması yapılarak doğrulanması şeklindedir.

Refakatçi floranın belirlenmesinde ve besiyeri modifikasyonlarında kullanılan GSP Agar besiyerinin özellikleri şu şekildedir;

Pseudomonas ve *Aeromonas*'ların analizinde kullanılan bu besiyeri Glutamate Starch Phenol Red olarak da adlandırılır. Bileşimi; Sodyum L(+) glutamat (10,0 g/L), eriyebilir nişasta (20,0 g/L), KH₂PO₄ (2,0 g/L), MgSO₄ (0,5 g/L), fenol red (0,36 g/L), agar (12,0 g/L) şeklindedir. Dehidre besiyeri 45 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile suda ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121 °C' de 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası 50 °C' ye soğutulup 100.000 IU/L penisilin G ve gerekir ise 0,01 g/L pimarisin ilave edilir (besiyeri selektivitesini artırmak için), karıştırılır ve Petri kutularına dökülür. Bileşimdeki glutamat ve nişasta yegane besin maddeleri olup, pek çok refakatçi flora bu maddelerini besin olarak kullanamaz. Nişasta, *Aeromonas*'lar tarafından asit oluşturularak parçalanır ve bileşimindeki indikatör nedeni ile koloni rengi sarı olur. *Pseudomonas*'lar ise kırmızı renkli koloni oluşturur. 28 °C' de 3 gün yapılan inkübasyon sonunda oluşan 2–3 mm çaplı sarı renkli ve etrafı sarı zonlu koloniler *Aeromonas*, yine 2–3 mm çaplı kırmızı ve etrafı kırmızı zonlu koloniler *Pseudomonas*

olarak değerlendirilir. Genellikle küçük ve mukoid görünümlü koloniler ise *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteriler olarak değerlendirilir (Anonymous 2006).

Yöntemin ilk aşamasındaki amaç, çiğ süttten gelebilecek refakatçi florayı belirlemek olduğundan bu aşamada GSP Agar besiyerine, bileşiminde yer alan penisilin G selektif katkısı, refakatçi floranın gelişimini baskılayabileceği düşünüldüğünden ilave edilmemiştir. Tüm çalışma boyunca GSP Agar besiyeri bu şekilde kullanılmıştır.

3.2.1. Çiğ süttten gelen refakatçi floranın izolasyonu

Laboratuvara getirilen 24 farklı çiğ süt örneğinin 10^{-6} ya kadar seyreltileri yapılmıştır. Seyreltme işlemi 1:9 oranına göre 1 mL besiyeri + 9 mL seyreltme çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır (Halkman ve Ayhan 2000). Seyreltme çözeltisi olarak Maximum Recovery Diluent (MRD; Merck) besiyeri kullanılmıştır. Çiğ süt örneklerinden hazırlanan 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} seyreltilerinden 0,1 mL alınarak GSP Agar besiyerine aktarılmış, yayma yöntemi (Halkman ve Ayhan 2000) ile ekimleri yapıldıktan sonra Petri kutuları 28 °C' de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen değişik tipteki koloniler izole edilmiş ve tanımlama testlerine geçilmiştir. Elde edilen saf izolatlar daha sonra kullanılmak üzere % 20 oranında gliserol ilave edilen Tryptic Soy Broth (TSB; Merck) besiyerinde stoğa alınmış ve -18 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Çiğ süttten gelen refakatçi floranın tanımlanması

Elde edilen saf kültürlerin Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Anonymous 1994), Farbatlas zur Diagnose Bakterieller Infektionserreger der Tierre (Bisping and Amtsberg 1998) adlı kaynaklarda gösterilen morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak tanımlamaları yapılmıştır. Tanımlama için öncelikle izolatın Gram reaksiyonuna ve mikroskopik görüntüsüne bakılmıştır. Bu testlere ilaveten, oksidaz, katalaz, hareket, oksidasyon/fermentasyon (O/F), Metil Red (MR), Voges Proskauer (VP), indol, nitratın indirgenmesi, sitrat kullanımı, lisin ve ornitin dekarboksilaz,

hidrojen sülfür, üre, Triple Sugar Iron (TSI) Agar' da gelişim, glikoz, laktoz ve sakkarozdan asit oluşumu testleri yapılmıştır.

Tanı testlerinde aynı sonuçları veren izolatlar gruplandırılmış ve sonuçta refakatçi florayı temsilen 7 farklı cinste bakteri elde edilmiştir.

3.2.3. Besiyeri modifikasyonu denemeleri

GSP Agar besiyerine selektif katkı olarak ilave edilen PGP' nin Gram negatif bakterilerden oluşan refakatçi flora üzerine inhibisyon etkisi olup olmadığı, inhibisyon etkisi varsa bu etkinin ne derecede olduğunu belirlemek amacıyla besiyeri modifikasyonu çalışmasında ilk olarak PGP kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, PGP' nin refakatçi floraya inhibisyon etkisinin yetersiz olması nedeniyle, GSP Agar besiyerine refakatçi florayı baskılamak amacı ile ampicilin ve BC gibi başka inhibitör maddeler katılması düşünülmüştür.

3.2.3.1. Antibiyotik kullanımının refakatçi flora ve *P. aeruginosa* üzerine etkisi

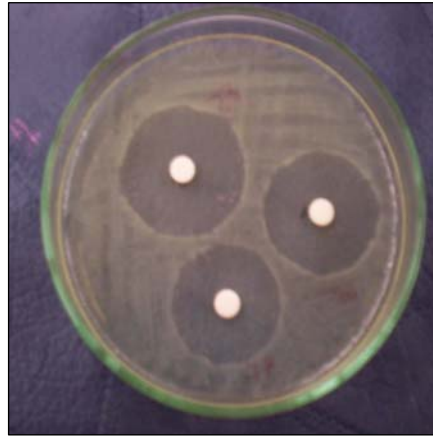
Refakatçi floranın ve *P. aeruginosa*' nın PGP ve ampisiline dirençli olup olmadığını belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyogram testi yapılmıştır (Baştürk 2005).

Antibiyogram testinde kullanılan antibiyotik miktarları, PGP için disk içeriği 625 IU, 1250 IU, 1875 IU ve 2500 IU, ampicilin için 10 µg, 20 µg, 30 µg olacak şekilde belirlenmiştir.

Disk difüzyon yöntemi şu şekilde uygulanmıştır;

Steril, tek kullanımlık, 90 mm çaplı Petri kutularına 4 mm yükseklikte besiyeri olacak şekilde Nutrient Agar dökülmüştür. Kullanıma kadar buzdolabında bekletilmiştir. TSB'

de 18 saatlik aktif kültür halinde bulunan bakteri süspansiyonu, steril eküvyon çubuk aracılığı ile besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. Üretici firmadan (Oxoid) sağlanan standart antibiyotik diskleri bir Petri kutusuna kenardan 15 mm, birbirinden 25–30 mm uzaklıkta olacak şekilde, PGP için bir Petri kutusunda 4 kağıt disk, ampisilin için 3 kağıt disk yerleştirilmiştir. Yukarıda belirtilen miktarlarda PGP ve ampisilin kağıt diskler üzerine damlatmak suretiyle emdirilmiştir. 37 °C' de 18–24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek duyarlılık ve dirençlilik değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1 Disk difüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram testi sonucunda meydana gelen zon çapları

Besiyerinde farklı miktarlarda PGP ve ampisilin kullanımının refakatçi flora ve *P. aeruginosa* üzerine etkisi gözlemleyebilmek ve sayım sonuçlarındaki değişimi belirleyebilmek için yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve sayım sonuçları alınmıştır.

Bu denemede antibiyogram testinde belirlenen antibiyotik miktarlarına paralel olarak PGP için 50.000 IU/L, 100.000 IU/L, 150.000 IU/L ve 200.000 IU/L, ampisilin için 800 µg/L, 1600 µg/L ve 2400 µg/L konsantrasyonlarında antibiyotikler GSP Agar besiyerine ayrı ayrı ilave edilmiş ve Petri kutularına dağıtılmıştır. Böylece 4 farklı konsantrasyonda PGP içeren GSP Agar ve 3 farklı konsantrasyonda ampisilin içeren GSP Agar besiyeri elde edilmiştir. Besiyeri modifikasyonu denemelerinde kullanılan tüm inhibitör maddeler, besiyeri sıcaklığı 50 °C' ye ayarlandıktan sonra besiyerine ilave edilmiştir.

10^{-5} – 10^{-7} arasında seyreltileri yapılan aktif kültürlerin PGP içeren GSP Agar ve ampisilin içeren GSP Agar besiyerlerine yayma yöntemiyle ekimleri yapılmış, 28 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda sayım sonuçları alınmıştır. Tüm denemelerde, kullanılan inhibitör maddelerinin bakteri sayısındaki etkisini ölçebilmek için kontrol besiyerine de (GSP Agar) ekim yapılmıştır.

3.2.3.2. BC kullanımının refakatçi flora ve *P. aeruginosa* üzerine etkisi

PGP ve ampisilinden beklenen düzeyde sonuç alınamadığından refakatçi florayı baskılayabilmek için başka bir inhibitör madde olan BC' nin denenmesine karar verilmiştir.

BC' nin refakatçi flora ve *P. aeruginosa'* nın gelişimi üzerine etkisini belirleyebilmek için agar yüzeyine nokta ekim yöntemi (Spot on lawn) kullanılmıştır (Çakır 2003). Bu denemede aynı zamanda, refakatçi flora izolasyonu ve tanımlaması sırasında elde edilen ancak daha önceki denemelerde kullanılmayan 3 adet *Bacillus* spp. cinsi bakteri de kullanılmıştır. Burada amaç, BC' nin Gram pozitif bakteriler üzerine etkisini ve PGP ile birlikte kullanıldığında etki mekanizmasının ne yönde etkilendiğini belirlemektir.

Besiyeri hazırlama;

% 10' luk BC solüsyonundan 2 mL alınıp 17,53 mL steril damıtık suya konulmuş ve konsantrasyonu 10,24 mg/mL yapılmıştır. Bu solüsyondan 5 mL alınıp, 5 mL' lik steril suya koymak suretiyle 1/2 oranında art arda dilüsyonlar yapılarak 12 farklı konsantrasyon hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyondan 1 mL alınıp 19 mL olarak hazırlanmış GSP Agar besiyerine katılmış ve konsantrasyonu 512 µg/mL düzeyinden 1 µg/mL düzeyine kadar değişen 12 adet GSP Agar besiyeri hazırlanmış ve her biri 20 mL olacak şekilde Petri kutularına dökülmüştür.

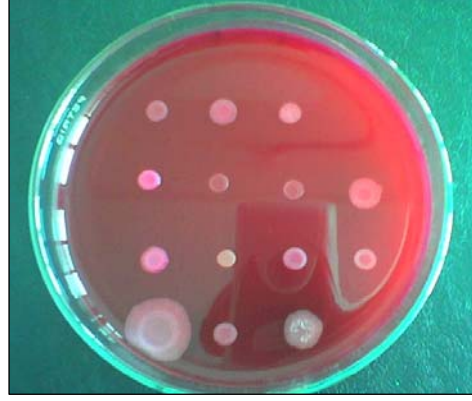
100.000 IU/L PGP içeren GSP Agar hazırlamak için, 500.000 IU PGP, 100 mL steril % 0,9' luk NaCl çözeltisi içinde çözdürülmüş, içerisinden 800 µL alınarak 20 mL GSP Agar besiyeri içine katılmış ve Petri kutusuna dökülmüştür.

Agar yüzeyine nokta ekim yöntemi;

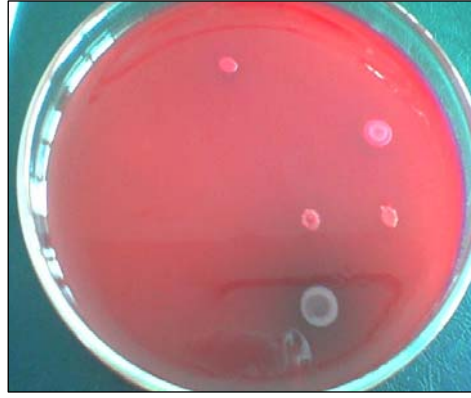
Besiyerinin belirli noktalarına damlatılacak olan aktif bakteri kültürlerinin yerini belirleyebilmek için bir şablon hazırlanmıştır. Bu şablon ekime başlamadan önce Petri kutularının altına yerleştirilmiştir. Refakatçi flora ve *P. aeruginosa'* nın TSB besiyerinde geliştirilen 18 saatlik aktif kültür halinde bulunan bakteri süspansiyonundan mikropipet aracılığı ile 2 µL alınarak şablonda belirtilen yerlere denk gelecek şekilde besiyeri yüzeyine nokta ekimleri yapılmıştır. Petri kutuları 28 °C' de 24–48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda Petri kutularının altına aynı şablon yerleştirilmek suretiyle şablon üzerindeki noktalardaki bakterilerin gelişim durumları belirlenmiştir. Petri kutusu yüzeyinde gelişim gösteren izolatların BC' ye dirençli, gelişim gösteremeyenlerin ise duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. *P. aeruginosa'* nın ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında GSP Agar besiyerindeki gelişimi Şekil 3.2' de, 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki gelişimi Şekil 3.3' te, 100.000 IU/L PGP içeren GSP Agar besiyerindeki gelişimi ise Şekil 3.4' te gösterilmiştir.

Besiyerinde inhibitör madde olarak BC kullanımının refakatçi flora ve *P. aeruginosa* üzerine etkisini gözlemleyebilmek ve sayım sonuçlarındaki değişimi belirleyebilmek için yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve sayım sonuçları alınmıştır.

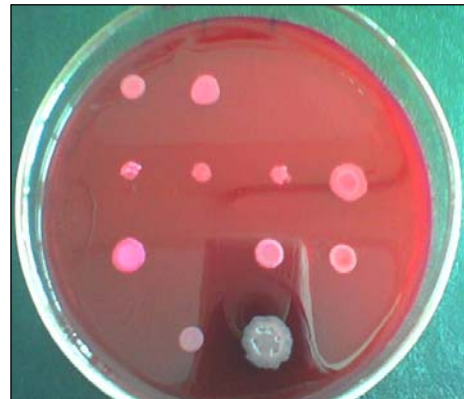
BC' nin refakatçi flora ve *P. aeruginosa* üzerine en etkili konsantrasyonu bir önceki denemede 512 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu belirlenen konsantrasyonda BC, GSP Agar besiyerine katılmış ve Petri kutularına dağıtılmıştır. *P. aeruginosa* ve tüm izolatların TSB besiyerinde geliştirilen 18 saatlik aktif kültür halinde bulunan bakteri süspansiyonundan 10^{-5} – 10^{-7} arasında seyreltileri hazırlanmış ve yayma yöntemiyle BC



Şekil 3.2 *P. aeruginosa* ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları



Şekil 3.3 *P. aeruginosa* ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları



Şekil 3.4 *P. aeruginosa* ve refakatçi floranın nokta ekim yöntemi sonrasında 100.000 IU/L PGP içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları

içeren GSP Agar besiyerine ekimleri yapılmıştır. 28 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda sayım sonuçları alınmıştır.

3.2.4. Piyasa taraması

3.2.4.1. Çiğ süttten *P. aeruginosa* izolasyonu

Bu aşamada, mevcut refakatçi flora ve *P. aeruginosa* suşu ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen bulguları piyasa taraması yaparak desteklemek amaçlanmıştır. Yapılan tüm besiyeri modifikasyonu denemelerinin sonuçları dikkate alınarak piyasa taramasının 512 µg/mL düzeyinde BC içeren GSP Agar besiyeri ile yapılmasına karar verilmiştir. Piyasadan temin edilen 10 adet çiğ süt örneğinin 10^{-4} – 10^{-6} arasında seyreltileri hazırlanmış ve BC içeren GSP Agar besiyerine yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Petri kutuları 28 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda Petri kutusu yüzeyinde gelişim gösteren tüm koloniler sayılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kolonileri tanımlayabilmek için tipik koloniler (2–3 mm çaplı, kırmızı zonlu, kırmızı koloniler) alınmış ve *P. aeruginosa* için belirleyici olan, Gram boyama, oksidaz, katalaz, oksidasyon-fermentasyon ve hareket testleri yapılmış ayrıca Tryptic Soy Agar (TSA; Merck) besiyerine sürme yapılarak *P. aeruginosa* için ayırıcı olan yeşil pigment oluşturma özelliğine bakılmıştır. Bu testler sonucunda Gram negatif, çubuk, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, oksidatif, hareketli ve TSA besiyerinde yeşil renkli koloni oluşturan izolatlar *Pseudomonas* spp. olarak değerlendirilmişlerdir.

3.2.4.2. Laboratuvar koşullarında çiğ süte ilave edilen *P. aeruginosa*' nın çiğ süttten geri alınması

18 saatlik aktif *P. aeruginosa* kültüründen (10^8 – 10^9 kob/mL) art arda 1/9 oranında seyreltmeler yapılarak 10^5 – 10^6 kob/mL düzeyinde *P. aeruginosa* içeren bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Piyasadan temin edilen 5 farklı çiğ süt örneğinin her birinden 1 mL alınmış ve üzerine 10^5 – 10^6 kob/mL düzeyinde *P. aeruginosa* içeren bakteri süspansiyonundan 1 mL ilave edilerek karışım hazırlanmıştır. Karışımın

10^{-3} – 10^{-5} arasında seyreltileri yapılmış ve 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerine yayma yöntemi ile ekimleri yapılmıştır. Petri kutuları 28 °C' de 48 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonunda gelişen koloniler sayılmıştır. Gelişen kolonileri tanımlayabilmek için *P. aeruginosa* için belirleyici olan; Gram boyama, oksidaz, katalaz, oksidasyon/fermentasyon ve hareket testleri yapılmış ayrıca TSA besiyerine sürme yapılarak yeşil pigment oluşturma özelliğine bakılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çiğ Sütten Gelen Refakatçi Floranın İzolasyonu ve Tanımlanması

Çizelge 4.1' de çiğ süttten bakteri izolasyonu ve tanımlanması için yapılan testler ve bu testlerin sonuçlarına göre yapılan tanımlamalar gösterilmiştir. Bu çalışmada farklı kaynaklardan temin edilen toplam 20 adet çiğ süt örneği kullanılmış, bu sütlerden ise toplam 28 adet izolat elde edilmiştir. PGP kullanılmadan hazırlanan GSP Agar besiyerinden izole edilen refakatçi floranın 8' i (% 28,6) *Pseudomonas* spp., 6' sı (% 21,4) *Aeromonas* spp., 6' sı (% 21,4) *Enterobacter* spp., 3' ü (% 10,7) *Escherichia* spp., 2' si (% 7,14) *Citrobacter* spp., 2' si (% 7,14) *Klebsiella* spp. ve 1' i de (% 3,6) *Erwinia* spp. olarak tanımlanmıştır.

Aynı sonuçları veren izolatlar gruplandırılmış ve sonuçta refakatçi florayı temsilen toplam 7 farklı cinste bakteri elde edilmiştir.

Rashed ve Buday (1983), Macaristan'da çiğ sütlerden yaptıkları bir çalışmada psikrofil popülasyonda *Pseudomonas* 'ların % 56,9 oranıyla baskın olduğunu saptamışlardır.

Griffiths ve arkadaşları 1982 yılında yaptıkları bir araştırma sonucunda süt ürünlerindeki psikrotrof floranın % 53' ünün *Pseudomonas* türlerinden oluştuğunu tespit etmişlerdir. Juffs 1973' te süt ürünlerinin mikroflorasını araştırmış ve elde ettiği 330 izolatın 167 tanesini *Pseudomonas* spp. olarak tanımlamıştır (Kwan and Skura 1983).

İnal (1990), çiğ sütlerde bulunan psikrotrof bakterilerin yaklaşık % 90' ının Gram negatif çubuk şekilli bakterilerden oluştuğunu, bunların da yarısını *Pseudomonas* 'ların meydana getirdiğini bildirmiştir. İnal ayrıca belirli ölçüde koliform grup bakterilerin de çiğ sütlerde bulunduğunu ifade etmiştir.

Kılıç (2000), süt ve ürünlerinden izole edilen Gram negatif bakterilerin *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Vibrio* olduğunu belirtmiştir.

Çizelge 4.1 *Pseudomonas aeruginosa* ve refakatçi flora tanımlaması için yapılan biyokimyasal test sonuçları

| | | Test Sonuçları | | | | | | | |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| Ayrım Testleri | Morfoloji | Ç | Ç | Ç | Ç | Ç | Ç | Ç | Ç |
| | Gram reaksiyonu | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Oksidaz | + | - | - | + | - | - | - | + |
| | Katalaz | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | O/F | O | F | F | F | F | F | F | O |
| | İndol | - | - | - | + | - | + | + | - |
| | MR | - | - | + | - | + | - | + | - |
| | VP | - | + | - | + | + | + | - | - |
| | Nitrat redüksiyonu | + | + | + | + | + | + | - | + |
| | Hareket | + | + | - | + | + | + | + | + |
| | Glikozdan asit | - | + | + | + | + | + | + | + |
| | Laktozdan asit | - | + | + | + | + | + | - | - |
| | Sakkarozdan asit | - | + | - | + | + | + | - | - |
| | Lisin dekarboksilaz | GY | + | + | + | + | - | - | - |
| | Ornitin dekarboksilaz | GY | + | + | - | - | + | + | + |
| | Sitrat | + | + | - | - | + | + | - | + |
| | H ₂ S | GY | - | - | - | - | - | - | - |
| | TSI | GY | KK | KK | KK | KS | KS | KS | KK |
| Üre | + | + | - | + | - | - | - | + | |
| Bakteri adı | | <i>Pseudomonas</i> spp. | <i>Enterobacter</i> spp. | <i>Escherichia</i> spp. | <i>Aeromonas</i> spp. | <i>Klebsiella</i> spp. | <i>Citrobacter</i> spp. | <i>Erwinia</i> spp. | <i>P. aeruginosa</i> |

Ç: çubuk, O: oksidatif, F: fermentatif, GY: gelişme yok, KK: besiyerinin üst ve dip kısmı kırmızı (alkali), KS: besiyerinin üst kısmı kırmızı dip kısmı sarı

GSP Agar *Pseudomonas* ve *Aeromonas*' lar için selektif bir besiyeridir ancak besiyerinde *Enterobacteriaceae* familyasına ait diğer bakterilerin de değişik koloni morfolojisi

(genellikle küçük ve mukoit) oluşturarak gelişebileceği bildirilmiştir (Anonymous 2006). Yapılan izolasyon ve tanımlama çalışmasında, refakatçi floranın yaklaşık yarısı *Pseudomonas* spp. ve *Aeromonas* spp. olarak, diğer yarısı ise *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakteriler (*Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp.) olarak tespit edilmiştir.

4.2. Besiyeri Modifikasyonu Denemeleri Sonuçları

4.2.1. PGP kullanımının *Pseudomonas aeruginosa* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

PGP, GSP Agar besiyerinin selektivitesini artırmak için kullanılan selektif bir katkı maddesidir. PGP, refakatçi flora olan etkisinin belirlenebilmesi için besiyerine farklı konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Besiyerine ilave edilecek olan PGP konsantrasyonu, GSP Agar formülasyonunda belirtilen 100.000 IU/L' den yola çıkarak 50.000, 100.000, 150.000 ve 200.000 IU/L olarak belirlenmiştir. Ancak besiyerine PGP ilavesinden önce *P. aeruginosa* ve refakatçi floranın PGP direncini belirlemek amacı ile disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyogram testi yapılmıştır. Çizelge 4.2' de PGP için yapılan antibiyogram testi sonuçları ve elde edilen zon çapları verilmiştir.

Çizelge 4.2 PGP ile yapılan antibiyogram testi sonucunda elde edilen zon çapları (mm)

| Bakteri adı | Disk içeriği (IU) | | | |
|--------------------------|-------------------|------|------|------|
| | 625 | 1250 | 1875 | 2500 |
| <i>P. aeruginosa</i> | – | – | – | – |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | – | – | – | – |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 18 | 22 | 23 | 27 |
| <i>Escherichia</i> spp. | 24 | 27 | 28 | 31 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | 21 | 26 | 26 | 30 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 12 | 14 | 18 | 20 |
| <i>Citrobacter</i> spp. | 7 | 9 | 10 | 14 |
| <i>Erwinia</i> spp. | 8 | 14 | 16 | 21 |

– : Zon oluşmadı

Çizelge 4.2 incelendiğinde artan PGP miktarına karşın *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp.' nin gelişimlerini sürdürdükleri ve zon oluşturmadıkları görülmüştür. Bu sonuç, *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp.' nin PGP' ye dirençli olduğunu göstermiştir.

Arda (2006), penisilinin Gram negatif mikroorganizmalara etkisinin zayıf olduğunu, daha ziyade Gram pozitifler üzerine etki yaparak protoplast oluşumuna yol açtığını, bu protoplastların da uzun süre ortamda kalamayıp hemen parçalandığını ve böylece hücrelerin lize olduğunu bildirmiştir.

Diren (2002), *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilerin tümünün PGP' ye dirençli olduğunu bildirmiştir.

PGP' nin *P. aeruginosa* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenebilmesi için daha önce belirtildiği şekilde örnekler hazırlanmış ve farklı miktarlarda PGP içeren GSP Agar besiyerine ve kontrol besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Belirtilen inkübasyon süresi sonunda besiyerindeki gelişim durumuna göre sayım sonuçları alınmıştır. Çizelge 4.3' te farklı konsantrasyonlarda PGP içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları log kob/mL olarak verilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda PGP içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

| Bakteri adı | Antibiyotik konsantrasyonu (IU/L) | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------|--------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| | Kontrol ¹ | | 50.000 | | 100.000 | | 150.000 | | 200.000 | |
| | log | ind ² | log | ind | log | ind | log | ind | log | ind |
| <i>P. aeruginosa</i> | 9,15 | 100 | 9,17 | 100 | 9,13 | 100 | 9,16 | 100 | 9,15 | 100 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 8,91 | 100 | 8,93 | 100 | 8,88 | 100 | 8,84 | 99 | 8,84 | 99 |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 9,07 | 100 | 8,93 | 98 | 8,80 | 97 | 8,46 | 93 | 8,19 | 90 |
| <i>Escherichia</i> spp. | 8,79 | 100 | 8,78 | 100 | 8,23 | 94 | 8,18 | 93 | 8,16 | 93 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | 9,04 | 100 | 8,64 | 96 | 8,30 | 92 | <6 | <66 | <6 | <66 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 8,37 | 100 | 8,21 | 98 | 7,57 | 90 | <5 | <60 | <5 | <60 |
| <i>Citrobacter</i> spp. | 8,35 | 100 | 8,24 | 99 | 8,20 | 98 | 8,10 | 97 | 8,12 | 97 |
| <i>Erwinia</i> spp. | 9,12 | 100 | 9,07 | 99 | 8,96 | 98 | 8,95 | 98 | 9,01 | 99 |

¹ GSP Agar besiyeri

² İndeks

Çizelge 4.3 incelendiğinde artan antibiyotik konsantrasyonuna karşın *P. aeruginosa*'nın sayısında değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu veri doğrultusunda PGP' nin GSP Agar besiyerinde inhibitör madde olarak kullanılması durumunda *P. aeruginosa*'nın gelişimini baskılamadığı sonucuna ulaşılmıştır. Diğer veriler incelendiğinde *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Citrobacter* spp. ve *Erwinia* spp.'nin kontrol besiyerindeki sayıları ile 50.000, 100.000, 150.000 ve 200.000 IU/L PGP içeren GSP Agar besiyerindeki sayıları arasında önemli bir fark olmadığı; *Aeromonas* spp. ve *Klebsiella* spp.'nin sayısında ise düşüş olduğu görülmüştür. Çizelge 4.2' de *Pseudomonas* spp.'nin dışında kalan refakatçi flora PGP' nin etkili olduğu tespit edilmiş olsa da PGP' nin besiyerine ilave edilmesi durumunda elde edilen sayım sonuçlarının önemli ölçüde değişmemiş olması *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Citrobacter* spp. ve *Erwinia* spp.'nin gelişimlerinin PGP' den etkilenmediğini göstermiştir.

Besiyeri modifikasyonunda kullanılacak inhibitör maddenin *P. aeruginosa*'nın gelişimini engellememesi, refakatçi floranın ise gelişimini baskılaması gerekmektedir.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, PGP' nin, *P. aeruginosa*'nın gelişimini engellememesi yönünden kabul edilebilir olmasına rağmen, Gram negatif bakterilerden oluşan refakatçi floranın inhibisyonunda yetersiz kalması nedeniyle besiyeri modifikasyonunda kullanılacak uygun bir inhibitör madde olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.2.2. Ampisilin kullanımının *Pseudomonas aeruginosa* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

Yılmaz (1999), *Pseudomonas* suşlarının antimikrobiyel ajanlara duyarlılığı üzerine yaptığı bir çalışmada *P. aeruginosa* suşunun ampisiline % 100 dirençli olduğunu saptamıştır. Bu çalışma sonucuna paralel olarak, Türkmen (2002), farklı antibiyotiklerin Gram negatif bakterilere etkisini araştırdığı bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın ampisiline % 100 dirençli olduğunu bildirmiştir.

Bu bilgiler ışığında ampisilin refakatçi florayı baskılayabilmek amacı ile GSP Agar besiyerinde kullanılacak uygun bir inhibitör madde olabileceği düşünülmüştür. Ancak besiyerine ampisilin ilavesinden önce *P. aeruginosa* ve refakatçi floranın ampisilin direncini belirlemek amacı ile disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyogram testi yapılmıştır. Çizelge 4.4' te ampisilin için antibiyogram testi sonuçları ve elde edilen zon çapları verilmiştir.

Çizelge 4.4 Ampisilin ile yapılan antibiyogram testi sonucunda elde edilen zon çapları (mm)

| Bakteri adı | Disk içeriği (µg) | | |
|--------------------------|-------------------|----|----|
| | 10 | 20 | 30 |
| <i>P. aeruginosa</i> | – | – | – |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | – | – | – |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 11 | 14 | 16 |
| <i>Escherichia</i> spp. | 17 | 20 | 23 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | 7 | 10 | 13 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 8 | 11 | 14 |
| <i>Citrobacter</i> spp. | – | – | – |
| <i>Erwinia</i> spp. | – | – | – |

Ampisilin için 10 µg antibiyotik içeriği göz önüne alındığında, antibiyogramda 11 mm zon çapından küçük değerler dirençli, 12–13 mm zon çapı arasındaki değerler orta hassas, 14 mm zon çapından büyük değerler ise hassas olarak değerlendirilmiştir (<http://www.oxid.com>, 2004).

Çizelge 4.4 incelendiğinde artan ampisilin miktarına karşın *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp.'nin gelişimlerini sürdürdükleri, 30 µg'da bile geliştikleri ve zon oluşturmadıkları görülmüştür. Bu sonuç *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp.'nin ampisiline dirençli olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda bu sonuçların Yılmaz (1999) ve Türkmen (2002)'in sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Akçam vd. (2004), yaptıkları bir çalışmada *Klebsiella* spp.' nin % 97,5 oranında ampisiline dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Diren (2002), *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. ve *Citrobacter* spp.' nin ampisiline doğal dirençli bakteriler olduğunu belirtmiştir. Çizelge 4.4' te *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp. ve *Klebsiella* spp. zon çapları 11' den küçük olduğu için, *Erwinia* spp. ve *Citrobacter* spp. zon oluşturmadığı için ampisiline dirençli; *Escherichia* spp., zon çapı 14' ten büyük olduğu için ampisiline duyarlı olarak belirlenmiştir.

Ampisilinin *P. aeruginosa* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenebilmesi için daha önce belirtildiği şekilde örnekler hazırlanmış ve farklı miktarlarda ampisilin içeren GSP Agar besiyerine ve kontrol besiyerine yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Belirtilen inkübasyon süresi sonunda besiyerindeki gelişim durumuna göre sayım sonuçları alınmıştır. Çizelge 4.5' te farklı konsantrasyonlarda ampisilin içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları log kob/mL olarak verilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyonlarda ampisilin içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

| Bakteri adı | Antibiyotik konsantrasyonu (µg/L) | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| | Kontrol | | 800 | | 1600 | | 2400 | |
| | log | ind | log | ind | log | ind | log | ind |
| <i>P. aeruginosa</i> | 8,94 | 100 | 8,87 | 99 | 8,95 | 100 | 8,95 | 100 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 8,89 | 100 | 8,86 | 100 | 8,86 | 100 | 8,89 | 100 |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 8,85 | 100 | 8,86 | 100 | 8,86 | 100 | 8,85 | 100 |
| <i>Escherichia</i> spp. | 8,13 | 100 | 8,40 | 100 | 8,39 | 100 | 8,24 | 100 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | 8,57 | 100 | 8,57 | 100 | 8,46 | 99 | 8,46 | 99 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 8,67 | 100 | 8,70 | 100 | 8,70 | 100 | 8,63 | 100 |
| <i>Citrobacter</i> spp. | 8,20 | 100 | 8,21 | 100 | 8,20 | 100 | 8,19 | 100 |
| <i>Erwinia</i> spp. | 9,35 | 100 | 9,34 | 100 | 9,35 | 100 | 9,30 | 99 |

Çizelge 4.5 incelendiğinde artan antibiyotik miktarına karşın *P. aeruginosa*' nin sayısında değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu veri doğrultusunda ampisilinin GSP

Agar besiyerinde inhibitör madde olarak kullanılması durumunda *P. aeruginosa*'nın gelişimini baskılamadığı sonucuna ulaşılmıştır. Diğer veriler incelendiğinde *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Aeromonas* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. ve *Erwinia* spp.'nin kontrol besiyerindeki sayıları ile 800, 1600 ve 2400 µg/L düzeyinde ampisilin içeren GSP Agar besiyerindeki sayıları arasında önemli bir fark olmadığı hatta indeks değerlerine bakıldığında *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. ve *Citrobacter* spp. sayılarında hiçbir değişiklik olmadığı, *Aeromonas* spp. ve *Erwinia* spp.'nin sayılarında ise sadece % 1'lik bir azalış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Çizelge 4.4'teki sonuçlarla kısmen paralellik göstermektedir. Yani refakatçi florayı oluşturan (*Escherichia* spp. dahil) tüm Gram negatif bakteriler ampisiline direnç göstermiştir ve sayılarında bir azalış olmamıştır.

Besiyeri modifikasyonunda kullanılacak inhibitör maddenin *P. aeruginosa*'nın gelişimini engellememesi, refakatçi floranın ise gelişimini baskılaması gerekmektedir.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde ampisilinin, *P. aeruginosa*'nın gelişimini engellememesi yönünden kabul edilebilir olmasına rağmen, refakatçi floranın inhibisyonunda yetersiz kalması nedeniyle besiyeri modifikasyonunda kullanılacak uygun inhibitör madde olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.2.3. Benzalkonyum klorür kullanımının *Pseudomonas aeruginosa* ve refakatçi flora üzerine etkisinin belirlenmesi

PGP ve ampisilinden beklenen düzeyde sonuç alınamadığından refakatçi florayı baskılayabilmek için başka bir inhibitör madde denemesine geçilmiştir.

Kılıç (2006), benzalkonyum klorürün (BC) Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğunu buna karşılık *P. aeruginosa*'nın gelişimi üzerinde hiçbir baskılayıcı etki yapmadığını bildirmiştir. Kılıç, hastane ortamlarında *P. aeruginosa*'nın BC içeren solüsyonlarda bile gelişebildiğini ifade etmiştir.

Oie ve arkadaşları, *P. aeruginosa'* nın BC' yi en fazla kontamine eden mikroorganizmalar arasında olduğunu saptamışlardır (Özsoy vd. 2001).

BC' nin etki mekanizması incelendiğinde BC' nin katyonik deterjanlar sınıfına dahil olduğu görülmektedir. Katyonik deterjanlar kuaternar amonyum bileşiklerinden oluşmuş yüzey aktif maddelerdir. Kendilerinde bulunan hidrofobik kısım, pozitif elektrikle yüklü olan hidrofilik kısım ile denge halindedir. Böyle bir madde bakteri ile karşı karşıya gelirse pozitif yüklü kısım, bakterinin negatif elektrikle yüklenmiş olan ve membranda bulunan fosfolipidlerin fosfat kökü ile reaksiyon verir. Bu sırada deterjanın polar olmayan kısmı da membranın hidrofobik olan kısımlarının içine girerek etkisini sürdürür. Bu durum, bakterideki yarı geçirgenlik özelliğini bozar ve membranda bulunan fosfor, nitrojen, protein, lipid ve diğer önemli substanslar arasındaki bağlantılarda kopmalar meydana getirir. Böylece, membrandaki maddeler arasındaki bütünlük bozulur. Dezenfektan hücre içine girdikten sonra da etkisine devam ederek çok önemli göreve sahip olan enzimleri denatüre ve inaktive eder. Katyonik deterjanlar, Gram pozitif ve negatif bakteriler için bakterisidal etkiye sahiptirler (Arda 2006). BC, kullanılan konsantrasyona göre bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösterir. Ancak bakteri sporları BC' ye karşı dirençlidir. Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilere göre BC' ye daha dayanıksızdırlar. *Pseudomonas* 'lar ise Gram negatif bakteriler arasında BC' ye en dayanıklı bakterilerdir (<http://products.sanofi-aventis.us/zephiran/zephiran.html>, 2006).

Bu bilgiler ışığında refakatçi florayı baskılayabilmek için besiyerine inhibitör madde olarak farklı konsantrasyonlarda BC ilave edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.6' da *P. aeruginosa'* nın ve refakatçi floranın farklı konsantrasyonlarda BC içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları gösterilmiştir. İnkübasyon sonrasında Petri kutusu yüzeyinde gelişim gösteren bakterilerin BC' ye dirençli olduğu, gelişim gösteremeyenlerin ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6 incelendiğinde 512 µg/mL düzeyinde BC içeren GSP Agar besiyerinde *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Klebsiella* spp. ve *Citrobacter* spp.'nin gelişemediği ancak *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp. ve *Erwinia* spp.'nin gelişebildiği görülmüştür.

BC'ye en duyarlı bakterinin 1 µg/mL düzeyinde BC'de bile gelişememesi ile *Escherichia* spp. olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 *P. aeruginosa*'nın ve refakatçi floranın farklı konsantrasyonlarda BC içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları

| Bakteri adı | BC konsantrasyonu (µg/mL) | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|---|---|---|---|----|----|----|-----|-----|-----|
| | Kontrol | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 |
| <i>P. aeruginosa</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Escherichia</i> spp. | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterobacter</i> spp. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Aeromonas</i> spp. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Klebsiella</i> spp. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Citrobacter</i> spp. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>Erwinia</i> spp. | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : gelişme var, - : gelişme yok

BC'nin refakatçi floraya inhibisyon etkisinin 256 µg/ml düzeyinde başladığı ve 512 µg/ml düzeyinde en etkili inhibisyonun sağlandığı tespit edilmiştir. 512 µg/ml düzeyinde BC, refakatçi flora içerisinde *Erwinia* spp.'ye etki etmediğinden 1024 µg/ml düzeyinde BC içeren GSP Agar hazırlanmış ancak bu konsantrasyonda da *Erwinia* spp.'nin GSP Agar besiyerinde gelişim gösterdiği yani BC'ye dirençli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan izolasyon ve tanımlama çalışmalarından elde edilen 28 izolattan sadece 1 tanesi (% 3,6) *Erwinia* spp. olarak belirlendiğinden yani refakatçi florada bulunma oranı çok düşük olduğundan *Erwinia* spp.'nin BC'ye karşı direncinin göz ardı edilebileceği düşünülmüştür.

Bu sonuçlar dikkate alınarak GSP Agar besiyerine ilave edilen 512 µg/mL düzeyinde BC' nin *Pseudomonas*' ların gelişimini baskılamadığı ancak refakatçi floranın büyük bir çoğunluğunun gelişimini baskıladığı sonucuna varılmıştır.

Besiyerinde inhibitör madde olarak BC kullanımının refakatçi flora ve *P. aeruginosa* üzerine etkisini gözlemleyebilmek ve sayım sonuçlarındaki değişimi belirleyebilmek için en etkili konsantrasyon olan 512 µg/mL BC, GSP Agar besiyerine ilave edilmiş (BC-GSP), yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve sayım sonuçları alınmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen sayım sonuçları Çizelge 4.7' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

| Bakteri adı | Kontrol | | BC-GSP Agar | |
|--------------------------|---------|-----|-------------|-----|
| | log | ind | log | ind |
| <i>P. aeruginosa</i> | 9,37 | 100 | 9,36 | 100 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 9,12 | 100 | 8,38 | 92 |
| <i>Escherichia</i> spp. | 8,49 | 100 | <1 | <11 |
| <i>Enterobacter</i> spp. | 9,32 | 100 | <1 | <11 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | 8,87 | 100 | <1 | <11 |
| <i>Klebsiella</i> spp. | 8,48 | 100 | <1 | <12 |
| <i>Citrobacter</i> spp. | 9,46 | 100 | 4,91 | 52 |
| <i>Erwinia</i> spp. | >9,48 | 100 | >9,48 | 100 |

Çizelge 4.7' deki indeks değerleri incelendiğinde *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp. ve *Klebsiella* spp. sayılarında önemli bir azalış olduğu (% 89' luk), *Citrobacter* spp.' nin sayısında yarı yarıya bir azalış olduğu, *Erwinia* spp. ve *P. aeruginosa*' nın sayısında ise değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda, BC' nin *Erwinia* spp. hariç diğer refakatçi florayı oluşturan bakterilere karşı yüksek oranlarda inhibisyon sağladığı, buna karşın *P. aeruginosa* ve *Pseudomonas* spp.' ye karşı inhibe edici etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır.

BC' nin Gram pozitif bakterilere etkisini incelemek ve aynı zamanda PGP ile etkileşimini saptayabilmek için 3 farklı GSP Agar besiyeri hazırlanmıştır. Çizelge 4.8' de *P. aeruginosa*'nın, refakatçi floranın ve *Bacillus* cinsi 3 bakterinin gelişim durumları gösterilmiştir. Çizelge 4.8 incelendiğinde PGP' nin Gram negatif bakterilere etki etmediği sadece Gram pozitif bakterilere etki ettiği ve BC ile kombine edildiği takdirde BC' nin refakatçi florayı inhibe edici etkisinin değişmediği saptanmıştır. Besiyerinde BC+PGP kombinasyonu ile sadece BC kullanımının karşılaştırılması durumunda aynı sonuçların çıktığı ve bu nedenle refakatçi florayı inhibe etmek amacıyla bu kombinasyonun kullanılmasının gereksiz olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.8 Tüm izolatların BC, PGP ve BC+PGP içeren GSP Agar besiyerindeki gelişim durumları

| Bakteri adı | BC (512 µg/mL) | Penisilin G (100.000 IU/L) | BC (512 µg/mL) + Penisilin G (100.000 IU/L) |
|--------------------------|-------------------|-------------------------------|---|
| <i>P. aeruginosa</i> | + | + | + |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | + | + | + |
| <i>Escherichia</i> spp. | - | + | - |
| <i>Enterobacter</i> spp. | - | + | - |
| <i>Aeromonas</i> spp. | - | + | - |
| <i>Klebsiella</i> spp. | - | + | - |
| <i>Citrobacter</i> spp. | - | + | + |
| <i>Erwinia</i> spp. | + | + | + |
| Gram (+) basil 1 | - | - | - |
| Gram (+) basil 2 | - | - | - |
| Gram (+) basil 3 | - | - | - |

+: Gelişme var, -: Gelişme yok

Tüm bu denemeler doğrultusunda, GSP Agar besiyerine 512 µg/mL düzeyinde katılan BC' nin, *P. aeruginosa* 'nın gelişimini baskılamaması ve refakatçi florayı yüksek seviyelerde inhibe etmesinden dolayı GSP Agar besiyerinde kullanılabilir uygun bir inhibitör madde olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3. Piyasa Taraması Sonuçları

Bölüm 4.2.3' teki sonuca göre piyasa taraması yapılmıştır.

Piyasadan temin edilen 10 farklı çiğ süt örneğinin sayım sonuçları Çizelge 4.9' da gösterilmiştir. Çizelge 4.9' daki indeks değerleri incelendiğinde, bakteri sayılarında önemli bir düşüş olduğu (% 21,6) görülmüştür.

Eşleştirilmiş örneklem t testine göre 2 değişken (kontrol besiyerindeki sayım sonuçları-BC-GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları) karşılaştırıldığında, bu iki değişken arasındaki farklılığın anlamlı olduğu saptanmıştır. İstatistiksel değerlendirme sonucunda örneklerin BC-GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçlarının, kontrol besiyerindeki sayım sonuçlarına göre daha düşük olduğu ve aradaki bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.9 512 µg/mL BC içeren GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/ml)

| Materyal | Kontrol | | BC-GSP Agar | |
|-------------------|-------------|-----|-------------|-----------|
| | log | ind | log | ind |
| Çiğ süt, örnek 1 | 7,47 | 100 | 6,45 | 86 |
| Çiğ süt, örnek 2 | 7,32 | 100 | 5,70 | 78 |
| Çiğ süt, örnek 3 | 8,02 | 100 | 6,40 | 80 |
| Çiğ süt, örnek 4 | 6,53 | 100 | 5,31 | 81 |
| Çiğ süt, örnek 5 | 7,39 | 100 | 6,17 | 83 |
| Çiğ süt, örnek 6 | 7,48 | 100 | 5,48 | 73 |
| Çiğ süt, örnek 7 | 7,32 | 100 | 5,53 | 76 |
| Çiğ süt, örnek 8 | 7,32 | 100 | 6,17 | 84 |
| Çiğ süt, örnek 9 | 7,42 | 100 | 5,37 | 72 |
| Çiğ süt, örnek 10 | 7,49 | 100 | 5,34 | 71 |
| Ortalama | 7,376±0,361 | 100 | 5,792±0,456 | 78,4±5,27 |

Besiyerinde gelişen tipik kolonilerin *Pseudomonas* olup olmadığını saptayabilmek için Bölüm 3.2.4.1.' de anlatıldığı gibi biyokimyasal testler yapılmıştır. BC-GSP Agar

besiyerinden rastgele alınan 20 adet koloniye yapılan testler sonucunda; 17 tanesinin Gram negatif, çubuk şeklinde, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, oksidatif, hareketli olduğu ve TSA besiyerinde yeşil renkli koloni oluşturduğu tespit edilmiştir. Kalan 3 tane izolatın ise O/F testi sonucunda fermentatif bakteri olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alınarak BC-GSP Agar besiyerinde gelişim gösteren bakterilerin *Pseudomonas* spp. olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4. Laboratuvar Koşullarında Çiğ Süte İlave Edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın Çiğ Sütten Geri Alınması Denemesindeki Sayım Sonuçları

Bölüm 3.2.4.2.' de anlatılan denemenin sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.10 10^5 - 10^6 kob/mL düzeyinde *P. aeruginosa* içeren çiğ sütün BC-GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçları (log kob/mL)

| Materyal | Kontrol | BC-GSP Agar |
|-----------|-------------|-------------|
| Çiğ süt 1 | 7,22 | 5,87 |
| Çiğ süt 2 | 6,87 | 5,83 |
| Çiğ süt 3 | 7,25 | 6,18 |
| Çiğ süt 4 | 7,11 | 5,97 |
| Ortalama | 7,115±0,172 | 5,965±0,156 |

Çizelge 4.10 incelendiğinde bakteri sayılarında önemli bir düşüş olduğu görülmüştür. BC-GSP Agar besiyerinde gelişen kolonilerin *Pseudomonas* olup olmadığını belirleyebilmek için Bölüm 3.2.4.2.' de açıklandığı gibi besiyeri yüzeyinde gelişim gösteren tipik 12 adet koloni alınmış ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Yapılan biyokimyasal test sonuçlarında tüm izolatların Gram negatif, çubuk şeklinde, oksidaz pozitif, katalaz pozitif, oksidatif, hareketli olduğu ve TSA besiyerinde yeşil pigment verdiği tespit edilmiş bu sonuç doğrultusunda BC-GSP Agar besiyerinde gelişen kolonilerin *Pseudomonas* olduğu sonucuna varılmıştır.

İnkübasyon sonrasında kontrol besiyerinde çok farklı tipte koloni gelişimi gözlemlenmiştir. Buna karşın BC-GSP Agar besiyerinde tek tip koloni gelişimi (2-3 mm çapında kırmızı zonlu kırmızı koloniler) olmuştur. Özellikle GSP Agar besiyerinde sarı renkli koloni oluşumuyla *Pseudomonas*' lardan ayrılan *Aeromonas*' lara kontrol besiyerinde sıkça rastlanmasına rağmen BC-GSP Agar besiyerinde hiç rastlanmamıştır. Bu gözlem, BC' nin çiğ süttten gelen rekabetçi floraaya olan inhibisyon etkisinin bir diğer göstergesidir.

BC-GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçlarının ortalamasına bakıldığında ilave edilen oranda (10^5 – 10^6 kob/mL) *P. aeruginosa*' nın inkübasyon sonrasında aynen geri alınabildiği ($5,965 \log \text{ kob/mL} = 9 \times 10^5 \text{ kob/mL}$) görülmüştür.

5. SONUÇ

Çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

-GSP Agar besiyeri kullanılarak yapılan izolasyon ve tanımlama çalışmasında elde edilen hakim flora, Gram negatif bakterilerden oluşmuştur.

-Antibiyoqram testleri sonucunda *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas spp.*' nin PGP ve ampisiline dirençli olduğu belirlenmiştir.

-GSP Agar besiyerinde selektif katkı maddesi olarak kullanılan PGP, 50.000 IU/L, 100.000 IU/L, 150.000 IU/L ve 200.000 IU/L konsantrasyonlarında besiyerine katıldığında Gram negatif bakterilerden oluşan refakatçi floranın baskılanmasında yetersiz kalmış (% 13,4), refakatçi floranın sayısında önemli bir azalış sağlayamamıştır. Ancak PGP, Gram pozitif *Bacillus* cinsi bakterilerin gelişimini baskılayabilmiştir.

-GSP Agar besiyerine 800 µg/L, 1600 µg/L ve 2400 µg/L konsantrasyonlarında ilave edilen ampisilin refakatçi floranın baskılanmasında yetersiz kalmış (% 0,3), refakatçi floranın sayısında önemli bir azalış sağlayamamıştır.

-PGP ve ampisilinin, refakatçi floranın sayısında önemli bir azalış sağlayamaması nedeniyle, bu antibiyotiklerin besiyeri modifikasyonunda kullanılabilecek uygun inhibitör maddeler olmadıkları saptanmıştır.

-512 µg/mL düzeyinde kullanılan BC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spp.* ve *Erwinia spp.*' nin gelişimini inhibe etmezken, *Escherichia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Klebsiella spp.*, ve *Citrobacter spp.*' nin gelişimini inhibe ettiği görülmüştür. 512 µg/mL BC, *P. aeruginosa*' nin gelişimini inhibe etmediğinden pratikte kolaylık sağlaması açısından 512 µg/mL yerine 500 µg/mL BC kullanılması önerilebilir. Bu sayede besiyeri hazırlama aşamasındaki hesaplamalarda kolaylık

sağlanacaktır. % 10' luk BC solüsyonundan 2 mL alınıp 18 mL steril damıtık suya konulduğunda konsantrasyon 10 mg/mL olacak, bu konsantrasyondan 1 mL alınıp 19 mL olarak hazırlanmış GSP Agar besiyerine katıldığında 500 µg/mL düzeyinden GSP Agar besiyeri elde edilmiş olacaktır.

-Refakatçi flora içinde BC' ye en duyarlı bakterinin *Escherichia* spp. olduğu belirlenmiştir.

-BC-GSP Agar besiyerinde yayma yöntemi ile yapılan ekim sonucunda elde edilen sayım sonuçları değerlendirildiğinde, *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp. ve *Klebsiella* spp. sayılarında büyük bir düşüş (% 89) olduğu, *Citrobacter* spp. sayısında yarı yarıya bir düşüş (% 48) olduğu, *P. aeruginosa* ve *Erwinia* spp. sayısında ise değişiklik olmadığı görülmüştür. Ayrıca inkübasyon sonunda *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp. ve *Klebsiella* spp.' nin 10^0 seyreltisinde bile Petri kutusu yüzeyinde gelişme göstermedikleri belirlenmiştir. Bu durum, BC-GSP Agar besiyerinin, refakatçi floranın büyük bir çoğunluğunu tamamen inhibe ettiğini göstermiş, BC' nin *Pseudomonas aeruginosa* sayımında kullanılabilir uygun bir inhibitör madde olduğuna işaret etmiştir.

-İstatistiksel değerlendirme sonucunda çiğ süt örneklerin BC-GSP Agar besiyerindeki sayım sonuçlarının, kontrol besiyerindeki sayım sonuçlarına göre daha düşük olduğu ve aradaki bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

-Laboratuvar koşullarında çiğ süte ilave edilen *P. aeruginosa'* nın çiğ süttten geri alınması denemesinde BC-GSP Agar besiyerinde gelişim gösteren kolonilerden seçilen 12 tanesine yapılan biyokimyasal testler sonucunda seçilen tüm kolonilerin *Pseudomonas* spp. olduğu, ilave edilen oranda *P. aeruginosa'* nın aynen geri alındığı tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol besiyerinde çok çeşitli tipte bakteri gelişimi gözlenirken, BC-GSP Agarda tek tip bakteri gelişimi gözlenmiştir.

Tüm bu veriler doğrultusunda; BC-GSP Agar besiyerinin, *P. aeruginosa*'nın gelişimini baskılamaması ve refakatçi floranın büyük bir çoğunluğunu inhibe etmesi nedeniyle, çiğ süttten *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonu ve sayımında büyük bir kolaylık sağlayacağı sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Anonim. 2004. Web sitesi. <http://mikrobiyoloji.org>. Erişim tarihi: 12.11.2004.
- Anonymous. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eds. J. Holt *et al.* Williams & Wilkins Company, 787 s., Maryland.
- Anonymous. 1998. Difco Manual. M-PA-C Agar, Pseudomonas Agars. 418–419, 462–463. USA.
- Anonymous. 2006. Merck Microbiology Manual. 12th Edition. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 688 s.
- Arda, M. 2006. Mikrobiyel Üremenin Kontrolü. Bakterilerin Anatomik Yapıları. Web sitesi. <http://www.mikrobiyoloji.org>. Erişim tarihi: 17.02.2006.
- Aslım, B., Beyatlı, Y. ve Halkman, K. 2000. Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi. Turk. J. Biol., 24; 65–78.
- Atlas, R. M. 1997. Handbook of Microbiological Media. Second Edition. CRR Press, Inc. 1530 s., USA.
- Aydın, F. 2001. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobiyellere Duyarlılıklarının Araştırılması. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.
- Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını Sim Matbaacılık Ltd., 522 s., Ankara.
- Barry, A.L. 1979. Reviews of the progress of Dairy Science: Enzymes of Psychrotropic Bacteria and Their Affects on Milk Products. Journal of Dairy Research, 46; 573–588.
- Baştürk, S. 2005. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Bharath, J., Masodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., Tessaro, K., Thomas, K., Umamaheswaran, M., Simeon, D. and Adesiyun, A. A. 2002. Microbial quality of Domestic and Imported Brands of Bottled Water in Trinidad. International Journal of Food Microbiology, 81; 53–62.
- Bigalke, D. 1985. Dairy Quality Dairy and Food Sanitation. Oct. 388–389.

- Bisping, W. and Amtsberg, G. 1988. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule, 339 s., Hannover.
- Brandt, M, J. and Ledford, R. A. 1982. Influence of Milk Aeration on Growth of Psychrotrophic Pseudomonads. Journal of Food Protection, 45(2); 132–134.
- Brown, V.I. and Lowbury, E. J. L. 1965. Use of an Improved Cetrimide Agar Medium and Other Culture Methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J.Clin. Path., 18; 752–756.
- Collins, E.B. 1979. Heat Resistant Psychrotropic Microorganisms. Journal of Dairy Science, 64; 157–160.
- Çakır, İ. 2003. Laktobasillus ve Bifidobakterlerde Bazı Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 86 s., Ankara.
- Davis, D. B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. S. and Wood, W. B. 1968. Microbiology. 756–757. Hober Medical Division, 774 s., New York.
- Dinsmore, R.P., Meyer, S., Garry, F. and Hirst, H. 2004 Sources of *Pseudomonas* spp. in Bulk Tank Milk on Colorado Dairy Farms <http://www.nmconline.org/articles/pseudsources.htm>. Erişim tarihi: 2004.
- Diren, Ş. 2002. Antibiyogram Yorumu. Çocuklara Akılcı Antibiyotik Kullanımı Sempozyum Dizisi, 33; 19–24.
- Franklin, J. D. 1970. Problems Associated With UHT Processing. J. Applied Bacteri., 33; 365–368.
- Frobisher, M. 1968. Fundamentals of Microbiology. W. B. Saunders Company, 457 s., USA.
- Halkman, K. ve Ayhan, K. 2000. Gıdaların Mikrobiyolojik Analizi 1.Temel İlkeler, 2. Mikroorganizma Sayımı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını. 522 s., Sim Matbaacılık Ltd., Ankara.
- Ilgaz, A. 1999. Özel Mikrobiyoloji Medisan Yayınları, 91–96. Ankara.
- İnal, T. 1990. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. 1108 s., İstanbul.
- İnan, D., Ögünç, D., Günseren, F., Çolak, D., Mamıkoğlu, L. ve Gültekin, M. 2000. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Karşı Direnci. Mikrobiyoloji Bülteni, 34; 255–260.

- Jeppesen, C. 1995. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp From Food and Environment. International Journal of Food Microbiology, 26; 25–41.
- Keskin, D. ve Ekmekçi, S. 2003. *Pseudomonas* Türlerinin Gıdalardan İzolasyon ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(8); 29–33.
- Kılıç, E. 2006. Sözlü görüşme. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı.
- Kılıç, S., Kavas, G. ve Uysal, H. 2000. Süt Teknolojisi Açısından Psikrotrof Bakteriler. Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tebliğler Kitabı. Ed. Mehmet Demirci. Rebel Yayıncılık, 595 s., İstanbul.
- Koçoğlu, F., 1994. Sivas Yöresinde Çeşitli Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas* Türleri ve Bunların Bazı Antimikrobiyellere İn-Vitro Duyarlılıkları. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Sivas.
- Kristiansen, A.K. 1983. Evaluation of Two Selective Media for Rapid Isolation of *Pseudomonas* Strains. Danks Veterianertid Skrift, 66(3); 83–91.
- Kwan, K. K. and Skura, B. J. 1983. Identification of Proteolytic Pseudomonads Isolated From Raw Milk. Journal of Dairy Science, 68; 1902–1909.
- Mansuroğlu, H., Tayşi, B. N., Mut, F. ve Kuştimur, S. 1998. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Florokinolonlara İn-Vitro Duyarlılıkları. Mikrobiyoloji Bülteni, 32; 301–307.
- Masurovsky, E. G., Goldblith, S. A. and Voss J. 1963. Differential medium for Selection and Enumeration of Members of the Genus *Pseudomonas*. J. Bacteriol., 85; 722–723.
- Mead, G. C. 1985. Enumeration of Pseudomonads Using Cephaloridine-Fucidin-Cetrimide Agar (CFC). Int. J. Food Microbiol., 2; 21–26
- Mete, M., Atmaca, S., Gül, K. ve Elçi, S. 1998. Serumun *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarına Antibakteriyel Etkisi. İnfeksiyon Dergisi, 12(3); 385–387.
- Metin, M. 2001. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. E.Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları 374–380. Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir.
- Mickova, V., Lukasova. J. and Konecny, S. 1989. *Pseudomonas aeruginosa* in Raw and Pasteurized Milk. Veterinary Medical, 34(7); 411–419.
- Oxoid Limited. 2004. Web sitesi. <http://www.oxoid.com>. Erişim tarihi: 10.12.2004.

- Özan, M. 1996. Ankara Garnizonundaki Askeri Birliklerin İçme Sularında Membran Filtrasyon Tekniği ile *Pseudomonas aeruginosa*'nın İzolasyonu ve İdentifikasyonu Üzerine Araştırmalar. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans) Tezi, Ankara.
- Özsoy, M. F., Öncül, O., Pahsa, A., Erdem, H. ve Emekdaş G. 2001. Etil Alkol, Povidon İyot ve Benzalkonyum Klorürün *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarına Karşı Etkinliği. Klimik Dergisi, 14(1); 30–32.
- Pelczar, J. M and Reid, D. R. 1958. Microbiology. Kogakusha Company Ltd., 125 s., Tokyo.
- Rashed, A. and Buday, F. 1983. Identification of Psychrotrops Isolated From Cold-stored Raw Milk and Investigation of Their Metabolic Activity. Journal of Dairy Science Abstract, 6506.
- Richardson, B. C. and Tewhaiti, I. E. 1978. Characterization of Heat-Stable Extracellular Proteases for Some Phychrotrophic Bacteria From Raw Milk. Journal of Dairy Science, 13; 172–176.
- Rose, J. M., Enkiri, N.K. and Sulzbacher, W. L. 1971. Substituted Diazenes: Effect on the Growth of Enterobacreaia and Possible Use as Selective Agents for Isolation of Pseudomonads. Applied Microbiology, 22(6); 1141–1146.
- Sands, D. C. and Rovira, A. D. 1970. Isolation of Fluorescent Pseudomonads with a Selective Medium. Applied Microbiology, 20(3); 513–514.
- Sanofi Aventis. 1999. Zephiran (Benzalkonium Chloride) Prescribing Information. Web sitesi. <http://products.sanofi-aventis.us/zephiran/zephiran.html>. Erişim tarihi: 05.06.2006.
- Solberg, M., O'leary, V.S. and Riha, W. E. 1972. New Medium for the Isolation and Enumeration of Pseudomonads. Applied Microbiology, 24(4); 544–550.
- Szita, G. 1998a. A Novel Selective Synthetic Acetamide Containing Culture Medium For Isolating *Pseudomonas aeruginosa* From Milk. International Journal of Food Microbiology, 43; 123–127.
- Szita, G. 1998b. A Novel Selective Synthetic Selective Culture Medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Veterinaria Hungarica, 38(3); 187–194.
- Şengöz, G., Karabela, Ş., Durdu, Y., Yaşar, K., Yıldırım, F., Bakar, M., Koldaş, M. ve Nazlıcan, Ö. 2005. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerde İsepamisin Direncinin Araştırılması ve Diğer Aminoglikozid Dirençleriyle Karşılaştırılması. Klimik Dergisi, 18(1); 41–44.
- Tortora, J. G., Funke, R. B. and Case, L. C. 1992. Microbiology. The Benjamin /Cummings Publishing Company Inc., 523 s., California.

- Tunçbilek, S., Tezeren, T., Balaban, N., Öztürk, S. ve Işılak, İ. 1998. Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa*' ların İn-Vitro Antibiyotik Duyarlılıkları. İnfeksiyon Dergisi, 12(3); 361–364.
- Türkmen, L. 2002. İdrar Örneklerinden İzole Edilen Gram Negatif Örneklerin Değişik Antibiyotiklere Duyarlılığı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9(3); 185–189.
- Vardar, G. ve Ünlü, M., 2001. Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinin Levofloksasin, Siprofloksasin ve Ofloksasine Karşı in-vitro Duyarlılığı. İnfeksiyon Dergisi, 15(3); 311–314.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R. and Boor, K. J. 2000. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated From Milk. Applied and Environmental Microbiology, 66(5); 2085–2095.
- Wilson, S. G. and Miles, A. A. 1964. Principles of Bacteriology and Immunity. 636–643. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- Yapar, N., Ulusoy, S., Arda, B. ve Tünger, A. 1999. Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Köklerinde Beta-Laktamaz Aktivitesi ve Antibiyotik Direnci. İnfeksiyon Dergisi, 13(1); 51–54.
- Yılmaz, S. 1999. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antimikrobiyel Ajanlara Duyarlılığı. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, Van.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aylin (ŞEN) AKOĞLU

Doğum Yeri : Trabzon

Doğum Tarihi : 13.10.1981

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Trabzon Fatih Süper Lisesi (1995-1999)

Lisans : Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü
(1999-2003)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği
Ana Bilim Dalı (2003-2006)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Şenyayla Pastaneleri, Gıda Mühendisi (2003-2004)

Ankara Dedeman Hotel, Hijyen denetçisi (2002- 2006)

Ankara İçkale Hotel, Hijyen denetçisi (2002- 2006)

Ankara Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü Proje Elemanı (2006-....)