



T.C.

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS*
BAKTERİLERİNİN ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE BEKCI

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2009

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS*
BAKTERİLERİNİN ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ

HATİCE BEKÇİ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Ağustos 2009

Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK danışmanlığında Hatice BEKÇİ tarafından hazırlanan “ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS* BAKTERİLERİNİN ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ ” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
(Ünvan, Adı ve Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvan, Adı ve Soyadı) (Üniversite)

Üye :
(Ünvan, Adı ve Soyadı) (Üniversite)

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../2009

Doç.Dr.Nurettin ACIR

Enstitü Müdürü V.

ÖZET

ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS* BAKTERİLERİNİN ANTAGONİSTİK AKTİVİTELERİ

BEKÇİ, Hatice

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

Ağustos 2009, 60 sayfa

Araştırmada *P.fluorescens ssp .indologenes*, *P. vesicularis*, *P. luteola*, *P. paucimolis* ve *P. aeruginosa* türlerine ait toplam 15 adet suş kullanılmıştır. Suşlar farklı çiğ süt örneklerinden izole edilmiştir ve Analitik Profil İndeksin (API 20 NE) kullanımı ile tanımlanmışlardır. Araştırmada, *Pseudomonas* spp. Suşlarının bazı patojen ve kontaminant test bakterileri (*Bacillus subtilis* RSKK 244, *Bacillus subtilis* 1404, *Bacillus subtilis* 2362, *Salmonella* 21.3, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* RSKK 877, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thuriensis*, *Bacillus megaterium* RSKK 5117, *Bacillus cereus* 863, *Staphylococcus aureus* Koag (+), *Escherichia coli* ATCC 35218) üzerindeki genel inhibisyon etkileri agar difüzyon metodu ile incelenmiştir. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerinin *Pseudomonas* suşlarının antimikrobiyal aktivitesinden daha fazla etkilendikleri tespit edilmiştir. *Pseudomonas* suşlarının bazı laktik asit bakterileri (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 53103, *L. planterum* ATCC 20246, *L. helveticus* 75.L. *L. fermentum* DSMS 23271, Z.20.L *L. brevis*, *L. acidophilus* ATCC 4346) üzerinde agar difüzyon metodu kullanılarak antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. *Pseudomonas* suşlarının laktik asit bakterileri üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas* suşları üzerinde önemli ölçüde inhibisyon etki gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Pseudomonas*, İzolasyon, Laktik asit bakterileri, Antimikrobiyal aktivite

SUMMARY

THE ANTAGONISTIC ACTIVITIES OF PSEUDOMONAS BACTERIA ISOLATED FROM THE RAW MILK SAMPLES

BEKÇİ, Hatice

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Associate Professor Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK

August 2009, 60 pages

In the study, a total of fifteen strains belonging to *P.fluorescens ssp .indologenes*, *P. vesicularis*, *P. luteola*, *P. paucimolis* ve *P. aeruginosa* were analysed. Strains were isolated from different raw milk and identified Analytical Profile Index (API 20 NE). The general inhibition of Pseudomonas isolates on pathogenic and contaminated test bacteria (*Bacillus subtilis* RSKK 244, *Bacillus subtilis* 1404, *Bacillus subtilis* 2362, *Salmonella* 21.3, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* RSKK 877, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus megaterium* RSKK 5117, *Bacillus cereus* 863, *Staphylococcus aureus* Koag (+), *Escherichia coli* ATCC 35218) were investigated by using agar diffusion method. From the results, it was determined that *P. aeruginosa* and *E. coli* were significantly inhibited by *Pseudomonas* strains. Antimicrobial effects of *Pseudomonas* strains on some lactic acid bacteria (*L. acidophilus* ATCC 53103, *L. planterum* ATCC 20246, *L. helveticus* 75.L. *L. fermentum* DSMS 23271, Z.20.L *L. brevis*, *L. acidophilus* ATCC 4346) were investigated by using agar diffusion method. It was determined that Pseudomonas strains had showed antimicrobial effect on lactic acid bacteria. However, it was found that lactic acid bacteria had significantly high inhibition effect on *Pseudomonas* strains.

Keywords: *Pseudomonas*, Isolation, Lactic acid bacteria, antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Eğitim süreci içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda desteğini gördüğüm, hoşgörü ortamı içerisinde geniş tecrübesiyle bizlere yön veren, vizyonumuza önderlik eden, kendine güvenen bireyler olarak yetişmemizde büyük rol oynayan, bu tezin başlangıcından en son cümlesine kadar ki her aşamasında çok büyük emeği, fedakarlığı, özverisi olan; her işinde olduğu gibi gerek bu tez gerekse öğrenciliğim dönemimde birlikte çalıştığım zamanlardaki her türlü işte en ince ayrıntılarıyla defalarca ilgilenen; uykusundan, çok değerli zamanından, yemek saatlerinden ödün veren, gerek laboratuvar gerekse yazım aşamasında her bir detayla tek tek ilgilenen, sevgisini, zerafetini, hoşgörüsünü, idealistliğini, ufkunun genişliğini, çalışkanlığını, saygınlığını çok takdir ettiğim; bu süreç zarfında kendisinden çok şey öğrendiğim çok saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK' e, önce beni yaşatan, önüme fırsatlar sunup, doğruyu seçme ayrıcalığı veren, bundan sonra da insanlara yardım etme fırsatını tanıyan, dedem Ahmet SATOĞLU' na, sonsuz teşekkürler olsun.

İlk soluğumdan bugünlere gelmemde harcadıkları çaba ve özveriye; hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini, dualarını esirgemeyen, benimle ağlayıp benimle gülen, başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan, daima karşılıksız sevip ve de çok sevilen, kendileriyle gurur ve onur duyduğum anne ve babam Melahat- Mustafa BEKCI' ye, hayatıma renk katan kardeşim Adem' e, birlikte çalışmaktan mutlu olduğum canım arkadaşım Tuba ÇAYLAK' a ve yardımlarından, dostluklarından, samimiyetlerinden, en zor anlarımda dahi yanımda olmalarından dolayı değerli arkadaşlarım, dostlarım Emel, Özlem ve Zafer' e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
SUMMARY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
FOTOĞRAF DİZİNİ.....	ix
BÖLÜM I.GİRİŞ	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER, PSEUDOMONAS CİNSİ BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	3
2.1 <i>Pseudomonas</i> Cinsi Bakterilerin ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın Genel Özellikleri.....	3
2.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın özellikleri.....	4
2.2 <i>Pseudomonas</i> ların Oluşturduğu Hastalıklar.....	8
2.3 <i>Pseudomonas</i> 'ların Antimikrobiyal Özellikleri.....	11
2.4 Antimikrobiyal duyarlılık.....	14
2.5 <i>Pseudomonas</i> 'ların Süt ve Süt Ürünlerinde Neden Olduğu Sorunlar.....	14
2.6 <i>Pseudomonas</i> 'lar Tarafından Üretilen Ekstraselüler Enzimler ve Meydana Gelen Değişimler.....	16
2.6.1 Proteazlar.....	16
2.6.2 Lipazlar.....	17
BÖLÜM III. MATERYAL METOT.....	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Materyal örnekleri.....	19
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri.....	20
3.1.3. Araştırmada kullanılan test bakterileri.....	22
3.2. Metot.....	24
3.2.1. Bakterilerin izolasyonu	24
3.2.2. Bakterilerin muhafazası.....	25
3.2.3. Bakterilerin tanımlanması.....	25
3.2.4. <i>Pseudomonas</i> spp. uşlarının antimikrobiyal aktiviteleri.....	25
BÖLÜM IV. DENEYSEL BULGULAR.....	28
4.1. <i>Pseudomonas</i> 'ların İzolasyonu.....	28
4.2. <i>Pseudomonas</i> 'ların Tanımlanmaları.....	28
4.3. Antimikrobiyal Aktivite.....	31

4.3.1. <i>Pseudomonas</i> spp suşlarının bazı kontaminant ve patojen mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi.....	31
4.3.2. . <i>Pseudomonas</i> spp suşlarının bazı laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi.....	42
4.3.3. Bazı laktik asit bakterilerinin <i>Pseudomonas</i> spp suşları üzerine inhibisyon etkisi.....	44
BÖLÜM V. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	<i>Pseudomonas</i> cinsi bakterilere ait suşların temin ve izole edildiği kaynaklar.....	19
Çizelge 3.2.	Test bakterilerinin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri...	23
Çizelge 3.3.	Test bakterilerinin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri...	24
Çizelge 4.1.	İnhibisyon gösteren <i>Pseudomonas</i> suşlarının bazı patojen ve kontaminant bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapı mm)..	34
Çizelge 4.2.	<i>Pseudomonas</i> spp suşlarının bazı laktik asit bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisi.....	44
Çizelge 4.3.	Laktik asit bakterilerinin <i>Pseudomonas</i> suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>Salmonella</i> 21.3 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	35
Şekil 4.2.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	..35
Şekil 4.3.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>B. subtilis</i> 2362 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	36
Şekil 4.4.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>Shigella sonnei</i> RSKK 877 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	36
Şekil 4.5.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>S.epidermidis</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	37
Şekil 4.6.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>B. thurugiensis</i> üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	37
Şekil 4.7.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>B. megaterium</i> RSKK 5117 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	38
Şekil 4.8.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>B.subtilis</i> RSKK 244 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	38
Şekil 4.9.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>Staph. aureus</i> Koag (+) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	39
Şekil 4.10.	<i>Pseudomonas</i> suşlarının <i>E.coli</i> ATCC 35218 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları.....	39
Şekil 4.11.	<i>Pseudomonas</i> ssp. suşlarının laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi...	43
Şekil 4.12.	Laktik asit bakterilerin <i>P. aeruginosa</i> H ₉ üzerinde inhibisyon etkisi.....	44

FOTOĞRAF DİZİNİ

Fotoğraf 4.1.	Oksidaz testi negatif (-) sonucu.....	29
Fotoğraf 4.2.	Oksidaz Testi pozitif (+) sonucu.....	29
Fotoğraf 4.3.	<i>P. aeruginosa</i> H ₉ suşunun API 20NE 24 saat inkübasyondan sonraki test sonuçları.....	30
Fotoğraf 4.4.	<i>P. paucimobilis</i> H ₂ , <i>P. aeruginosa</i> H ₉ , <i>P. fluorescens ssp. Indolegenes</i> H ₁₀ API 20NE 48 saat inkübasyondan sonraki sonuçları.....	30
Fotoğraf 4.5.	<i>P. aeruginosa</i> H ₉ ve <i>P. fluorescens ssp. Indolegenes</i> H ₁₀ suşlarının L. fermentum DSMS 23271 Üzerindeki antimikrobiyal etkileri.....	43
Fotoğraf 4.6.	Laktik asit bakterilerin <i>P. fluorescens ssp. indolegenes</i> H ₁₅ suşu üzerine inhibisyon etkisi.....	45
Fotoğraf 4.7.	Laktik asit bakterilerin <i>P. vesicularis</i> H ₈ suşu üzerine inhibisyon etkisi...45	

BÖLÜM I

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 [1].

Süt beslenmede büyük öneme sahip olan temel besin maddesi olmasına karşın birçok mikroorganizmanın üremesi için de mükemmel bir ortam oluşturmaktadır. Süt memede bulunduğu dönemde sterildir, ancak sağım sırasında ve sağımdan sonra çeşitli aşamalarda süte mikroorganizmalar bulaşabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda süttün memede bulunduğu dönemde bile az sayıda ancak insanda hastalık etmeni olmayan mikroorganizma içerdiği gösterilmiştir [2] . 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 [1]. Bu aşamalar sırasıyla; meme kanalı, meme başları ve meme lobunun dış yüzeyi yani hayvanın kendisinden gelen etmenler, sağım aletleri ve süttü tüketiciye ulaştırana kadar bekletme koşullarıdır [2].

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 süt ekipmanları ve hortum başlarında kolonizasyon yapabilmektedirler [1].

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 süt 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 [1, 3].

Yukarıda belirtilen aşamaların hepsini bir süreç olarak kabul ettiğimizde, her bir aşama bu sürecin "Kritik Kontrol Noktaları" (HACCP) olarak kabul edilebilecektir. Hayvanın sağlığından başlayarak sağımda kullanılan araç ve gerecin, sağımdan sonra kullanılan saklama ve taşıma kaplarının temizliğine azami ölçüde dikkat ederek sütte bulunması istenmeyen mikroorganizmaların üremesi kontrol altına alınabilir ya da en aza indirilebilir. Çiğ sütlerde bazı mikroorganizmaların bulunması çevresel kaynaklı kontaminasyonu ve sanitasyon koşullarının yetersizliğini gösterebilir [2].

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. *P. aeruginosa*'nın çeşitli gıda örneklerinde sayımı için Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) ve Setrimide Agar besiyerleri önerilmekle beraber, sanayiden gelen veriler bu besiyerlerinin selektivitesinin *Pseudomonas*'lar için yeterli olmadığı yönündedir [1].

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER, *PSEUDOMONAS* CİNSİ BAKTERİLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Çiğ süt, kendisinden üretilen birçok ürünün hammaddesidir. Bu nedenle, işlenmemiş çiğ sütün içerdiği başlangıç bakteri yükü oldukça önemlidir. Çiğ süt mikroflorası içinde pek çok bakteri yer almakta ve sütün kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Teknolojik açıdan, yüksek bakteri yoğunluğuna sahip sütlerin işlenmesi güçleşmekte, elde edilen ürünlerin kalitesi de düşmektedir. Sütün elde edildiği hayvanın sağlık durumundan, sütün ürüne dönüşüncüye veya tüketiciye ulaşıncaya kadar her aşamada birçok faktör sütün hijyenik kalitesini etkilemektedir [4].

2.1. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin ve *P. aeruginosa*'nın Genel Özellikleri

Pseudomonas cinsi bakteriler, *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alırlar. Bu bakterilerin çoğu doğada toprak ve sulara 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 *P. fluoresans* yeşilimsi, *P. nigrificans* siyah, diğer türleri ise kahverengi pigment oluşturur [5, 6, 7].

Bu cinsin üyeleri, birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından ve ancak birkaç bakterinin tolere edebildiği koşullarda canlılıklarını sürdürebilmeleri nedeni ile klinik açıdan önemlidirler [8]. *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 [9, 10].

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 [11]. *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. *P. aeruginosa* rRNA grup I' e dahil olmuştur [12, 8].

2.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* 'nın özellikleri

2.1.1.1. Tarihçesi

P. aeruginosa, 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. Piyosiyenin izolasyonu Lucke tarafından 1862'de yapılmıştır. Ancak bu organizma, Gessard'ın klasik çalışmaları ile 1882'de saf kültür halinde izole edilmiştir. 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'de Osler patojen bir bakteri olduğunu tanımlamışlardır. 1926 yılında California Üniversitesi'ndeki Dooren de Jong, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerin göre sınıflandırmışlardır. 1966'da Buchanon, Holt ve Lessel *Pseudomonas* türlerini fenotipik özelliklerine göre sınıflamışlardır. Daha sonra DNA hibridizasyon çalışmaları başlamıştır. 1973 yılında Palleroni ve arkadaşları, nükleik asit hibridizasyon çalışmalarını genişleterek *Pseudomonas* 'ları rRNA homolojilerine göre 5 gruba ayırmışlardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu cinsin sınıflandırılması yeniden düzenlenmiştir [13].

2.1.1.2. Morfolojik özellikleri

Uzunlukları çok değişik olmakla beraber *P. aeruginosa* 1,5-3 µm genişliğinde, bazen ikili bazen de kısa zincirler halinde görülen sporsuz, kapsülsüz, çubuk şeklinde aerob bakteridir. Çoğu kez bir uçlarında bir, nadiren iki-üç adet kirpiği 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 [1, 13].

2.1.1.3. Kültürel ve biyokimyasal özellikleri

P. aeruginosa uygun besiyerinde optimum 30-37 °C'lerde ve hafif 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 gösterirler 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 [1, 14].

P. aeruginosa katı besiyerlerinde 3 tip koloni oluştururlar. Tip 1 koloni, 2-3 mm çapında yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, yassı, beyaz renkli karşıdan bakılınca fluoresans 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 koloniler 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 [1, 13, 14].

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 (glukonat yapar). Laktoz ve sakkarozu kullanamazlar.
- Oksidaz pozitif olmaları ile *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden ayrılırlar.
- Asetamini deamine ederek amonyak oluştururlar.
- Nişastaya etki etmezler.
- Katalaz ve sitrat reksiyonları pozitiftir.
- L-arjinin dihidrolaz oluştururken, lisin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturamazlar.
- İndol ve H₂S oluşturamazlar.
- Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer negatiftir.
- Nitratı nitrite redükte ederler.
- Tetrazolium tuzlarını ve seleniti redükte ederler.
- KCN'ye dirençlidirler.
- *Pseudomonas aeruginosa* *P. fluorescens* 'den ayrı olarak metilen mavisini ve prontosilin rengini giderir [1, 8, 13, 14].

Çoğu *Pseudomonas* suşları 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 [13, 14] .

Fluoresan pigmentler, fluoresans 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, fluoresan pigmentlerin üretimini uyarmakta kullanılır. Fluoresan, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen sarımsı renkte bir fluoresan pigmentidir. Bu pigmentin görülebilmesi için bazen UV ışığa ihtiyaç duyulur. King B besiyerinde klinik izolatların %70'i bu pigmenti oluşturur. Fluoresan bir pigment olan piyoverdin, referans bir *Pseudomonas* suşundan (PAO1) izole edilmiştir [13,14] .

Piyosiyenin, mavi bir fenazin türevidir. *P. aeruginosa* için karakteristiktir. Asidifikasyonla rengi önce sarıya sonra da kırmızıya dönebilir, alkali ortamlarda ise renksizleşebilir. Suda ve kloroformda erir. 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 arttırılabilir. 37 °C'de 5 gün inkübe edilen *P. aeruginosa* suşlarının %80'i piyosiyonin oluşturur. Oda sıcaklığında 3-4 gün bırakılarak agar kültürlerinde pigmentasyonda artış gözlenir [1, 13, 14] .

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 [13, 14] .

Piyomelanin, *P. aeruginosa* tarafından üretilen kahverengi, siyah renkte sık gözlenmeyen bir pigmenttir [13] .

Besiyerinde özellikle piyosiyenin ve floouressein pigmentlerinin oluşumu *P. aeruginosa* 'nın tanısı yönünden oldukça önemli bir özelliktir [14] .

P. aeruginosa suşları bakteriosinler üretir ve bunlar aynı türün diğer suşlarını öldürücü etkiye sahiptirler. *P. aeruginosa* bakteriosinleri pyosin adını alır. Brandy'in (1967) yaptığı sınıflandırmaya göre *P. aeruginosa* 'nın bakteriosinleri S ve R tipindedir. S tipi şekilsiz görünümlü ve proteolitik enzimlere duyarlı, R tipi faj komponentleri yapısında ve proteolize duyarlı değildir. Bakteriosin tiplendirilmesinde, duyarlı indikatör suşlara karşı bilinmeyen bir organizmanın ekstraktı ya da bilinen bakteriosinlere karşı bilinmeyen suşun duyarlılığı denir [1].

P. aeruginosa 'larda birçok litik fajlar tanımlanmıştır ve bu fajların morfolojik çeşitliliği en azından diğer bakteri cinslerindeki kadar önemlidir. Aynı O 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 [13].

2.1.1.4. Çeşitli ajanlara karşı dirençlilik

Pseudomonas cinsi bakteriler ısıya dirençsiz bakterilerdir. 55 °C'de 1 saat ve 60 °C'de 15 dakikada ölürlür. Çevre sıcaklığı koşullarında sularda aylarca canlı kalırlar. Özellikle hastane ortamında cerrahi ve yanık servislerinde organik kalıntıların bulunmasına bağlı olarak uzun süre canlı kalabilirler. Steril saf su içinde bile oda sıcaklığında üreyebilirler. Diğer patojenlere göre kimyasal dezenfektanlara daha dirençlidirler. Uygun nem koşulları temin edildiği zaman çeşitli yerlerde üreyebilirler. Dörtlü amonyum bileşiklerinde, hegzoklorofenli sabunlarda, iyotlu solüsyonlar içinde bile üreyebilirler, hatta dörtlü amonyum bileşiklerini besin kaynağı olarak kullanabilirler [13].

2.1.1.5. Epidemiyoloji

P. aeruginosa toprakta, suda, hayvanlarda, bitkilerde ve insanlarda bulunabilir. İnsanlarda önemli bir fırsatçı enfeksiyon etkenidir. Bitkilerde ve hayvanlarda da patojen olabilir. Fiziksel ve kimyasal şartlara oldukça kolay uyum sağlar. Özellikle nemli ortamlarda kolay üreyebilir, insanlarda perine, aksilla ve kulaklarda kolaylıkla kolonize olabilir. Hastanelerde solunum destek cihazları, temizleme solüsyonları, lavabolar, paspaslar gibi her yerde varlıklarını sürdürebilirler [14].

2.2. *Pseudomonas'* ların Oluşturduğu Hastalıklar

P. aeruginosa sağlıklı ve normal insanda hemen nadiren hastalık oluşturur. Oysa özellikle hastane ortamında, bağışlık yanıtı ve savunma sistemleri bozulmuş insanlarda, başka bir deyişle fırsat bulduğunda her sistem ve organda enfeksiyon oluşturabilir. Bunlardan önemli olanlar aşağıda kısaca anlatılmıştır [13].

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 [1,8]. Son yıllarda *Pseudomonas* enfeksiyonlarının hastane ortamlarında gittikçe arttığı gözlenmektedir. Bunun nedeni; gittikçe artan oranda dirençli suşların ortaya çıkması ve bakterilerin daha kolay barınabilmesidir [1, 13].

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 106 dozunda ağızdan alınmasının gastroenteritidis sebebi olabileceği ifade edilmiştir [1] .

2.2.1. Endokardit

P. aeruginosa ilaç bağımlılarında doğal kapakta ve diğerlerinde protez kalp kapağında yerleşerek infektif endokardite neden olur. Kesin tanı pozitif kan kültürü ve cerrahi sırasında alınan kapak ya da endokardiyal örneğin histopatolojik incelenmesi ile konulur [13].

2.2.2. Pnömoni

P. aeruginosa lokal respiratuvar veya sistemik konak savunma sisteminde bozukluk olan kişilerde akut, hayatı tehdit eden bakteremik veya non bakteremik pnömoniye sebep olur. Hastane ortamında özellikle de yoğun bakım biriminde bulunmak, solunum cihazlarının kullanılması ve daha önce antibiyotik kullanmış olmak *P. aeruginosa* pnömonisi olma ihtimalini artırır. Hastane dışı pnömonilerinde ise altta yatan ciddi bir hastalık, kronik akciğer hastalığı predispozan faktörlerdir. Bakteremik pseudomonas pnömonisi kanser kemoterapisi alan nütropenik hastalar ve AIDS hastalarında görülür. Kan dolaşımı invazyonu ile deride ektima gangrenosumun pulmoner karşılığı olan lezyonlar görülür [13].

2.2.3. Bakteremi

Pseudomonas cinsi bakteriler hematolojik malinite, immünglobulin eksikliği, hipokomplementemi, nötropeni, diabetes mellitus, organ transplantasyonu, ağır yanıklar, difüz dermatitler, ve AIDS predispozan faktörlerdir. Özellikle ektima gangrenozum tarzındaki tipik deri lezyonlarının görülmesi *P. aeruginosa* bakteremisi için ayırt ettiricidir [1, 13].

2.2.4. Santral sinir sistemi enfeksiyonları

P. aeruginosa 'nın menenjit ya da beyin absesine neden olması 3 yolla gerçekleşir.

1. Kulak mastoid veya paranasal sinus gibi bir kaynaktan komşuluk yolu ile,
2. Kafa travması, cerrahi, invaziv tanısal girişimler ile subaraknoid aralığa veya beyine direkt inokulasyon,
3. Üriner sistem, endokard, akciğer gibi uzak kaynaktan bakteremi sırasında *P. aeruginosa* kanserli hastalarda görülen menenjitin *Listeria monositogenes*'ten sonra ve beyin absesinin *E. coli* 'den sonra en sık ikinci nedeni olarak bildirilmektedir [1,13].

2.2.5. Kulak enfeksiyonları

P. aeruginosa normal kulakta nadiren bulunmasına rağmen yaralanma, maserasyon, inflamasyon ve nem varsa eksternal kulak yolunda sıklıkla yerleşir. Eksternal otit kendini sınırlayıcı, benign olup yüzmekle çok ilişkilidir. Malin eksternal otit ise ağırlıklı olarak yaşlı diyabetik kişilerde , kısmen de uzun süreli küçük damar hastalığı olanlarda görülür. *P. aeruginosa* kronik süperatif otitis media'lı çocuk ve yetişkinlerin orta ve dış kulak yolundan en sık izole edilen bakteriyel patojendir [1].

2.2.6. Göz enfeksiyonları

P. aeruginosa bakteriyel keratitin en sık nedenlerinden biridir. Bunun dışında endoftalmit, oftalmia neonatarum, blefarokonjonktivit, skleral abse, ve orbital sellülite neden olmaktadır. Kontakt lens kullananlar, ağır yanıklı, komadaki, önceden göz radyasyonu almış olanlar, yoğun bakımda yatanlar ve AIDS hastaları *P. aeruginosa* keratitine aday hastalardır [13].

2.2.7. Kemik ve eklem enfeksiyonları

Hematojen veya komşuluk yolu ile enfeksiyon oluşur. Hematojen enfeksiyonlar daha çok IV ilaç bağımlılarında üriner sistem veya pelvik enfeksiyonu takiben gelişir. Komşuluk yolu ile görülen enfeksiyonlar penetre edici bir travma, cerrahi girişim , yada yumuşak doku enfeksiyonunu takiben gelişir [1, 13].

2.2.8. Üriner sistem enfeksiyonları

P. aeruginosa ile üriner sistem enfeksiyonları çoğunlukla kateterizasyon, sonda veya cerrahi girişime bağlı olarak hastane kökenli ve iatrojeniktir [13, 14].

2.2.9. Gastrointestinal enfeksiyonlar

P. aeruginosa orofarenksten rektuma kadar bütün gastrointestinal sistemde enfeksiyon yapabilir. En sık yenidoğanlarda ve hematolojik malinitesi olanlarda kemoterapiye sekonder nötropeni gelişen hastalarda ortaya çıkar [13, 14].

2.2.10. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

Yanık, travma, dekübit ülseri veya dermatit gibi bütünlüğü bozulmuş deride nem de varsa *Pseudomonas* cinsi bakteri lezyonları deride gelişebilir. Ektima gangrenozum dışında subkutan nodüller, derin abseler, sellülit, veziküler ve püstüler lezyonlar, bül veya nekrotizan fasiit gelişebilir. Lezyonlar lokal veya yaygın olabilir [1, 13].

2.3. *Pseudomonas*'ların Antimikrobiyal Özellikleri

Bakteriler arasında meydana gelen antagonizm 1925'te yayımlanan Gratia'nın denemelerini takiben artık iyi bilinen bir fenomendir [18]. Antagonizm ve substrat rekabetinin, belirli bir ekolojik nişte bir mikrofloranın seçiminde önemli olacağına inanılmaktadır [19]. Antimikrobiyal madde üreten mikroorganizmalar bu ajanlar sayesinde diğer türler üzerinde hakim olurlar [20].

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmaları inhibe edici veya öldürücü etkilerden birine sahip olan biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Mikroorganizmaları inhibe eden maddeler *statik*, öldüren maddeler *sidal* olarak isimlendirilir [21]. Farklı bakteri tür ve cinslerine karşı bakterisidal ve bakteriostatik fonksiyone sahip birçok bakteriyel ürünün olduğu bilinmektedir [18]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünler olan antimikrobiyaller, seçici toksisiteye sahip olduklarından, çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zararlı olup, kendisine zarar vermezler [22].

Pseudomonas cinsine ait türlerin rizosferde antagonistik aktiviteleri oldukça iyi tespit edilmiştir. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin ürettiği antibiyotik benzeri bakteriyosin ve fenazin [19], hidrojen siyanit [23], antibiyotik ve sideroforlar [20] gibi antimikrobiyal maddelerin birçok kök patojeninin baskılanmasında rol aldığı belirlenmiştir. Bundan dolayı antibiyotik üreten *Pseudomonas*'ların etkin bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı ön görülmektedir [24]. Ancak bazı araştırmacılar, *Pseudomonas* spp. suşlarının patojen ve kontaminant bakterilere karşı inhibitörük etki gösterdiğini de bildirmişlerdir [25, 19, 26]. Isnansetyo ve arkadaşları, *Pseudomonas* cinsi bakterilere ait ikincil metabolitlerin hem Gram-negatif ve hem de Gram-pozitif bakteriler için bakteriyolitik olduğu belirlenmiştir [27].

Biyolojik hidrojen siyanit (HCN), mantar, yüksek bitkiler ve böcekler gibi organizmaların yanı sıra *Pseudomonas* ve *Chromobacterium* bazı bakteri cinsleri tarafından da üretilmektedir [23]. HCN, bir çok mikroorganizmanın gelişimini inhibe edici etkisi olan bir ikincil metabolittir [28].

Fenazin, *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen antifungal antibiyotik benzeri maddelerdir [29].

Fluoresens *Pseudomonas*'lar tarafından üretilen sideroforlar (piyoverdin, salisilat ve piyoselin) diğer mikroorganizmaların inhibisyonuna neden olmaktadır [30].

2,4-Diasetilfloroglukinol (DAPG), *Pseudomonas*'lar tarafından üretilen önemli bir antifungal antibiyotiktir. Ancak yapılan araştırmalar bu antibiyotiğin, hem Gram-negatif ve hem de Gram-pozitif bakterilere karşı da bakteriyolitik olduğunu göstermektedir [27].

2.4. Antimikrobiyal duyarlılık

Toplumdan kazanılmış *P. aeruginosa* izolatları genellikle antipseudomonal penisilinlere (tikarsilin ve piperasilin), aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin), siprofloksasin'e, sefoperazon'a, seftazidim'e, meropenem'e ve imipenem'e hassastır. Antistafilokokkal penisilinler, sulbaktam-amfisilin, amfisilin, amoksisilin, amoksilin-klavulanik asid, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, trimetoprim sulfametaksazol, nalidiksik asid'e doğal olarak dirençlidir. Tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, kloramfenikol, sefiksim, sefodoksime ise kural olarak dirençlidir. Tikarsilin, piperasilin, seftazidim, sefepim, sefpirom, sefoperazon, karbapenemler ve aztreonam antipseudomonal beta laktamlardır [1]. *Pseudomonas aeruginosa* genetik olarak bir çok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra kemoterapi sırasında da çoğul dirençli suşlar ortaya çıkabilmektedir [13]. Bu direnç mekanizmaları başlıca řu şekildedir:

- Beta laktamaz salınmasına bağlı direnç; Kromozomal ve plazmid kaynaklı beta laktamazların üretimi.
- Antibiyotik hedeflerinde değişiklik sonucu oluşan direnç; Penisilin bağlayan proteinler (PBP)'deki değişime bağlı olan bu direnç Gram negatif bakterilerde yaygın değildir. Bununla birlikte pseudomonas cinsi bakterilerde beta-laktamaz üretmeyen suşlardaki penisilin direncine düşük afiniteli PBP'ler neden olur .
- Dış membran geçirgenliğinin azalması ile kazanılan direnç; Porin proteinlerinde değişiklik.
- Aktif dışa pompalama sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılmasına bağlı direnç.

2.5. *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 [1].

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 [1].

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 [13]. 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 renginde, kokusunda, yapı ve kıvamında birçok değişiklikler olduğu tespit edilmiştir [7].

Pseudomonas' ların süt ürünlerinde iki şekilde bozulmaya neden olduğunu bildirmiştir. Bunlardan birincisi yukarıda anlatıldığı gibi proteaz ve lipaz gibi ekstraselüler enzimler nedeniyle, ikincisi ise pastörizasyon sonrasında başta *P. aeruginosa* olmak üzere sütün birçok bakteri ile kontaminasyonu nedeniyle, süt ürünlerinin buzdolabı sıcaklığında depolanması sırasında bozulması olarak belirlenmiştir [31].

Psikrotroflardan *P. fragi'* nin tereyağında meyvemsi kokulara ve bozulmaya neden olduğu, *P. putrefaciens'* in proteoliz ve çürüme yaptığı, *P. nigrificans'* in 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 adet/mL düzeyinde psikrotrof içeren sütlerden yapılan Camembert tipi peynirlerde kalite azalışı tespit edilmiş ve bu kalite azalışında özellikle *Pseudomonas* türlerinin etkili olduğu belirlenmiştir [1].

Pseudomonas' ların sütün tazeliğini bozması yanında bazen de çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle fırsatçı patojen olarak bilinen *P. aeruginosa*'nın, sütün çok fazla tüketildiği 0-3 yaş grubu çocuklarda süt kaplarının temizliğine dikkat edilmediğinde bulaşarak hastalıklara ve salgınlara yol açtığı ifade edilmiştir. 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 [31].

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 [1].

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

2.6.1. 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 *P. 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 1-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 [1].

Psikrotrofların en önemlisi olan *Pseudomonas*' lara ait proteazların, kazeini parçaladığı 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 [18].

Cheddar ve Cottage peynirlerinde tespit edilen ve psikrotrof proteazlara bağlı olarak ortaya çıkan sorunların en çok *P. fluorescens* P₂₆ suşu ile ilişkili olduğunu, bu ilişkinin neticesinde ürünlerin kalitelerinin düştüğünü ve proteoliz değerlerinde artış olduğunu belirlemiştir [32].

Pseudomonas spp. MC60 suşuna ait proteazın ısıl işlemlere olan dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla yapılan araştırma sonucunda söz konusu suşa ait bu enzimin ısıya olan direncinin *B. stearothermophilus* sporlarından 4000 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [18].

2.6.2. 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 [1, 13].

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 aşılansmış sütlerden yapılan peynirlerde, serbest yağ asidi konsantrasyonlarının oldukça yüksek seviyede olduğu belirlenmiş ve bunun ısıya dayanıklı lipolitik enzimler ile gerçekleştiği tespit edilmiştir [32].

İsviçre peynirleri üzerinde yapılan bir çalışmada, *P. 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, *P. fluorescens* AR11 suşu ile benzer bir çalışma gerçekleştirmiş ve 2 aydan daha uzun süre depolanmış çiğ sütlerde acılık belirlemişlerdir Psikrotroflara ait lipazların ısıl 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 °C / 17 saniye) canlı kalabildikleri ve lipazların da proteazlar gibi sütteki sulu tampon çözeltilerde daha fazla sıcaklığa dayandıkları tespit edilmiştir [33] .

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 sistemidir. Sütte doğal olarak bulunan laktoperoksidaz ve tiyosiyanat, sütte doğal olarak bulunmayan ancak yapay olarak eklenen veya katalaz negatif bakteriler tarafından üretilen H_2O_2 ile birleştiğinde antimikrobiyel bir sistem oluşturmaktadır. Bu sistem özellikle streptokoklar ve Gram negatif bakteriler özellikle *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 [1] .

Bir araştırmada inek sütüne 0,25 mM tiyosiyanat ve eşdeğer miktarda H_2O_2 ilave edildiğinde çiğ sütün raf ömrünün 48 saatten 5 güne uzadığı belirlenmiştir [7] . Gerek *Lactobacillus bulgaricus* gerekse diğer laktik asit bakterilerinin katalaz enzimi oluşturmadığı için, gelişim esnasında meydana getirdikleri H_2O_2 ' in de *Staphylococcus aureus*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* spp. gibi patojen ve kontaminant bakterilere karşı inhibisyon etkisinin olduğu ileri sürülmektedir [34] .

BÖLÜM III

MATERYAL METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Çalışmada Kayseri ve Niğde illerinden toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen 15 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri kullanılmıştır. Bu bakterilerin temin edildiği kaynaklar ve kodları Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Pseudomonas* cinsi bakterilere ait suşların temin ve izole edildiği kaynaklar

No	Bakteri	Temin Edildiği Kaynak	Optimum Gelişme Sıcaklığı (°C)
1	<i>P. luteola</i> H ₁	Kayseri ili çiğ süt örnekleri	37 °C
2	<i>P. paucimobilis</i> H ₂	Kayseri ili çiğ süt örnekleri	37 °C
3	<i>P. vesicularis</i> H ₃	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
4	<i>P. vesicularis</i> H ₄	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
5	<i>P. vesicularis</i> H ₅	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
6	<i>P. vesicularis</i> H ₆	Kayseri ili çiğ süt örnekleri	37 °C
7	<i>P. vesicularis</i> H ₇	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
8	<i>P. vesicularis</i> H ₈	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
9	<i>P. aeruginosa</i> H ₉	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
10	<i>P. fluorescens</i> ssp. <i>İndolegenes</i> H ₁₀	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
11	<i>P. fluorescens</i> ssp. <i>İndolegenes</i> H ₁₁	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
12	<i>P. fluorescens</i> ssp. <i>İndolegenes</i> H ₁₂	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
13	<i>P. fluorescens</i> ssp. <i>İndolegenes</i> H ₁₃	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
14	<i>P. fluorescens</i> ssp. <i>İndolegenes</i> H ₁₄	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C
15	<i>P. fluorescens</i> ssp. <i>İndolegenes</i> H ₁₅	Niğde ili çiğ süt örnekleri	37 °C

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Bakterilerin izolasyon alışmalarında *Pseudomonas* Selective CN, CFC Agar Base (Merck 1.07620), McConkey Agar (Merck) ve Setrimide Agar besiyortamları kullanılmıştır [35] .

Pseudomonas Selective CN, CFC Agar Base (Merck 1.07620)

Maddeler	g/ L
Peptone from gelatine	16,0 g/L
Casein hydrolysate	10,0 g/L
Potassium sulfate	10,0 g/L
Magnesium chloride	1,4 g/L
Agar-agar	11,0 g/L
Gliserol	10,0 mL

500 mL damıtık su içinde 24,2 g dehidre besiyeri ve 5 mL gliserol (Merck 1.04091) kaynatılarak özölür ve otoklavda 121 oC'da 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası besiyeri 45-50 °C'a soğutulur ve *Pseudomonas* CN Agar için 1 şişe *Pseudomonas* CN Selective Supplement (Merck 1.07624) ya da *Pseudomonas* CFC Agar için 1 şişe *Pseudomonas* CFC Selective Supplement (Merck 1.07627) eklenir ve Petri kutularına dağıtılır. Besiyeri 45-50 °C'da 4 saatten fazla tutulmamalıdır. Her iki selektif katkı da 2 mL eşit hacimde alkol/su karışımı içinde özölür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve renksiz olup, otoklav sonrası 25 °C'da pH'sı 7,1±0,2'dir.

Setrimit Agar Besiyortamı

Maddeler	g/L
Agar	13,6
K ₂ SO ₄	10,0

MgCl ₂	1,4
Setrimit	0,3
Gliserol	10,0 mL

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH'le 7,2±0,2'ye ayarlanmıştır. Besiortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Araştırmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının laktik asit bakterilerine karşı ve laktik asit bakterilerinin bu suşlara karşı inhibisyon etkilerinin belirlenmesinde MRS (Man Rogosa and Sharpe) sıvı besiortamı ve Elliker sıvı besiortamı kullanılmıştır [35].

MRS (Man Rogosa and Sharpe) Sıvı Besiortamı

Maddeler	g/L
Pepton	10,0
Beef Ekstraktı	10,0
Yeast Ekstraktı	5,0
Glikoz	20,0
Tween 80	1,08 mL
K ₂ HPO ₄	2,0
Sodyum Asetat. 3 H ₂ O	5,0
Tri Amonyum Sitrat	2,0
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .4 H ₂ O	0,05

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH'le $6,2\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına % 1,5 oranında agar ilave edilip katı besiyeri hazırlanmıştır. Besiortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Pseudomonas cinsi bakterilerin genel inhibisyon ve antimikrobiyal çalışmalarında nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır [35].

Nutrient Sıvı Besiortamı

Maddeler	g/L
Beef Ekstraktı	1,0
Yeast Ekstraktı	2,0
Pepton	5,0
Sodyum Klorür	5,0

Maddeler 1000 mL distile suya ilave edilmiştir. Besiortamının pH'sı 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH'le $6,8\pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına % 1,5 oranında agar ilave edilip katı besiortamı hazırlanmıştır. Besiortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.1.3. Araştırmada kullanılan test bakterileri

Genel inhibisyon çalışmasında test bakterileri olarak *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Bacillus subtilis* 1404, *Bacillus subtilis* 2362, *Salmonella* 21. 3, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* RSKK 877, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus megaterium* RSKK 5117, *Bacillus cereus* 863, *Staphylococcus aureus* Koag (+), *Escherichia coli* ATCC 35218 kullanılmıştır.

Test bakterileri nutrient sıvı besiyortamında 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Test bakterilerin temin edildikleri kaynak ve inkübasyon dereceleri Çizelge 3.2 'de verilmiştir. Bu bakteriler yatkı Nutrient katı besiyortamında +4°C'de muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.2. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri

Bakteri Suşları	Temin Edildiği Kaynak	İnkübasyon Derecesi
<i>Bacillus subtilis</i> RSKK 244	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Bacillus subtilis</i> 1404	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Bacillus subtilis</i> 2362	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Salmonella</i> 21.3	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Shigella sonnei</i> RSKK 877	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Bacillus thuringiensis</i>	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Bacillus megaterium</i> RSKK 5117	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Bacillus cereus</i> 863	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Staphylococcus aureus</i> Koag (+)	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	G. Ü. F. F.	37 ⁰ C

G.Ü.F.F. : Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı

Laktik asit bakterilerine karşı inhibisyon etkilerinin belirlenmesinde test bakterileri uygun besi ortamlarına (MRS sıvı besi ortamları) aşılansarak, 16-18 saat inkübasyonla aktifleştirilmişlerdir. Bu bakterilerin temin edildikleri kaynak ve inkübasyon dereceleri Çizelge 3.3' de verilmiştir. Bakteriler gliserollü ortamda -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri

Bakteri Suşları	Temin Edildiği Kaynak	İnkübasyon Derecesi
<i>Z.20L Lactobacillus brevis</i>	G. Ü. F. F.	30 ⁰ C
<i>Lactobacillus helveticus</i> 75.L.	G. Ü. F. F.	30 ⁰ C
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSMS 23271	G. Ü. F. F.	30 ⁰ C
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	G. Ü. F. F.	30 ⁰ C
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 20246	G. Ü. F. F.	30 ⁰ C
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 53103	G. Ü. F. F.	30 ⁰ C

G.Ü.F.F. : Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Çiğ süt (Kayseri ve Niğde İlleri ve Civarı) örneklerinden 1 mL'si, 10 mL steril fizyolojik su içinde kuvvetlice çalkalanmıştır. Homojen hale getirilen örneklerden 10⁻¹' den 10⁻⁷'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlanarak, 10⁻³ dilüsyondan itibaren McConkey agar plakları üzerine 0,1 mL ekimler yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinde gelişen koloniler seçilerek, Setrimit agar plaklarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır(28). İnkübasyondan sonra tesadüfi seçimler yapılmış ve Gram boyama yapılarak mikroskop altında incelenmiştir [36].

3.2.2. Bakterilerin muhafazası

Suşlar % 15 lik gliserolde -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir.

3.2.3. Bakterilerin tanımlanması

İzole edilen bakteriler, ilk olarak koloni yapılarına, gram boyamalarına, katalaz aktivitesine, oksidaz, +4⁰ ve + 42⁰ üremelerine göre değerlendirilmiştir. *Pseudomonas* spp. olarak tanımlanan suşlar daha ileri bir tanımlama için Analitik Profil İndeksin kullanımı ile (API 20NE; Biomerieux, Marcy l’Étoile, France) tür düzeyinde karakterize edilmişlerdir.

3.2.4. *Pseudomonas* spp. uşlarının antimikrobiyal aktiviteleri

3.2.4.1. *Pseudomonas* spp suşlarının bazı kontaminant ve patojen mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi (genel inhibisyon)

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* suşları uygun inkübasyon sıcaklıkları ve uygun besi ortamlarında aktifleştirilmiştir. Aktif kùltürler 5000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan berrak kısım (süpernatant) steril şartlar altında 0,45 µm’lik disposable filtre ile mikrofiltrasyon yolu ile sterilize edilmiştir.

Çalışmada test bakterileri olarak *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Bacillus subtilis* 1404, *Bacillus subtilis* 2362, *Salmonella* 21.3, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* RSKK 877, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus megaterium* RSKK 5117, *Bacillus cereus* 863, *Staphylococcus aureus* Koag (+), *Escherichia coli* ATCC 35218 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besiyortamında uygun inkübasyon sıcaklıklarında (Çizelge 3.2) 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Aktif kültürler (50 µL) steril petri kaplarına aktarılmıştır. Daha önceden hazırlanan ve 50 °C'ye kadar soğutulan steril 20 mL Nutrient katı besiyeri plaklara aktarılmıştır. Besiyortamı ve test bakterilerinin homojen bir şekilde karışması sağlanmış ve bir süre besiyerinin donması için buzdolabında 2 saat süre ile bekletilmiştir. Donan katı besiyeri üzerinde 0,6 cm çapındaki steril çubukla kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanları steril agarla sıvanmıştır. Kuyulara *Pseudomonas* spp. suşlarının mikrofiltrasyonu ile sterilize edilen süpernatantından 100 µL ilave edilmiştir. Petri kapları Çizelge 3.2' de belirtilen uygun inkübasyon sıcaklıklarında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyu çevresinde oluşan zonların çapı kumpas ile ölçülmüştür.

3.2.4.2. *Pseudomonas* spp. suşlarının birbirlerine karşı inhibisyon aktivitesinin tespiti

Pseudomonas suşlarının birbirlerine karşı inhibisyon etkilerinin incelenmesi, bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.4.3. *Pseudomonas* spp. suşlarının bazı laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi

Z.20L. *L. brevis*, *L. helveticus* 75.L., *L. fermentum* DSMS 23271, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. plantarum* ATCC 20246, *L. acidophilus* ATCC 53103 test bakterileri olarak kullanılmıştır. Test bakterileri uygun besi ortamında (MRS) ve uygun inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilmişlerdir.

Pseudomonas cinsine ait suşların bazı laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi, bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.4.4. Bazı laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas* spp. suşları üzerine inhibisyon etkisi

Pseudomonas cinsine ait bakteriler test bakterileri olarak kullanılmıştır. Test bakterileri Nutrient sıvı besi ortamında ve uygun inkübasyon sıcaklıklarında geliştirilmiştir.

Laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas* cinsi bakteriler üzerine inhibisyon etkisi, bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

BÖLÜM IV

DENEYSEL BULGULAR

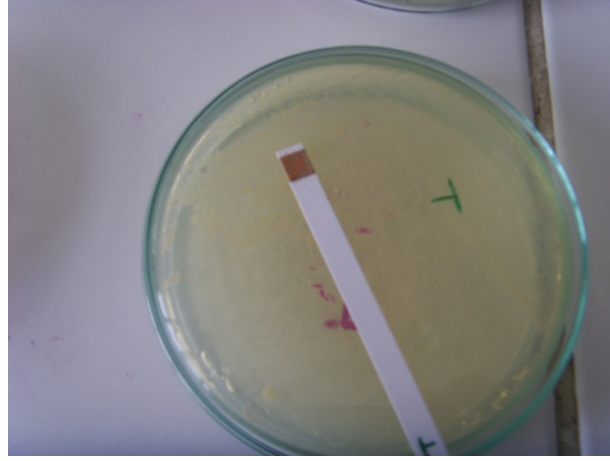
4.1. *Pseudomonas*'ların İzolasyonu

Çalışmada 15 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri suşu kullanılmıştır. Bu bakterilerin hepsi çiğ süttten izole edilmiştir (Çizelge 3.1). *Pseudomonas* suşlarının çiğ süt örneklerden izolasyonu bölüm 3.2.1'de verildiği gibi yapılmıştır. İzolatlar gliseroll ortamda muhafazaya alınmıştır(Bölüm 3.2.2). Oksidaz testinin sonuçları Resim 4.1. ve 4.2.' de olduğu gibi pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

Pseudomonas suşlarının izolasyonu bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmış ve izolatlar gliserollü ortamda muhafazaya alınmıştır.

4.2. *Pseudomonas*'ların Tanımlanmaları

Pseudomonas'ların tanımlanmaları, bölüm 3.2.4.'de belirtildiği gibi yapılmıştır. API 20NE testinin sonuçları Resim 4.3. ve 4.4.' de olduğu gibidir.



Fotoğraf 4.1. Oksidaz testi negatif (-) sonucu



Fotoğraf 4.2. Oksidaz Testi pozitif (+) sonucu



Fotoğraf 4.3. *P. aeruginosa* H₉ suşunun API 20NE 24 saat inkübasyondan sonraki test sonuçları



Fotoğraf 4.4. *P. paucimobilis* H₂, *P. aeruginosa* H₉, *P. fluorescens* ssp. *Indolegenes* H₁₀ API 20NE 48 saat inkübasyondan sonraki sonuçları

4.3. Antimikrobiyal Aktivite

4.3.1. *Pseudomonas* spp suşlarının bazı kontaminant ve patojen mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi

Pseudomonas spp. suşlarının genel inhibisyon aktivitesinin tespiti bölüm 3.2.4. 'de verildiği gibi yapılmıştır. Suşların, test bakterileri olarak seçilen, *Bacillus subtilis* RSKK 244, *Bacillus subtilis* 1404, *Bacillus subtilis* 2362, *Salmonella* 21.3, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* RSKK 877, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus megaterium* RSKK 5117, *Bacillus cereus* 863, *Staphylococcus aureus* Koag (+), *Escherichia coli* ATCC 35218 Çizelge 4.1. de verilmiştir.

Salmonella 21.3 test bakterisi üzerinde, *P. luteola* H₁, *P. paucimobilis* H₂, *P. vesicularis* H₄, *P. vesicularis* H₆ (minimum zon çapı 3,4 mm), *P. vesicularis* H₈, *P. aeruginosa* H₉ (maksimum zon çapı 18,2 mm), *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₅ suşları inhibisyon etkisi gösterirken, *P. vesicularis* H₃, *P. vesicularis* H₅, *P. vesicularis* H₇, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₀, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₁, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₂, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₃, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₄ suşları inhibisyon etkisi göstermemiştir (Şekil 4.1.).

P. aeruginosa ATCC 27853 test bakterisi üzerinde *P. luteola* H₁ ve *P. vesicularis* H₅ suşları inhibisyon etkisi göstermemiştir. Aynı test bakterisi üzerinde *P. paucimobilis* H₂, *P. vesicularis* H₃, *P. vesicularis* H₄, *P. vesicularis* H₆, *P. vesicularis* H₇, *P. vesicularis* H₈, *P. aeruginosa* H₉, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₀ (minimum zon çapı 1,8 mm), *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₁ (maksimum zon çapı 21,1 mm) , *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₂, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₃, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₄, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₅ suşları inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 4.2.).

P. paucimobilis H₂, *P. vesicularis* H₅, *P. aeruginosa* H₉ suşları *B. subtilis* 2362 test bakterisi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Maksimum zon çapı *P. aeruginosa* H₉ (

12,7 mm) suşunda tespit edilirken, minimum zon çapı *P. vesicularis* H₅ (3,1mm) olarak belirtilmiştir. Suşların *B. subtilis* 2362 üzerine olan inhibisyon etkisi Şekil 4.3. ' te verilmiştir.

Suşlardan yalnız *P. aeruginosa* H₉ suşunun test bakterilerinden *B. subtilis* 1404 üzerinde 11,3 mm zon çapında inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir(Çizelge 4.1).

P. paucimobilis H₂, *P. vesicularis* H₈, *P. aeruginosa* H₉ suşlarının *Shigella sonnei* RSKK 877 test bakterisi üzerinde gösterdiği zon çapları sırasıyla 8,1; 4,7; 10,4 mm olarak belirlenmiştir (Şekil4.4.).

Suşlardan *P. paucimobilis* H₂, *S. epidermidis* üzerinde 8,2 mm, aynı test bakterisi üzerinde *P. vesicularis* H₆ 3,8 mm ve *P. aeruginosa* H₉ 10,4 mm inhibisyon zon çapları göstermiştir. *S. epidermidis* üzerinde inhibisyon etkisi olan *P. paucimobilis* H₂, *P. vesicularis* H₆ ve *P. aeruginosa* H₉ suşlarının inhibisyon etkisi Şekil 4.5. ' da verilmiştir.

Test bakterilerinden *B. thuringiensis* üzerinde 7,7 mm zon çapıyla *P. paucimobilis* H₂ ve 9,1 mm zon çapıyla *P. aeruginosa* H₉ inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil4.6.).

P. paucimobilis H₂, *P. vesicularis* H₆, *P. aeruginosa* H₉ suşları *B. megaterium* RSKK 5117 test bakterisi üzerinde sırasıyla 4,9 mm, 6,7mm, 9,3 mm zon çapı ile inhibitörük etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

Suşlardan yalnız *P. aeruginosa* H₉ suşu 7,1 mm zon çapıyla *B. cereus* 863 üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir (Çizelge 4.1.).

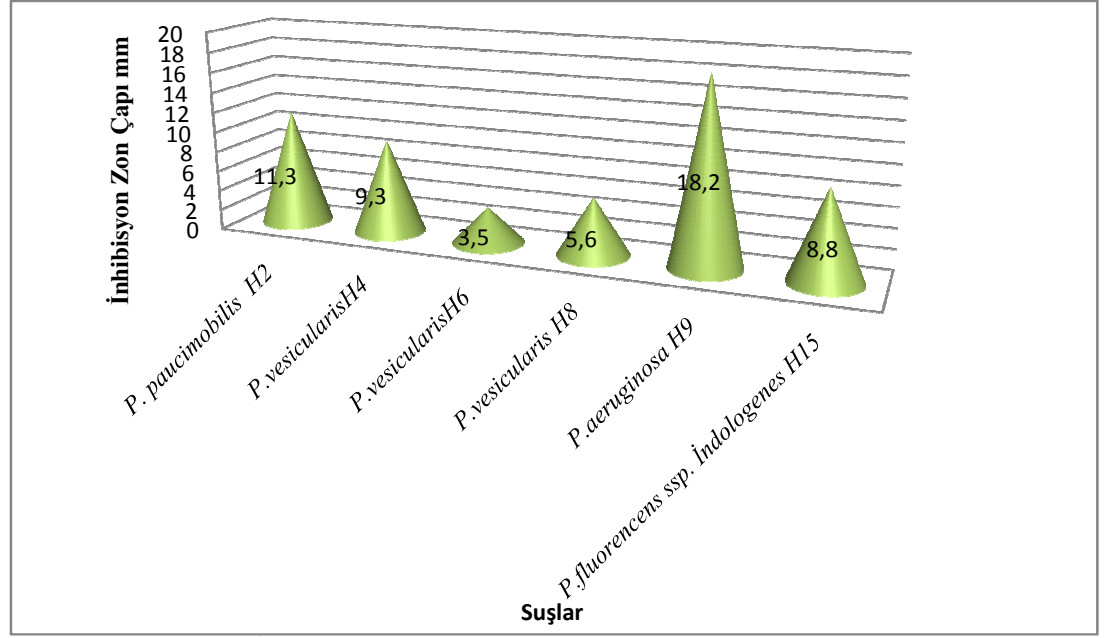
B.subtilis RSKK 244 test bakterisi üzerinde *P. paucimobilis* H₂ suşu 6,3 mm zon çapıyla, *P. vesicularis* H₆ 3,9 mm zon çapıyla ve *P. aeruginosa* H₉ suşu 7,1 mm zon çapıyla inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 4.8.).

P. paucimobilis H₂ ve *P. aeruginosa* H₉ suşları *S. aureus* Koag (+) test bakterisi üzerinde 4,8 mm ve 6,4 mm zon çapları göstermiştir (Şekil 4.9.).

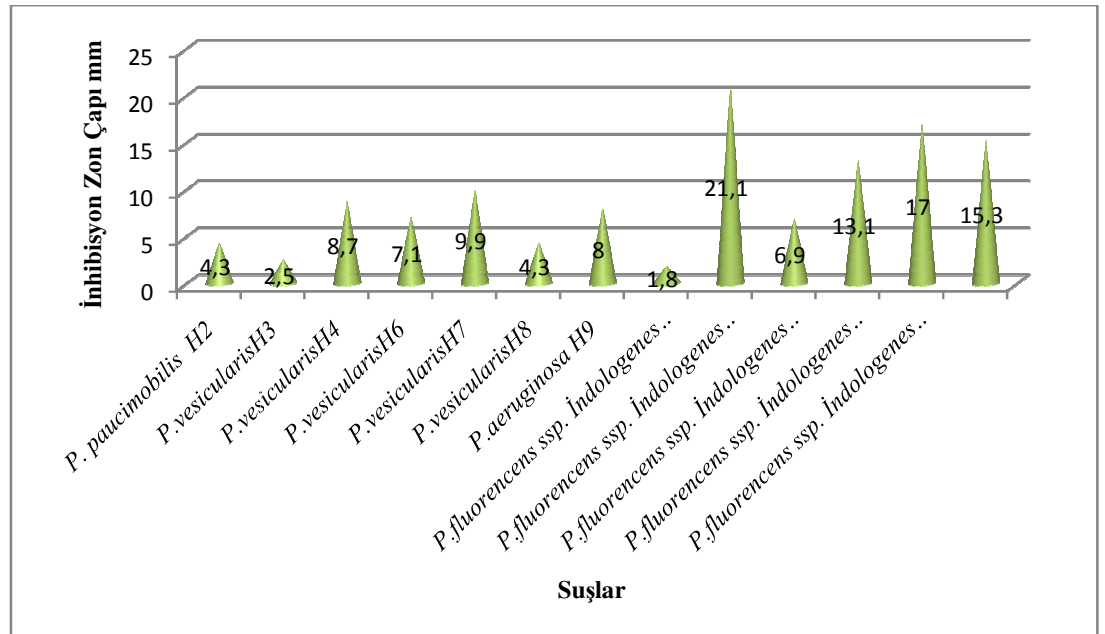
P. paucimobilis H₂, *P. vesicularis* H₃, *P. vesicularis* H₆, *P. aeruginosa* H₉, *P. fluorescens ssp. Indolegenes* H₁₁ suşları *E.coli* ATCC 35218 test bakterisi inhibisyon zon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir. Maksimum zon çapı *P. aeruginosa* H₉ (10,1 mm) suşunda tespit edilirken, minimum zon çapı *P. vesicularis* H₆ suşunda (1,4 mm) belirlenmiştir. Belirlenen bu çaplar Şekil 4.10. ' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İnhibisyon gösteren *Pseudomonas* suşlarının bazı patojen ve kontaminant bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapı mm)

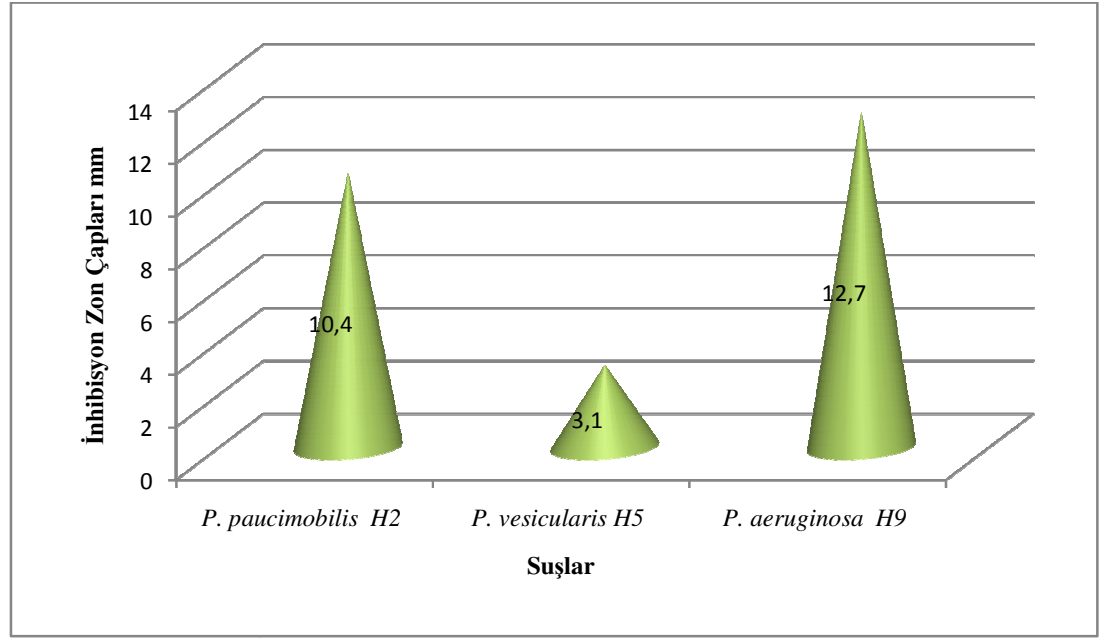
Bakteri Adı	Patojen Bakteriler													
	<i>Salmonella</i> 21,3	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. subtilis</i> 2362	<i>B. subtilis</i> 1404	<i>Shigella sonnei</i> RSKK 877	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. megaterium</i> RSKK 5117	<i>B. cereus</i> 863	<i>B. subtilis</i> RSKK 244	<i>Staph. aureus</i> Koag (+)	<i>E. coli</i> ATCC 35218		
H ₁	10,8 ±2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₂	11,3±2,3	8,7±1,5	10,4±4,8	-	8,2±0,6	8,2±0,6	7,7±1,1	4,9±1,7	-	6,3±1,7	4,8±0,0	7,5±3,9		
H ₃	-	7,4±7,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3±2,3		
H ₄	9,3±1,1	5,6±5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₅	-	-	3,1±3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₆	3,4±3,4	7,1±7,1	-	-	-	3,8±3,8	-	6,7±2,5	-	3,9±3,9	-	1,4±1,4		
H ₇	-	9,9±1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₈	5,6±0,8	4,3 ± 4,3	-	-	4,7±1,9	-	-	-	-	-	-	-		
H ₉	18,2±2	8,0±1,4	12,7±3,8	11,3±0,9	10,4±2,2	10,4±2,2	9,1±1,5	9,3±0,5	7,1±1,3	7,7±1,1	6,4±0,4	10,1±1,3		
H ₁₀	-	1,8±1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₁₁	-	21,1±2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,7±7,7		
H ₁₂	-	6,9±6,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₁₃	-	13,1±0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₁₄	-	17±6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
H ₁₅	8,8±8,8	15,3±4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		



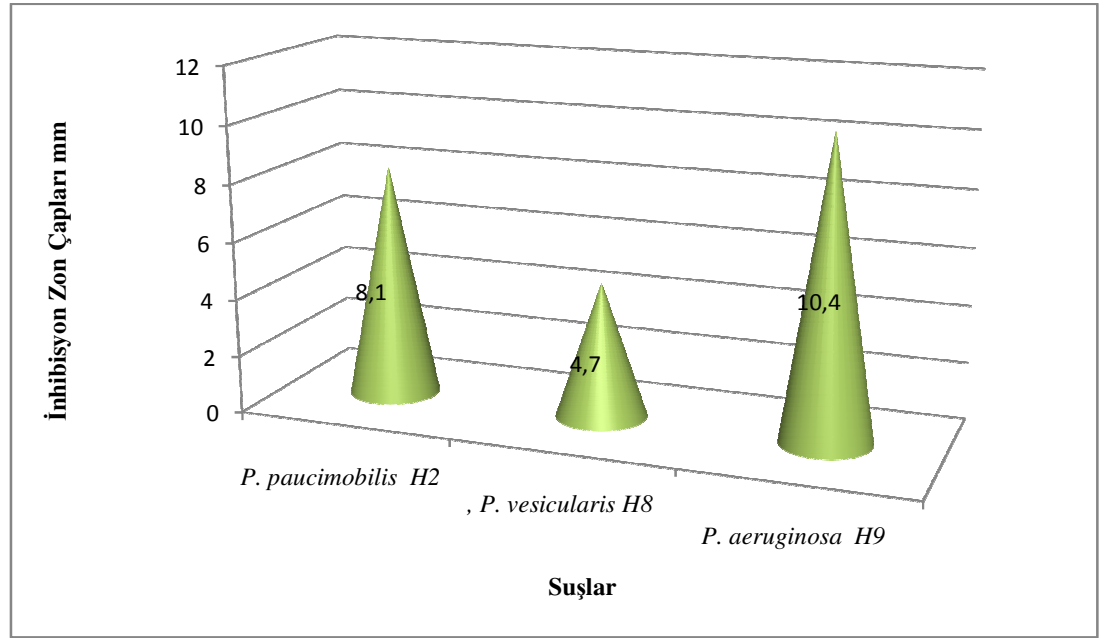
Şekil 4.1. *Pseudomonas* suşlarının *Salmonella* 21.3 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



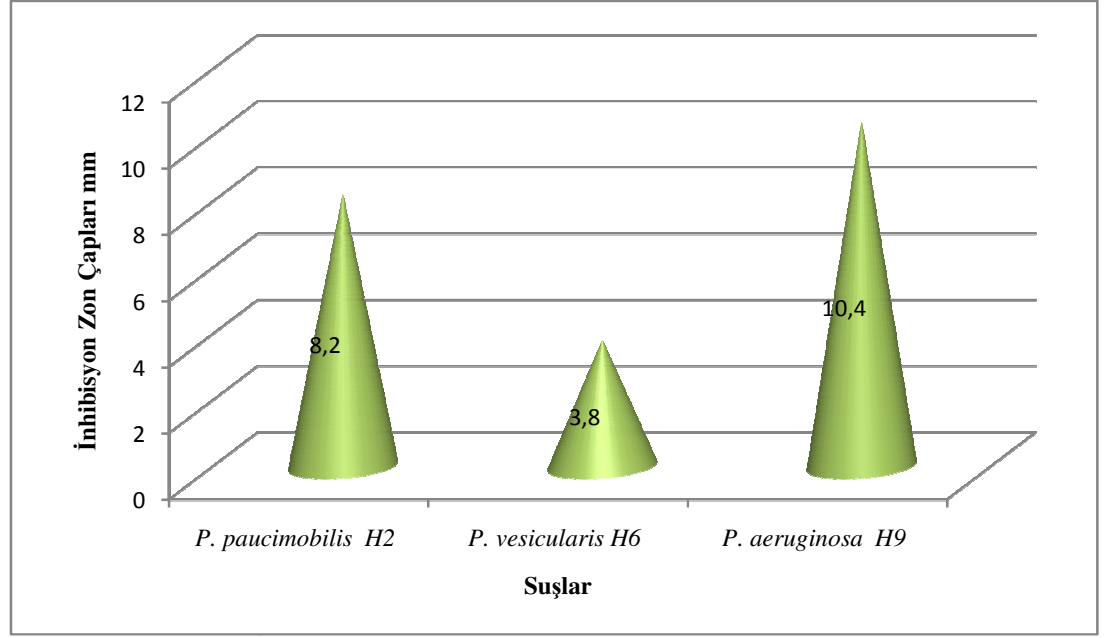
Şekil 4.2. *Pseudomonas* suşlarının *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



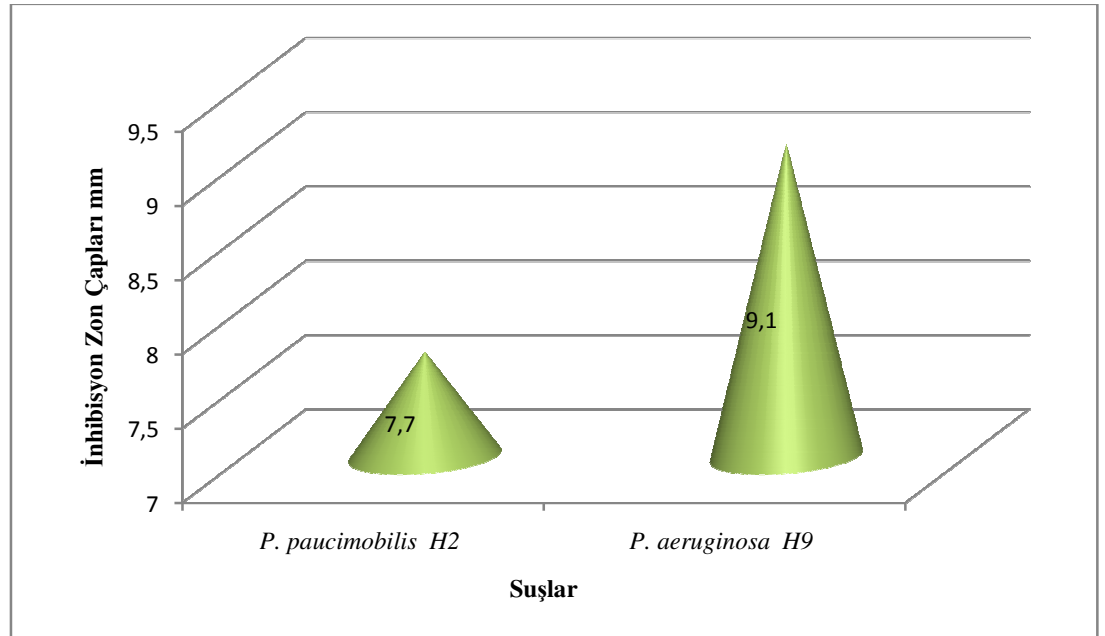
Şekil 4.3. *Pseudomonas* suşlarının *B. subtilis* 2362 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



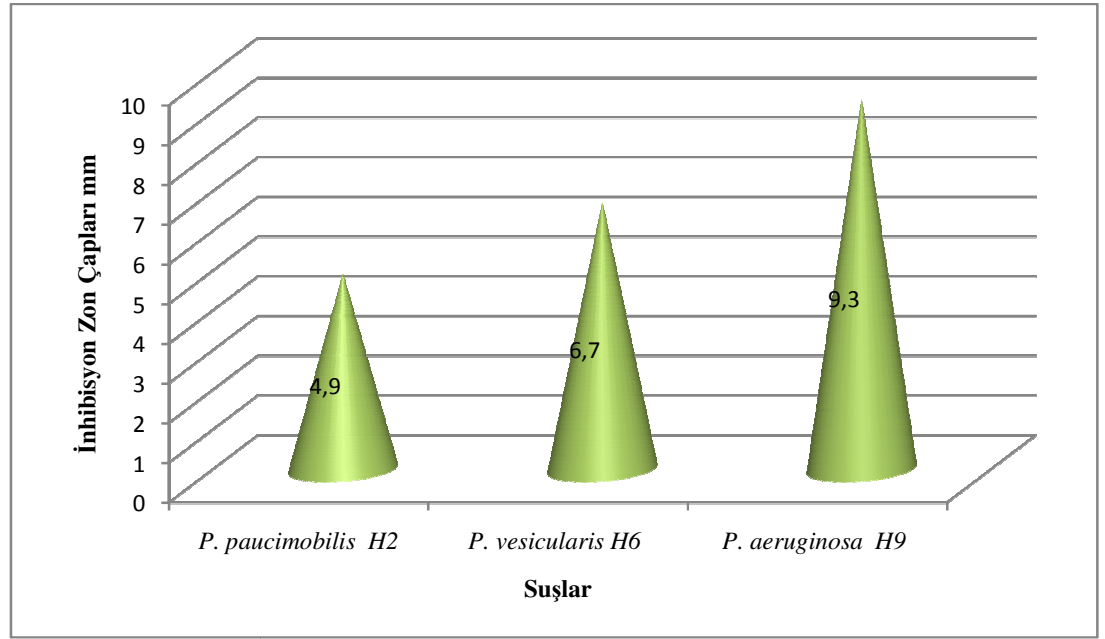
Şekil 4.4. *Pseudomonas* suşlarının *Shigella sonnei* RSKK 877 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



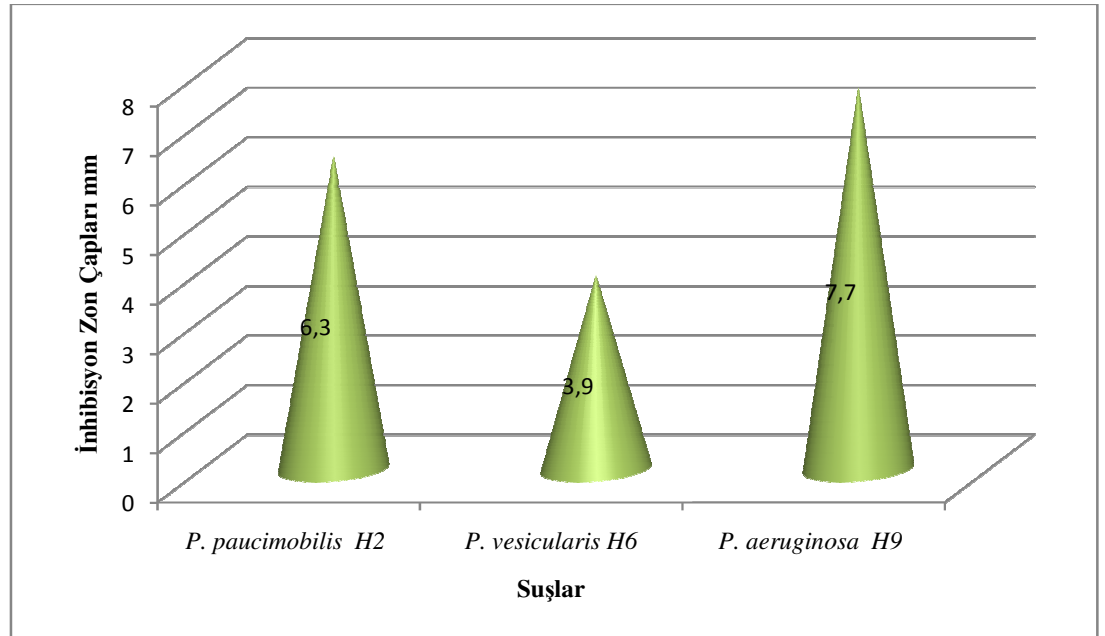
Şekil 4.5. *Pseudomonas* suşlarının *S.epidermidis* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



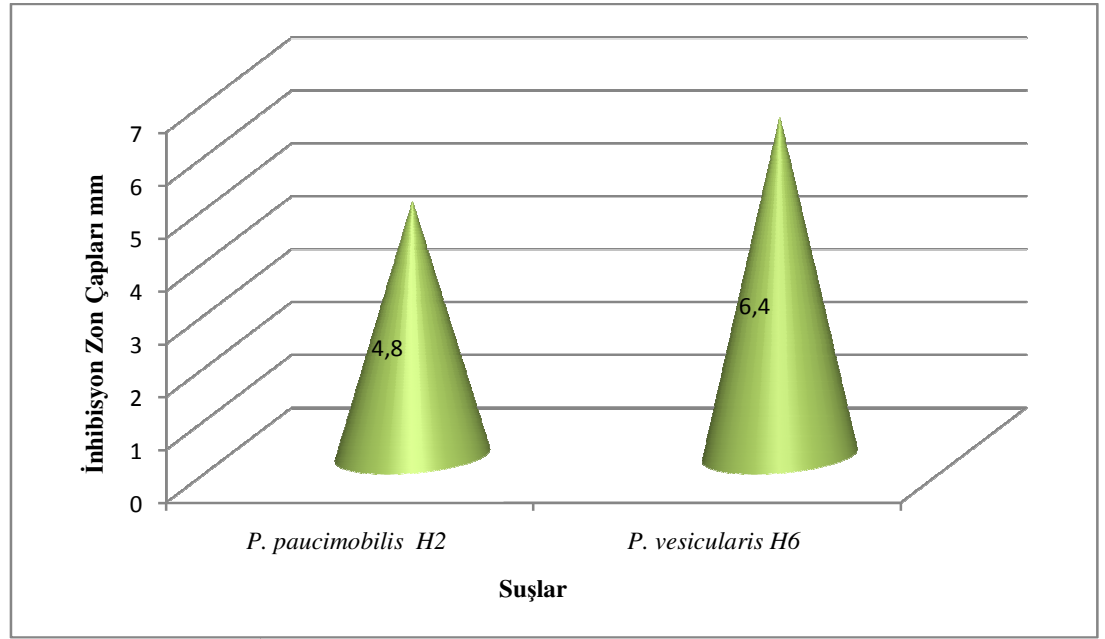
Şekil 4.6. *Pseudomonas* suşlarının *B. thurugiensis* üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



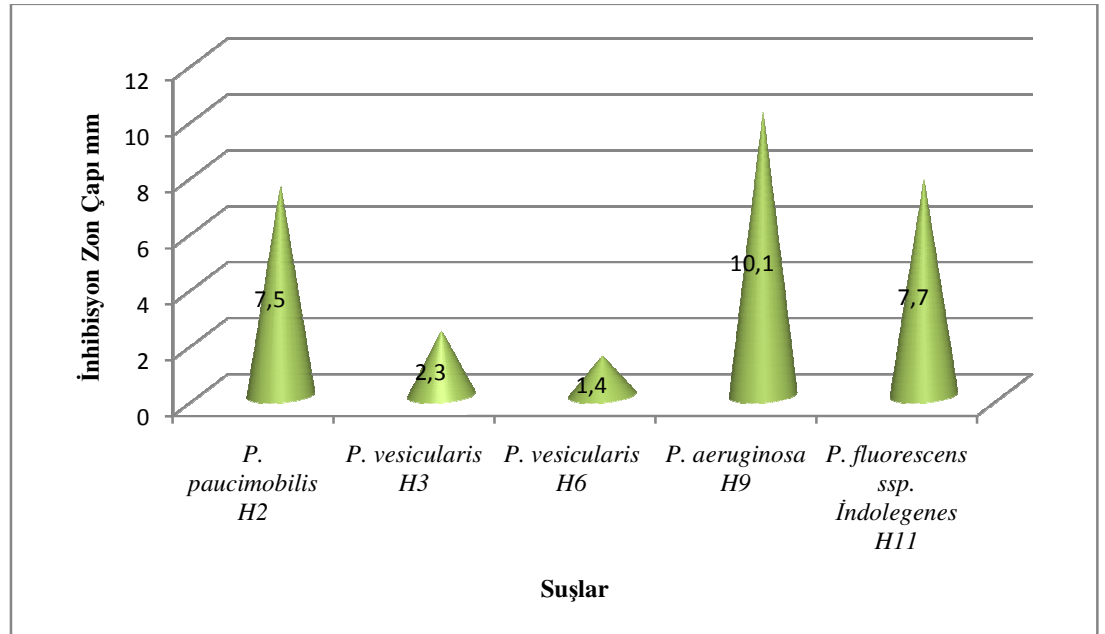
Şekil 4.7. *Pseudomonas* suşlarının *B. megaterium* RSKK 5117 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



Şekil 4.8. *Pseudomonas* suşlarının *B. subtilis* RSKK 244 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



Şekil 4.9. *Pseudomonas* suşlarının *Staph. aureus* Koag (+) üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları



Şekil 4.10. *Pseudomonas* suşlarının *E. coli* ATCC 35218 üzerinde oluşturduğu inhibisyon zon çapları

4.3.2. . *Pseudomonas* spp suşlarının bazı laktik asit bakterileri üzerine inhibisyon etkisi

Suşların bazı laktik asit bakterileri üzerine olan inhibisyon etkilerinin tespiti bölüm 3.2.4.3. 'de verildiği gibi yapılmıştır.

L. acidophilus ATCC 53103 suşuna hiçbir *Pseudomonas* ssp. suşları inhibisyon etkisi göstermemiştir (Çizelge 4.2.).

P. fluorescens ssp. *indolegenes* H₁₂ suşu ise diğer laktik asit bakterilerinin hepsinde inhibisyon etkisi göstermiştir (Çizelge 4.2.).

P. fluorescens ssp. *indolegenes* H₁₁ ve *P. fluorescens* ssp. *Indolegenes* H₁₂ suşları *L. planterum* ATCC 20246 ve *L. helveticus* 75.L. üzerinde inhibisyon etkisine sahiptir. *L. planterum* ATCC 20246 suşu üzerindeki zon çapları sırasıyla 12,6 mm ve 12,3 mm, *L. helveticus* 75.L. suşu üzerindeki zon çapları 8 mm ve 10,4 mm ' dir (Şekil 4.11).

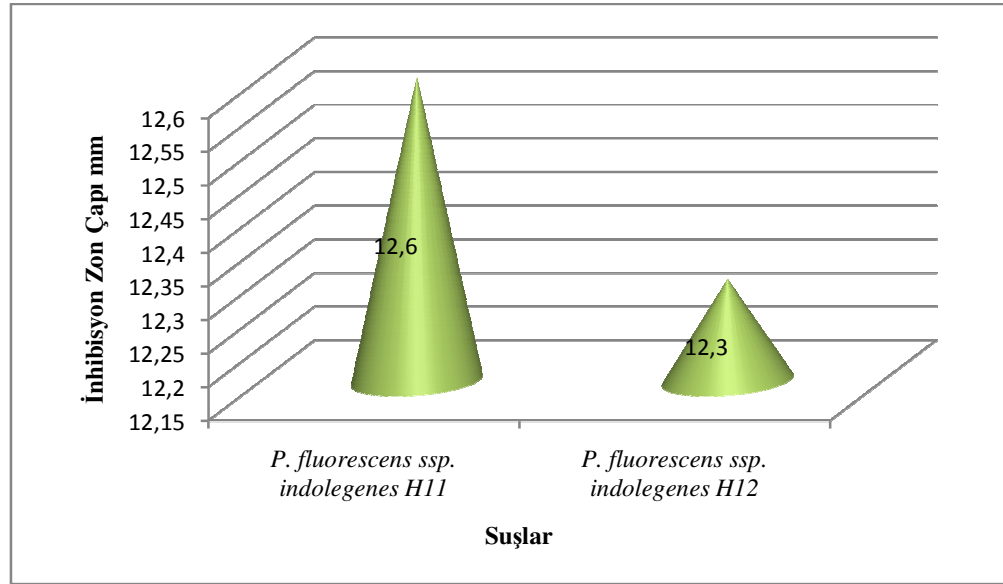
Pseudomonas suşlarının en fazla inhibisyon etkisi gösterdiği laktik asit bakterisi *L. fermentum* DSMS 23271 'dir. *P. vesicularis* H₄ suşu 6,1 mm , *P. aeruginosa* H₉ suşu 8,3 mm, *P. fluorescens* ssp. *Indolegenes* H₁₀ suşu 5,6 mm, *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₁ suşu 7,9 mm, *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₂ suşu 8,6 mm ve *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₄ suşu 8,7 mm zon çapı ile inhibisyon etkilerinin varlığı tespit edilmiştir. Suşların inhibisyon etkisi Çizelge 4.2., Şekil 4.12 ve Resim 4.5. 'de gösterilmiştir.

Z.20.L *L. brevis* laktik asit bakterisi üzerinde *P. vesicularis* H₅ (minimum zon çapı 3,4 mm), *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₁, *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₂ (maksimum zon çapı 11,4 mm) , *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₃, *P. fluorescens* ssp. *indolegenes* H₁₄ suşları inhibisyon etkisi göstermiştir.

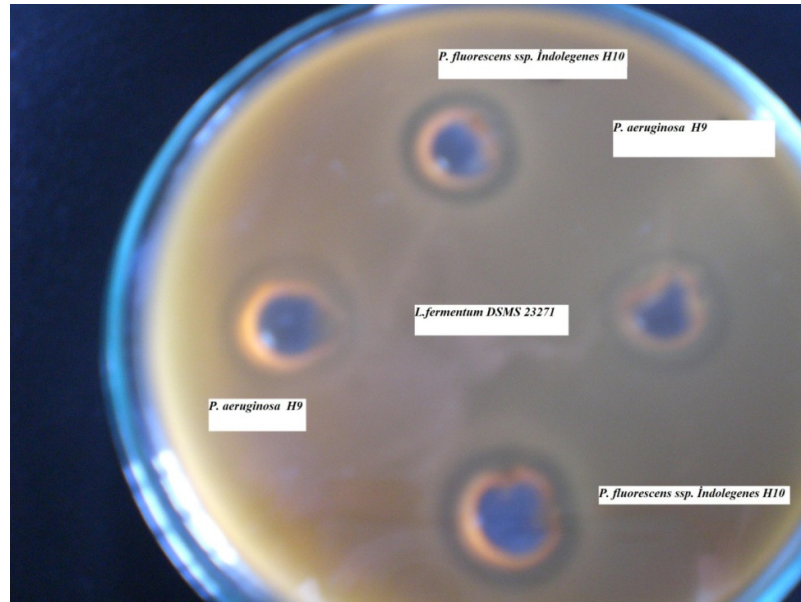
P. luteola H₁ ve *P. fluorescens ssp. indolegenes* H₁₂ suşlarının *L. acidophilus* ATCC 4346 laktik asit bakterisi üzerinde sırasıyla 6,3 mm ve 9 mm zon çapı gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *Pseudomonas* spp suşlarının bazı laktik asit bakterileri üzerine antimikrobiyal etkisi

SUŞLAR	H ¹	H ⁴	H ⁵	H ⁶	H ⁰	H ¹¹	H ¹²	H ¹³	H ¹⁴	H ¹⁵
<i>L. fermentum</i> DSMS 23271	-	6,1±6,1	-	8,3±0,1	5,6±0,2	7,9±0,7	8,6±2,2	-	8,7±1,5	-
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	6,3±6,3	-	-	-	-	-	9,0±1,8	-	-	-
<i>L. planterum</i> ATCC 20246	-	-	-	-	-	12,6±0,8	12,3±0,3	-	-	-
<i>L. helveticus</i> 75. L(Kefir)						8,0±8,0	10,4±10,4			
<i>Z. 20L. L. Brevis</i>			3,4±3,4			7,3±1,3	11,4±0,4	8,6±2,4	7,4±2,0	



Şekil 4.11. *Pseudomonas ssp.* suşlarının laktik asit bakterileri üzerinde toplam inhibisyon etkisi

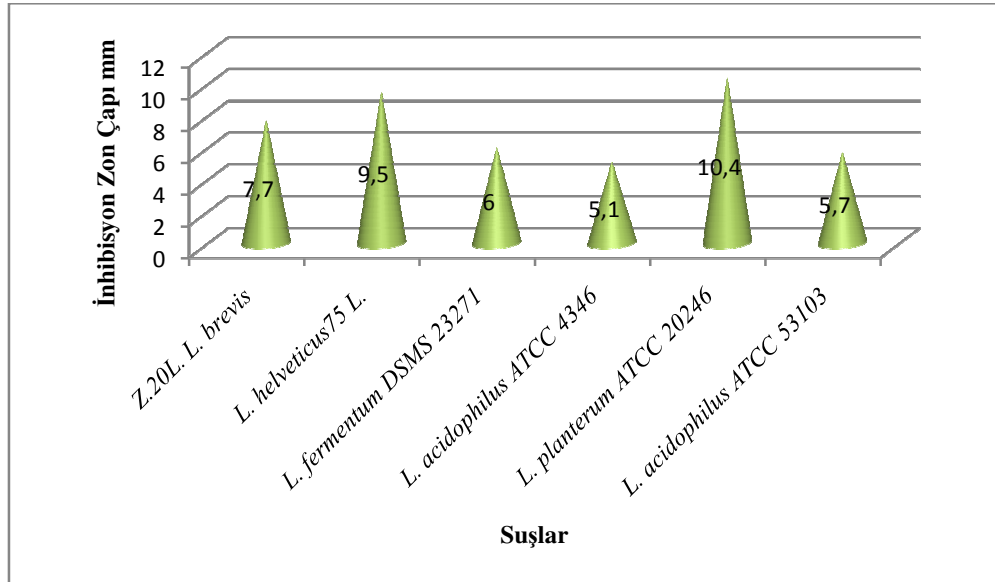


Fotoğraf 4.5. *P. aeruginosa H₉* ve *P. fluorescens ssp. Indolegenes H₁₀* suşlarının *L. fermentum DSMS 23271* üzerindeki antimikrobiyal etkileri

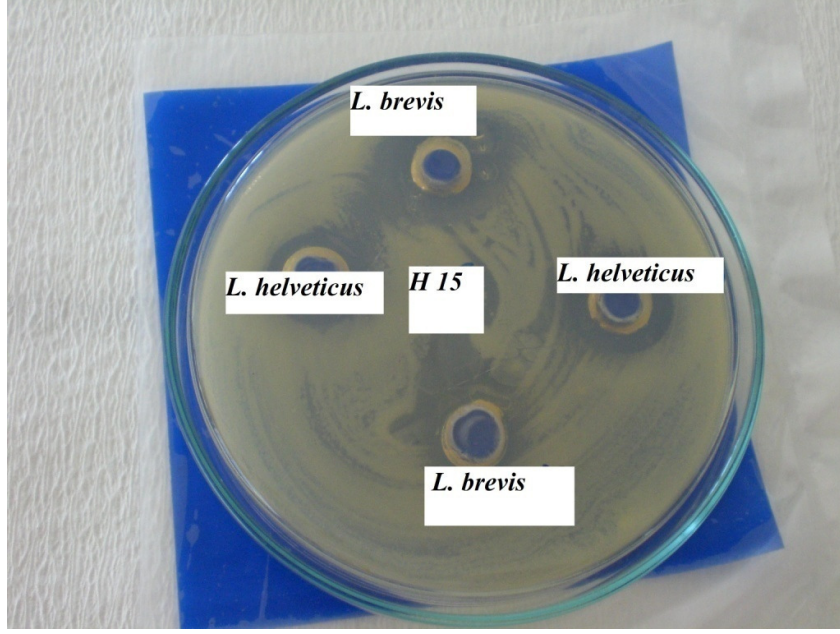
4.3.3. Bazı laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas* spp suşları üzerine inhibisyon etkisi

Bazı laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas* suşları üzerine olan inhibisyon aktivitesinin tespiti Bölüm 3.2.4.3’de verildiği gibi yapılmıştır. Test bakterileri olarak *Pseudomonas* suşlarının üzerinde bazı laktik asit bakterilerinin gösterdikleri inhibisyon etkileri Çizelge 4.3. ve Resim 4.6 ve 4.7’ de verilmiştir.

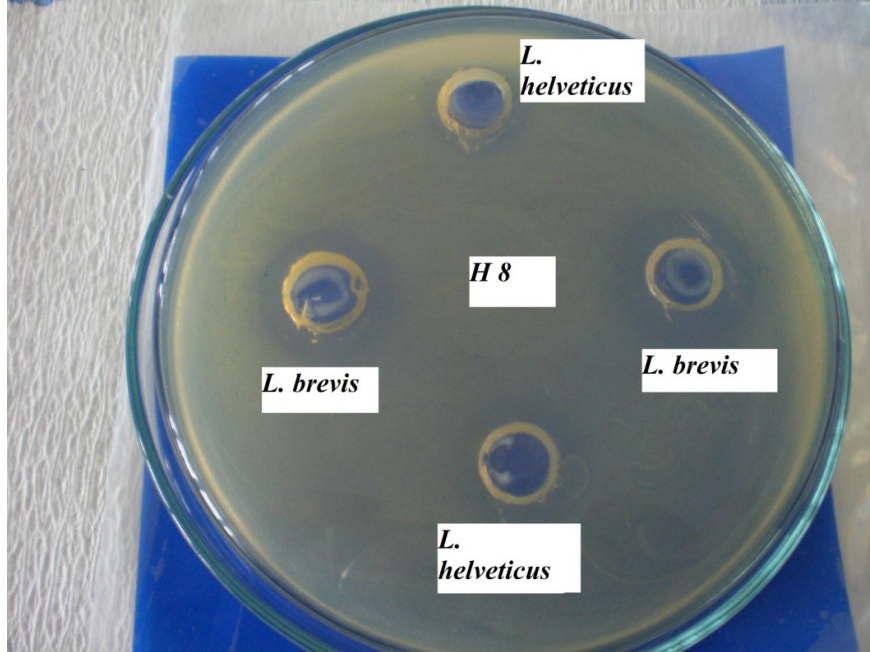
L. helveticus 75.L ve Z.20L. *L. brevis* bütün *Pseudomonas* türlerine inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.). *P. aeruginosa* H₉ ve *P. fluorescens ssp. indolegenes* H₁₂ suşlarına laktik asit bakterilerinin hepsinin inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir(Şekil 4.12). Buna göre genellikle *P. aeruginosa* ve *P. fluorescens ssp. indolegenes* suşlarının kullanılan laktik asit bakterilerinin antimikrobiyal maddelerine karşı daha duyarlı oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). *P. aeruginosa* H₉ ve *P. fluorescens ssp. indolegenes* H₁₂ suşlarına laktik asit bakterilerinin göstermiş olduğu inhibisyon etkisi Resim 4.6.- 4.8. ‘de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Laktik asit bakterilerin *P. aeruginosa* H₉ üzerinde inhibisyon etkisi



Fotoğraf 4.6. Laktik asit bakterilerin *P. fluorescens ssp. indolegenes* H₁₅ suşu üzerine inhibisyon etkisi



Fotoğraf 4.7. Laktik asit bakterilerin *P. vesicularis* H₈ suşu üzerine inhibisyon etkisi

Çizelge 4.3.
Laktik asit bakterilerinin *Pseudomonas* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi

SUŞLAR	<i>L.fermentum</i> DSMS 23271	<i>Lacidophilus</i> ATCC 4356	<i>L.plantarum</i> ATCC 20246	<i>L.helveticus</i> 75. L.	<i>Z. 20L.</i> <i>L. brevis</i>	<i>L.acidophilus</i> ATCC 53103
H ₁	-	-	-	9,3±2,5	3,0±3,0	-
H ₂	-	-	-	13±0,2	10,8±2,6	-
H ₃	7,1±0,9	9,5±2,5	-	11±2,2	7,8±1,4	8,5±3,5
H ₄	-	-	-	15,7±0,3	8,8±1,4	-
H ₅	-	-	6,0±0,6	18,3±2,3	14±0,2	10,8±0,0
H ₆	-	-	6,9±0,3	8,1±0,7	7,1±0,9	12,2±1,2
H ₇	-	-	-	8,1±1,5	5,6±1,0	-
H ₈	-	-	6,8±1,4	8,3±0,9	6,1±1,5	11,1±0,7
H ₉	6,0±1,2	5,1±0,5	10,4±1,8	9,5±0,3	7,7±2,2	5,7±0,5
H ₁₀	7,6±4,2	-	-	5,5±1,1	4,5±0,3	8,0±0,4
H ₁₁	-	-	-	10,2±2,0	11,5±1,9	9,2±2,0
H ₁₂	5,8±0,8	10,7±1,5	6,2±0,8	11,1±2,3	11,2±2,4	11,5±0,5
H ₁₃	-	-	-	7,9±1,7	12,0±0,8	-
H ₁₄	3,6±3,6	12,9±4,1	-	5,1±5,1	11,5±2,1	-
H ₁₅	-	-	-	5,9±0,5	8,7±1,3	-

BÖLÜM V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada *Pseudomonas* suşlarının izolasyonu çiğ süt örneklerinden yapılmıştır. Farklı çiğ süt örneklerinden toplam 15 adet *Pseudomonas* cinsi bakteri izole edilmiş ve tanımlanmaları API 20 NE testinin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir.

Pseudomonas cinsi bakterilerin tanımlanmasında klasik biyokimyasal ve fizyolojik testlerin [37, 38, 39] yanı sıra Analitik Profil İndeks (API 20 NE) [40, 29], hücresel yağ asitleri analizi [41], SDS-PAGE ile toplam protein profilleri analizi [42, 43], 16S rDNA sekans analizi [44, 45] ve diğer moleküler analizler [45, 43] kullanılmaktadır [35].

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 [46].

İnal (1990), çiğ sütlerde bulunan psikrotrof bakterilerin yaklaşık % 90' ının Gram negatif çubuk şekilli bakterilerden oluştuğunu, bunların da yarısının *Pseudomonas'* ların meydana getirdiğini bildirmiştir. İnal ayrıca belirli ölçüde koliform grup bakterilerin de çiğ sütlerde bulunduğunu ifade etmiştir [47].

Bu çalışmada çiğ süt örneklerinden izole edilen toplam 15 adet *Pseudomonas* spp. suşunun %40' ı *P. fluorescens ssp. indolegenes*, %6,6' sı *P. aeruginosa*, %40' ı *P. vesicularis*, %6,6' sı *P. luteola*, %6,6' sı *P. paucimobilis* olarak tanımlanmıştır.

Pseudomonas cinsi bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal bileşikler genel olarak, bakteriyosin, antibiyotik, hidrojen siyanid ve sideroforlar olarak gösterilmiştir [30].

Son yıllarda antibiyotiklerin yanlış kullanımı sonucunda antibiyotiklere dirençli mikroorganizma sayısının artması günümüzde global bir sağlık problemi olarak görülmektedir. İlk keşfedilen antibiyotiklerin birçoğu yeni türevler elde etme amacı ile modifiye edilmelerine rağmen, bunlarla mücadele edecek bakterilerin yeni direnç mekanizmaları kazanma potansiyeline sahip olmaları değişik antibiyotik üreten yeni gen kaynaklarının ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip, etkili antibiyotikler üreten mikroorganizma türlerinin araştırılmasının gerekli ve önemlidir [48].

İsnansetyo ve arkadaşları *Pseudomonas* spp. suşları ile yaptıkları bir çalışmada bu suşların hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakterilerin gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir [27]. Çalışmada antimikrobiyal aktivite gösteren *Pseudomonas* suşlarının özellikle gram-negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının % 47' si *Salmonella* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *Salmonella* üzerinde *P. aeruginosa* H₉ suşunun 18,2 mm zon çapı ile en yüksek inhibisyon etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* CMG 1030 suşunun *Salmonella* üzerinde 18 mm zon çapı ile inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir [49].

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının % 87'sinin *P. aeruginosa* üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2). Mineral sulardan izole edilen 148 adet *Pseudomonas* spp. suşunun % 19,1'inin *P. aeruginosa* ATCC 10490 üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir (1).

Fermor ve arkadaşları, yapmış oldukları çalışmalarında *Pseudomonas putida* AN101, *P. tolaasii* AN138 ve *P. fluorescens* AN195 suşlarının *P. tolaasii* Pt28

suşunu sırasıyla 22,6, 12,9 ve 21,8 zon çapları ile inhibe ettiklerini bildirmişlerdir [50].

P. aeruginosa suşları tarafından üretilen bir bakteriyosinin (piyosin) *P. aeruginosa*, *P. putida* ve *P. fluorescens* suşları üzerinde etkili olduğu, *P. stutzeri* suşları üzerinde ise etkili olmadığı rapor edilmiştir [51].

Lavermicocca ve arkadaşları ise, *P. syringae* subsp. *savastanoi* suşunun *P. syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355 suşuna karşı bakteriyosin ürettiğini bildirmişlerdir [52].

P. fluorescens, *P. aeruginosa*, *P. maltophilia*, *P. putida*, *P. gladioli* ve *P. cepacia* gibi bazı *Pseudomonas* türlerinin *P. solanacearum* gibi bitkilerde hastalık etkeni patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bildirilmiştir [53].

Yapılan bazı araştırmalarda, *Pseudomonas* cinsi bakterilerden elde edilen antimikrobiyal maddelerin diğer *Pseudomonas* bakterileri üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmada da, *P. luteola* H₁ ve *P. vesicularis* H₅ suşları haricindeki diğer suşların hepsinin *P. aeruginosa* ATCC 27853 üzerinde inhibitörük etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının %20'sinin *B. subtilis* 2362, %7'sinin *B. subtilis* 1404, %20'sinin *B. subtilis* RSKK 244, %13'ünün *B. thuringiensis*, %20'sinin *B. megaterium* RSKK 5117 , %7'sinin *B. cereus* 863 üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.3; 4.4;4.10; 4.7; 4.8; 4.9). Bir çalışmada *P. aeruginosa*' ya ait 19 adet suşun %5'inin *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir [10]. Vachée ve arkadaşları, 54 adet *Pseudomonas* spp. suşunun %16,6'sının *B. cereus* üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir [29].

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının %20'sinin *Shigella sonnei* RSKK 877 üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının %20'sinin *S. epidermidis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.6). Yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa* CMG 1030 suşunun *S. Epidermidis* üzerinde 18 mm zon çapı ile inhibisyon etkisi gösterdiği rapor edilmiştir [49].

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının %13'ünün *S. aureus* Koag (+) üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Oblinger ve Kreft, *Pseudomonas* spp. suşları ile yapmış oldukları araştırmalarında, bu suşların *S aureus* üzerinde antagonistik aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir [54].

Çalışmada kullanılan *Pseudomonas* spp. suşlarının %33'ünün *E. coli* ATCC 35218 üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12). Liao ve Fett, bitkiden izole ettikleri *P aeruginosa* AB4 ve *P. fluorescens* A3 suşlarının *E.coli* üzerinde sırasıyla, 12 ve 8 mm zon çapları ile inhibisyon etki gösterdiklerini bildirmişlerdir [55]. Padilla ve arkadaşları ise, çalışmalarında *P. aeruginosa*'ya ait suşların % 12'sinin *E.coli* üzerinde inhibisyon etki gösterdiğini açıklamışlardır [33]. Taze ve bozulmuş balıklardan izole edilen toplam 209 adet *Pseudomonas* spp. suşunun ise yalnız 15 adedinin *E. coli* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [34]. Bu bilgiler de çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Günümüzde, geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip mikroorganizma tiplerinin araştırılması ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere alternatif olabilecek daha etkili ve yeni antibiyotiklerin keşfi oldukça önem kazanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas* spp. suşları özellikle Gram-pozitif test bakterileri üzerinde antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Ancak *P.*

aeruginosa H₉ suşunun Gram-negatif test bakterisi üzerine de inhibitörük etki göstermiştir.

Pseudomonas cinsi bakteriler, süt, tavuk, et ve balık gibi bir çok gıda ürünü için önemli kontaminant mikroorganizmalardır [50, 56]. Gıdalarda *Pseudomonas* spp. suşları ve diğer mikroorganizmalar arasındaki ilişki ile ilgili olarak yapılan çalışmalar oldukça sınırlı kalmakla birlikte birbirlerine zıt görüşler mevcuttur.

Çalışmada kullanılan suşların bazı laktik asit bakterileri üzerine olan inhibisyon etkilerinin tespitinde test bakterileri [57-60] üzerinde 3,4-12,6 mm zon çapı aralığında inhibisyon etkisi gösterdikleri saptanmıştır (Çizelge 4.2). Freedman ve arkadaşları, tarafından yapılan sadece bir çalışmada bitki ve gıdalardan izole edilen *Pseudomonas* suşlarının King's agar B besiyerinde siderofor üretimlerinin stimüle edilerek inhibitörük aktivitelerinin arttırılmasına bağlı olarak laktik asit bakterilerinin inhibisyonu tespit edilmiştir [61]. Yapılmış olan diğer araştırmalarda ise *Pseudomonas* spp. suşlarının birçok mikroorganizma üzerinde inhibitörük etkileri olmasına rağmen, laktik asit bakterilerinin gelişimlerini arttırabileceği bildirilmektedir [19, 62].

Çalışmada ayrıca laktik asit bakteri suşlarının *Pseudomonas* suşları üzerinde antimikrobiyal etkileri çalışılmıştır.

Laktik asit bakterileri, sağlık ve beslenmedeki faydaları ve fermentatif kabiliyetlerinden dolayı endüstriyel öneme sahip mikroorganizmalar olarak kabul edilirler [59]. Laktik asit bakterileri son ürün olarak laktik asit üretimleriyle tanımlanan gram pozitif, prokaryotik bakterileridir. Laktik asit bakterileri glikozu laktik asite çevirmeleri ile karakterize edilirler. Laktik asit bakterilerini genel olarak *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve *Streptococcus* kapsamaktadır [58, 60]. Laktik asit bakterileri, gıda hazırlanması, işlenmesi ve yiyecek türlerinin oluşturulmasında önemli olup, ekonomik olarak değerlidir. Bu

mikroorganizmaların esas önemi laktik asit üretimi, protein hidrolizi ve aroma bileşiklerinin sentezlenmesi gibi çok sayıda yeteneğe sahip olmasından kaynaklanmaktadır [63]. Araştırmacılar, laktik asit bakterilerinin, çeşitli gıda ürünlerinde bulunan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin de dahil olduğu bir çok kontaminant ve patojen mikroorganizmanın gelişimini engellediğini ve bu engellemede laktik asit, hidrojen peroksit, diasetil ve düşük moleküler ağırlıklı ve sıcaklığa dirençli bakteriyosinler gibi ajanların sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir [64, 65, 57]. Bu antimikrobiyal ajanların gıda ürünlerin güvenliğinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir [66, 67].

Çalışmada kullanılan laktik asit bakterilerinin hepsinin *Pseudomonas* suşları üzerinde 3,0-18,3 mm zon çapı ile inhibisyon etkilerinin varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Toksoy ve arkadaşlarının, yaptıkları bir çalışmada sucuk ve sosislerden izole edilen 38 adet *Lactobacillus plantarum* suşunun *P. aeruginosa*'nın gelişimini 4-9,90 mm zon çapları arasında inhibe ettiği bildirilmiştir [68]. Çalışmada da *L. plantarum*'un *P. aeruginosa* türü üzerinde 10,4 mm zon çapı ile inhibisyon etkisinin varlığı saptanmıştır.

Desmaison ve arkadaşları, *L. acidophilus*'un *P. fluorescens*'in gelişimini engellediğini bildirmişlerdir [69]. Katırcıoğlu 2001, *Lactobacillus* spp. suşlarının *P. fluorescens* üzerinde ortalama 5,2 mm zon çapında inhibisyon gösterdiğini rapor etmiştir [70]. Çalışmada da *L. acidophilus* suşları *P. fluorescens* türü üzerinde 6,2-12,9 mm zon çapı ile inhibisyon etkisi göstermiştir.

Gıda kontaminantı olarak bilinen *Pseudomonas* cinsi bakterileri üzerinde laktik asit bakterilerinin etkili olması gıda endüstrisi açısından önemli yararlar sağlamaktadır.

Günümüzde, geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip mikroorganizma tiplerinin araştırılması ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere alternatif olabilecek daha etkili ve yeni antibiyotiklerin keşfi oldukça önem kazanmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas* spp. suşları özellikle Gram-negatif test bakterileri üzerinde antimikrobiyal etki göstermişlerdir. Özellikle H₉ hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif test bakterilerine karşı inhibisyon etkisinin etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Bunun yanı sıra, et süt ve süt ürünleri gibi gıdalar için kontaminant oldukları bilinen *Pseudomonas* suşları üzerinde kullanılan bazı test laktik asit bakterilerinin inhibitörük etki göstermiş olmalarının gıda ürünlerinin güvenliğinde önemli olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Akoğlu (Şen) A. Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için modifikasyonları üzerine çalışmalar Yüksek Lisans Tezi A: Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara 2006
- [2]. Ankara Piyasasında Satılan İşlem Görmüş (UHT ve Pastörize) ve Görmemiş (Sokak) Sütlerin Makro- Besin Değeri ve Mikrobiyolojik Açıdan Değerlendirilmesi Dr. Belgin Altun, Dr. Tanju Besler, Dr. Serhat Ünal 11/2, 51-55, 2002
- [3]. Çeşitli Yörelere Sağlanan Çiğ Süt Örneklerinden *Pseudomonas'* ların İzolasyonu ve Türlerin Dağılımı Üzerine Bir Araştırma Güven URAZ, Sumru ÇITAK Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE 1998
- [4]. Kalkan S. Çiğ Sütte *Bacillus cereus* Sayılması için Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar Yüksek Lisans Tezi Ankara 2006
- [5]. Pelczar, J. M and Reid, D. R.. Microbiology. Kogakusha Company Ltd., 125 s., Tokyo 1958.
- [6]. Tortora, J. G., Funke, R. B. and Case, L. C. Microbiology. The Benjamin /Cummings Publishing Company Inc., 523 s., California 1992.
- [7]. Ayhan, K. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını Sim Matbaacılık Ltd., 522 s., Ankara 2000.
- [8]. <http://www.mikrobiyoloji.org>, 2009
- [9]. Solberg, M. , O'leary, V.S. and Riha, W. E. New Medium for the Isolation and Enumeration of Pseudomonads. Applied Microbiology, 24(4); 544–550 1972.
- [10]. Jeppesen, C. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp From Food and Environment. International Journal of Food Microbiology, 26; 25–41 1995.
- [11]. Şengöz, G., Karabela, Ş., Durdu, Y., Yaşar, K., Yıldırım, F., Bakar, M., Koldaş, M. Ve Nazlıcan, Ö. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerde İsepamisin Direncinin Araştırılması ve Diğer Aminoglikozid Dirençleriyle Karşılaştırılması. Klimik Dergisi, 18(1); 41–44 2005.
- [12]. Özan, M. 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. 1996.

[13]. Çiğ Sütte *Pseudomonas aeruginosa* Sayılması için Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar Aylin ŞEN, A. Kadir HALKMAN Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Cilt: 04 Sayı: 02 Sayfa: 2-13 2006 www.mikrobiyoloji.org/pdf/702060202.pdf

[14]. BAŞTÜRK S. *Escheria Coli, Klebsiella Pneumoniae, Pseudomonas Aeruginosa ve Acinetobacter Baumannii suşlarında* çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması Uzmanlık Tezi İstanbul 2005

[15]. Erdem B. Pseudomonaslar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. In: Ustaçelebi Şed. Güneş Kitabevi, Ankara, 551-558, 1999.

[16]. Pier GB, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases 6th ed. , Philadelphia: Churchill Livingstone,; 2587-2614, 2005.

[17]. Bergagne E. *Pseudomonas* and miscelaneus gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdly GW eds. Infectious Diseases. Second ed. , Toronto, 1733-1748, 2004.

[18]. Padilla, C., Brevis, P., lobos, O., Hubert, E. and Zamorano, A., "Production of antimicrobial substances, by hospital bacteria, active against other microorganisms", *Journal of Hospital Infection*, 49: 43-47, 2001.

[19]. Gram, L., "Inhibitory effect against pathogenic and spoilage bacteria of *Pseudomonas* strains isolated from spoiled and fresh fish", *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (7): 2197-2203, 1993.

[20]. Fakhouri, W., Walker, F., Vogler, B., Armbruster, W. and Buchenauer, H., "Isolation and identification of *N*-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*", *Phytochemistry*, 58: 1297-1303, 2001.

[21]. El-Adaway, T. A., "Optimum production, stability, partial purification and inhibitory spectrum of antimicrobial compounds produced by *Pediococcus pentosaceus* D1", *Nahrung/Food*, 45(2): 118-124, 2001.

[22]. Demain, A. L., "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms", *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 52: 455-463, 1999.

- [23]. Castric, P. A., "Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen cyanide biosynthesis", *Journal of Bacteriology*, 130 (2): 826-831, 1977.
- [24]. Ellis, R. J., Timms-Wilson, T. M., Beringer, J. E., Rhodes, D., Renwick, A., Stevenson, L. and Bailey, M. J., "Ecological basis for biocontrol of damping-off disease by *Pseudomonas fluorescens* 54/96", *Journal of Applied Microbiology*, 87: 454-463, 1999.
- [25]. Dopazo, C. P., Lemos, M. L., Lodeiros, C., Bolinches, J., Barja, J. L. and Toranzo, A. E., "Inhibitory activity of antibiotic producing marine bacteria against fish pathogens", *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 97-101, 1988.
- [26]. Gram, L. and Melchiorson, J., "Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue", *Journal of Applied Bacteriology*, 83: 652-658, 1997.
- [27]. Isnansetyo, A., Cui, L., Hiramatsu, K. and Kamei, Y., "Antibacterial activity of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marina alga, against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22:545-547, 2003.
- [28]. "Bacterial stress survival strategies", <http://www.bio.ic.ac.uk/research/hdw/> 23.08.2004.
- [29]. Vachée, A., Mossel, D. A. A. and Leclerc, A., "Antimicrobial activity among *Pseudomonas* and related strains of mineral water origin", *Journal of Applied Microbiology*, 83: 652-658, 1997.
- [30]. Gram, L., Mulchtorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I. and Nielsen, T., F., "Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish", *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 969-973, 1999.
- [31]. Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R. and Boor, K. J.. Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated From Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5); 2085–2095, 2000.
- [32]. Collins, E.B. Heat Resistant Psychrotropic Microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 64; 157–160, 1979.

- [33]. Kılıç, S., Kavas, G. ve Uysal, H 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, 2000.
- [34]. Aslım, B., Beyathı, Y. ve Halkman, K. Yoğurt Starter Kültür Metabolitlerinin İnhibisyon Etkisi. Turk. J. Biol., 24; 65–78, 2000.
- [35]. Çelik Yuvalı G. Pseudomonas Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Aktivite, Antimikrobiyal Etki ve Protein Profillerinin İncelenmesi Doktora Tezi Ankara
- [36]. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteri>
- [37]. Costas, M., Holmes, B., Sloss, L. L. and Heard, S., "Investigation of a pseudo-outbreak of '*Pseudomonas thomasi*' in a special-care baby unit by numerical as of SDS-PAGE protein patterns", *Epidemiology and Infection*, 105 (1): 127-137, 1990.
- [38]. Gram, L., Wedell-Neergaard, C. and Huss, H. H., "The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*)", *International Journal of Food Microbiology*, 10: 303-316, 1990.
- [39]. Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E. and Nychas, G.-J. E., " Characterization of Pseudomonas spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions", *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 65-72, 2002.
- [40]. Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dinen, S. S., Ralyea, R. and Boor, K. J., "Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk", *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 2085-2095, 2000.
- [41]. Oyaizu, H. and Komagata, K., "Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids", *Journal of General and Applied Microbiology*, 29: 17-40, 1983.
- [42]. Khan, F. G., Rattan, A., Khan, I, A., "A preliminary study of fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by whole cell protein analysis by SDS-PAGE", *Indian Journal of Medical Research*, 104: 342-348, 1996.
- [43]. Scortichini, M., Marchesi, U., Rossi, M. P. and Prospero, P. D., "Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) decline are of two groups:

Pseudomonas avellanae and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*", *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (2): 476-484, 2002.

[44]. Cho, J.-C. and Tiedje, J. M., "Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil", *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12): 5448-5456, 2000.

[45]. Coenya, T., Goris, J., Spilker, T., Vandamme, P. and Lipuma, J. J., "Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. Nov., sp. nov.", *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6): 2062-2069, 2002.

[46]. Kwan, K. K. and Skura, B. J. 1983. Identification of Proteolytic Pseudomonads Isolated From Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, 68; 1902–1909.

[47]. İnal, T. 1990. Süt ve Süt Ürünleri Hijyen ve Teknolojisi. 1108 s., İstanbul.

[48]. Burgess, J. G., Jordan, E. M., Bregu, M., Mearns-Spragg, A. and Boyd, K. G., "Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research", *Journal of Biotechnology*, 70: 27-32, 1999.

[49]. Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria Jagath L. Kadurugamuwa† and Terry J. Beveridge Canadian Bacterial Diseases Network, Department of Microbiology, College of Biological Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1 Present address: Roche Vitamins Inc., Research and Development, Building 102, B 309, 340 Kingsland Street, Nutley, NJ 07110-1199, USA. *Microbiology* 145, 2051-2060; DOI 10.1099/13500872-145-8-2051, 1999.

[50]. Kıvanç, M., "Antagonistic action of lactic cultures toward spoilage and pathogenic microorganisms in food", *Die Nahrung*, 34 (3): 273-277, 1990.

[51]. Jones, L., F., Thomas, E. T. Stinnett, J. D., Gilardi, G. L. and Farmer, J. J., "Pyocin sensitivity of *Pseudomonas* species", *Applied Microbiology*, 27 (1): 288-289 1974.

[52]. Lavermicocca, P., Lonigro, S. L., Evidente, A. and Andolfi, A., "Bacteriosin production by *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355. Isolation and characterization of the antimicrobial compound", *Journal of Applied Microbiology*, 86: 257-265 1999.

- [53]. Lavermicocca, P., Lonigro, S. L., Evidente, A. and Andolfi, A., "Bacteriosin production by *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* NCPPB2355. Isolation and characterization of the antimicrobial compound", *Journal of Applied Microbiology*, 86: 257-265, 1999.
- [54]. Oblinger, J. C., Kreft, A. A., "Inhibitory effect of *Pseudomonas* on selected *Salmonella* and bacterial isolates from poultry", *Journal of Food Science*, 35: 30-32, 1990.
- [55]. Liao, C.-H., and Fett, W. F., "Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce", *Journal of Food Protection*, 64 (8): 1110-1115, 2001.
56. Flint, S. and Hartley, N., "A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products", *International Dairy Journal*, 6: 223-230, 1996.
- [57]. Herreros MA, Sandoval H, González L, Castro JM, Fresno JM, Tornadijo ME. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22, 455-459, 2005.
- [58]. Sandholm TM, Mättö J, Saarel a M.. Lactic acid bacteria with health claims interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9, 25-35, 1999.
- [59]. Simsek O, Bilgin B. Gıda sanayinde kullanılan laktik asit bakterilerinin oluşturdukları antibiyotiklerin biyokimyasal ve genetik özellikleri. *Standart*, 409, 89-96, 1996.
- [60]. Bahiru B, Mehari T, Ashenafi M. Yeast and lactic acid flora of tej, an indigenous Ethiopian honey wine: Variations within and between production units. *Food Microbiology* 23: 277–282, 2006.
- [61]. Freedman, D. J., Kondo, J. K. and Willrett, D. L., "Antagonism of foodborne bacteria by *Pseudomonas* spp.: A possible role for iron ", *Journal of Food Protection*, 52: 484-489, 1989.

- [62]. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. and Givskov, M., "Food-spoilage interactions between food spoilage bacteria", *International Journal of Food Microbiology*, 78: 79-97 2002.
- [63]. Baltasar, M., Hardisson, C. and Brana, A. F., "Characterization of wild strains of *L. lactis* subsp. *lactis* isolated from cabrales cheese", *Journal of Dairy Research*, 57: 125-134, 1990.
- [64]. Reinheimer, J. A., Demkow, M. R. and Condioti, M. C., "Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures", *Australian Journal Of Dairy Technology*, May: 5-9, 1990.
- [65]. Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurguis, A. and Faro, S., "Defense factors of vaginal lactobacilli", *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 185: 375-379, 2001.
- [66]. Zhu, W. M., Liu, M. and Wu, D. Q., "Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7", *Journal of Applied Microbiology*, 88: 877-886, 2000.
- [67]. Daeschel, M. A., "Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preervatives", *Food Technology*, 1: 164-167, 1989.
- [68]. Toksoy, A., Beyathı, Y. and Aslım, B., "Sucuk ve sosislerden izole edilen *Lactobacillus plantarum* suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi", *Tr. J. Veterinary and Animal Sciences*, 23: 533-540, 1999.
- [69]. Desmaison, A. M., Pascaud, H. and Tixier, M., "Tneur en lactose et en galactose des yogurts et des lait's fermentes", *Sciences Des Allment*, 10 (2): 357-368, 1990.
- [70]. Katırcıoğlu, H., "Gökkuşığı alabalığı (*Onchorynchus mykiss* Richardson, 1846) ve aynalı sazandan (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) izole edilen laktik asit bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 118-119, 2001.