

***Pseudomonas* Türlerinin Gıdalardan İzolasyon ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri**

Dilek Keskin¹ Sanver Ekmekçi²

Pseudomonas 'ların gıdalarda bozunmalara sebep olması ve patojen türlerinin bulunmasından dolayı çabuk sonuçlandırılabilen ve kolay uygulanabilecek izolasyon ve sayım yöntemlerinin tam olarak ortaya konulamaması ve yetersiz olmasından dolayı çok sayıda kuruluş ve King ve arkadaşları tarafından *Pseudomonas* 'ların izolasyon ve tanımlanması çeşitli yönleriyle araştırılmakta izolasyon ve sayıma yönelik araştırmalara ağırlık verilmektedir. Floresans veren *Pseudomonas*'ların izolasyonu ile ilgili çalışmalarda genellikle King ve arkadaşları tarafından hazırlanan King B ortamı kullanılmaktadır. Bu ortamda piyoverdin oluşumu belirginleşir ve UV ışığı altında yayılan pigment oluşumu ile karakterize edilir. King B ortamına penisillin G, novobiosin ve siklohegzimid ilavesiyle oluşan yarı seçici katı ortamlar Sands ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Bu antibiotikler floresans veren *Pseudomonas* 'ların gelişimini engellemezler (1).

Meat ve Adams 1977'de, ALCV (Asetamid Laktoz Kristal Viole), MGV (Malaşit Green Vankomisin) ve diamid içeren Difco Heart İnfüzyon agar ve CETCH (Cetrimid-Cephaloridin) ortamlarının hangisinin seçici olduğunu araştırdılar ve sonuç olarak ALCV, MGV ve CETCH ortamlarının her dördünde de, aşılardan 12 saf *Pseudomonas* spp kültürünü tavuklardan geri almada eşit ölçüde başarılı olduğunu saptamışlardır. Difco Heart infüzyon agarı ise mayaların gelişimini desteklemesi ve pigment oluşturmeyen *Pseudomonas* sp kolonilerini inhibe etmesinden dolayı en az başarılı olarak belirlenmiştir. Meat ve Adams, 1977 yılında Difco Heart İnfusion agara, seçici ajan olarak cephaloridine , fucidin ve cetrimide ilavesiyle geliştirdikleri yeni ortamda 25 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda *Pseudomonas* sp'ler petrilere 2-5 mm çapında pigmentli ve pigmentsiz koloniler oluşturmuştur . Bu ortam hem pigmentli hem de pigmentsiz *Pseudomonas* sp kolonilerinin sayımına olanak sağlamıştır. Araştırmacılar CFC ortamının çeşitli tipteki gıdalardan *Pseudomonas* sp sayımında kullanılabileceğini işaret etmişlerdir (1).

Pseudomonas sp 'yi *S. liquefaciens* ve mayalardan ayırmada ve onaylamada oksidaz testinin yeterli olduğunu Szita ve arkadaşları savunmuşlardır. Macaristan'da

¹Doktora öğrencisi. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Bornova, İzmir. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi dilekkeskin@hotmail.com

²Prof. Dr. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Bornova, İzmir.

soğutulmuş tanklardan toplanan çiğ süt örneklerinde *Pseudomonas* türleri araştırılmıştır . Bu çalışmada *Pseudomonas* türlerinin Z broth, Nitrofurantoin broth ve Cetrimide besiyerlerindeki üreme durumları değerlendirilmiştir. Z broth ve Nitrofurantoin broth'da *P. aeruginosa* 'nın ürettiği, *P.putrefaciens*, *P.putida* ve *P.cepacia* , *P.acidovorans*, *P.testosteroni* , *P. maltophilia* ve *P. diminuta*'nın üreme göstermediği saptanmıştır (2). *Pseudomonas aeruginosa* 'nın izolasyonu için aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmada Z agar ve Z broth geliştirilmiştir ve bu ortamlarda engelleyici bir madde ilave etmemişler ve bu ortamlarda bulunan asetamidin, nitrojen ve karbon kaynakları sayesinde asetik asit ve amonyağa metabolize olduğunu saptanmışlardır. Z broth'un seçiciliğini test etmek için *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gruplarına ait saf kültürlerin inoküle edildiği bu ortam farklı sayılarda ki *Pseudomonas aeruginosa* ile inoküle edilen iki süt örneği ile karşılaştırılmıştır. Birinci örnek 10^3 /ml *Pseudomonas aeruginosa*, ikinci örnek ise 10^5 /ml *Pseudomonas aeruginosa* içermekteydi. İkinci örnekle yapılan test sonucuna göre Z agar ve Cetrimide agar arasında önemli bir mikrobiyolojik ayırım bulunmazken birinci örnekte örnekte ise Z agarın önemli bir ayrıcalık gösterdiği bulunmuştur. Z broth ve Nitrofurantoin broth birlikte kıyaslandığında ise iki ortamında *Pseudomonas aeruginosa*'nın gelişimine izin verdiği görülmüştür. Diğer *Pseudomonas* sp.lerin ise gelişemediği saptanmıştır (3).

Avustralya' da yapılan pastörize ve çiğ sütlerle yapılan çalışmada Penicillin agar 30 °C 'de 48 saat ve Brom cresol purple – chalk milk agar'da 7 °C'de 10 gün inkübasyon metotları kullanılmıştır. Penicillin agar tipik *Pseudomonas* sp kolonilerinin seçilmesini sağlarken, Brom cresol purple – chalk milk agar proteolitik kolonilerin seçilmesini sağlamıştır (4).

İzlanda'da çeşitli süt ürünleriyle yapılan çalışmada ise Yeastrel milk agar'da 6 °C'de 7 gün inkübasyon sonunda psikrofil bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir (5).

Kristiansen 1983 yılında çiğ sütlerle yaptığı çalışmada *Pseudomonas* CN (Cetrimid, Nalidiksik asit) ve *Pseudomonas* CFC (Cephaloridin Fucidin,Cetrimid) besiyerini kullanmıştır. Çiğ süt örneklerine bu besiyerlerinde 25-30 °C'de 24 saat inkübasyon uygulamıştır. *Pseudomonas* CN ve *Pseudomonas* CFC besiyerinde *P.aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepacia* 'nın üreme gösterdiği saptanmıştır (6).

Brown ve Lowbury 1965 yılında yaptığı çalışmada King B ortamına %0,03 cetrimide ilave ederek modifiye bir ortam hazırlamıştır (CTA2) ve bu ortamı %0,03 cetrimide içeren Lemco base ortamı (CTA1) ile kıyaslamıştır. CTA1'de ortamında piyosiyanın üretiminin daha iyi olduğu bulunmuştur (7).

Russel (1997) yılında yaptığı çalışmada, tavuk karkaslarında *P. fluorescens* sayımında Brain heart infüsiyon broth kullanmıştır. Seçiciliğini artırmak için ml'ye 25µ gr ırgasan ilave etmiştir. Bu metodun taze tavuklarda bozunmaya neden olan bakterileri saptamada hızlı ve yararlı bir metot olduğunu belirtmiştir. Ayrıca potansiyel hayvansal gıdaların raf ömrünü belirlemede de bu ortam kullanılabilir (8).

Mickova ve arkadaşları (1989) tarafından bir yıl boyunca toplanan 203 çiğ süt ve 50 pastörize süt örneğinde *Pseudomonas*'ların izolasyonunda Kristal viole tetrazolium agar, Malaşit green ihtiva eden pepton broth, *Pseudomonas* F agar ve Cetrimide agar kullanılmıştır (9).

Çizelge 1. *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonunda çoğunlukla kullanılan ortamlar (10)

Ortamın adı	Mekanizması	Etkili Maddeler	Hassaslık / Özgünlük
Asetamid	NH ₄ salınımı ile asetamidin deaminasyonu	Asetamid	Hatalı sonuçlar olabilir. Yalnızca doğrulayıcı test olarak kullanılır.
Asparajin	Büyüme destekleyici olarak asparajin kullanımı	Asparajin	Yalnızca eleme testi
Setrimid (Pseudosel)	Kuaterner amonyum deterjanları tarafından diğer türler inhibe edilir.		
Flo agar	Fosfatlar tarafından fluoresans'ın artırılması	Ortamda hiçbir madde yok. 42 °C'de ink.	Düşük spesifiklik, zayıf eleme testi
King A (Tech)			Seçici değil, hassaslık var, özgünlük var
King B			Seçici değil, hassaslık var, özgünlük yok
Mac Conkey agar			Seçici değil, hassaslık şüpheli, fluoresans'a karşı özgün
Malaşit Green Broth	Boya tarafından diğer spesieslerin inhibisyonu	Malaşit Green	Düşük özgünlük, zayıf eleme testi
MPA ortamı			Seçicilik şüpheli, hassasiyet yok, özgünlük var
MPA-c agar			Kuvvetli seçici, hassaslık yok, özgünlük var
m-PA m-PA –B m-PA –C m-PA –D m-PA –E	Lizin deaminasyonu, sitrat ve ksilozun kullanımı	Öteki cinsler için antibiotikler	Fermentatiflerden dolayı hatalı negatifler olabilir. Hatalı pozitifler olabilir. Düşük hassaslık ve özgünlük
Fagar	Kazeinin kullanımı	Ortamda hiçbir madde yok. 42 °C'de ink.	Düşük hassaslık
P agar	Mg ⁺⁺ ve gliserol pigment oluşumunu kuvvetlendirir	Ortamda hiçbir madde yok. 42 °C'de ink.	Düşük hassaslık
Pseudomonas CN agar	NH ₄ ⁺ üretimiyle setrimidin deaminasyonu	Asetamid Nalidiksik asit	Asetamid benzeri
Pseudomonas izolasyon agar			Bütün <i>Pseudomonas</i> spp 'lere seçici, hassasiyet var, özgünlük var
C-390 agar	<i>P. aeruginosa</i> olmayanlar antimikrobiyaller inhibe eder.	C-390, antimikrobiyal	Düşük hassasiyet gösteren tipik kolonilerin gösterimine gerek var.
Skim milk agar	Proteinlerin deaminasyonu	Ortamda hiçbir madde yok. 42 °C'de ink	Düşük hassaslık ve özgünlük
Standart Metotlar	M-PA, Süt Agar, Asparagine broth, Asetamit broth	Ortamda hiçbir madde yok. 42 °C'de ink	Düşük hassaslık ve özgünlük
Warburton ortamı	<i>P. aeruginosa</i> olmayanları antimikrobiyaller inhibe eder.	Antimikrobiyal karışım	Bütünüyle çalışmalarda test edilmedi.

Macaristan'da soğutulmuş tanklardan toplanan çiğ süt örneklerinde *Pseudomonas* türleri araştırılmıştır. Bu çalışmada *Pseudomonas* türlerinin Z broth, Nitrofurantoin broth ve Ceftrimide besiyerlerinde ki üreme durumları değerlendirilmiştir. Z broth ve Nitrofurantoin broth'da *P. aeruginosa* 'nın ürettiği, *P. putrefaciens*, *P. putida* ve *P. cepacia*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. maltophilia* ve *P. diminuta* 'nın üreme göstermediği saptanmıştır (2).

Bharath ve arkadaşları (2002) *P. aeruginosa* 'nın sulardan izolasyonunda ve sayımında MacConkey agar kullanmışlardır (11).

Jayasekara ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas* ve ilgili bakterilerin popülasyonunu araştırmada PCA ve R2A agar, *Pseudomonas* agar base (PS), ceftrimidli *Pseudomonas* agar base (PSS) ve King B ortamı kullanmışlardır. PCA ve R2A agar *Pseudomonas* ve ilgili bakterilerin büyümesine fazlasıyla izin verirken, PSS agarda çoğunlukla *Pseudomonas* 'ların sayılabildiği bulunmuştur. Sayım sonuçları diğer ortamlarla kıyaslandığında PSS agar da daha az bakteri sayılabildiği görülmüştür (12).

P. aeruginosa klorlamadan zarar görmektedir. Bu nedenle yüzme havuzu sularından *P. aeruginosa* izolasyonunda ABGP (Arginin Brilliant Green Glukoz Pepton) sıvı besi yeri geliştirilmiştir. Bu ortamda arginin bulunmaktadır ve *P. aeruginosa* 'nın etkisiyle ortamın rengi gri yeşilden mavi menekşeye dönüşmektedir. Ortamda indikatör boya olarak bromtimol mavisi ve kresol kırmızısı kullanılmıştır. Bu yöntemde ya membran filtrasyon tekniği veya direkt sıvı zenginleştirme yöntemi kullanılmıştır. 37 °C'de 48 saat inkübasyon ortamının rengindeki değişimi görmek için yeterli olduğu saptanmıştır. Daha uzun sürelerde inkübasyonun yanlış sonuca götürdüğü görülmüştür (13).

Pseudomonas 'ların tür ayrımında pigment özellikleri önemli bir yer tutmaktadır. *Pseudomonas* türleri arasındaki pigment farklılıklarını belirlemek amacıyla King A (*Pseudomonas* Agar F) ve Ceftrimide Agar Base kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda ayrıca *Pseudomonas* 'ların adlandırılmasında 4 °C ve 41 °C'lerde Yeast Extract besiyerinde üreme özelliği, sukroz'dan levan oluşumu, nişasta ve jelatin hidrolizi gibi bazı biyokimyasal testlerden de yararlanılmaktadır (14). Ayrıca bu testlere ilave olarak (O/F) Glukoz Oksidasyon Fermantasyon oksidaz, katalaz, SIM besiyerinde hareketlilik 4 °C ve 41 °C'lerde Yeast Extract besiyerinde üreme özelliği, sukroz'dan levan oluşumu, glukonat oksidasyonu, nitrat redüksiyonu ve denitrifikasyonu, karbonhidrat fermentasyon testleri, nişasta ve jelatin hidrolizi gibi bazı biyokimyasal testlerden de yararlanılmaktadır (5).

Kaynaklar

- 1-Jeppesen, C.,1995. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp from food and environment. International Journal of Food Microbiology, 26:25-41
- 2-Szita,G.,1998. A novel synthetic selective culture medium for *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Veterinaria Hungarica, 38(3):187-194.
- 3-Szita,G.,1998.A novel selective synthetic acetamide containing culture medium for isolating *Pseudomonas aeruginosa* from milk. International Journal of Food Microbiology. 43:123-127.

- 4-Juff,J.S.,1973 Identification of *Pseudomonas* species isolated from milk produced in South Eastren Queensland. Journal of Applied Bacteriology.36:585-598.
- 5-Dempster,J.F., 1968. Distribution of psychotrophic microorganisms in different dairy environments. Journal of Applied Bacteriology.31:290-301.
- 6-Kristiansen, A.K., 1983. Evaluation of two selective media for rapid isolation of *Pseudomonas* strains. Danks Veterianertid Skrift. 66(3):83-91.
- 7-Brown,V.I., and Lowbury,J.L.,1965. Use of an improved Cetrimide Agar Medium and other culture methods for *Pseudomonas aerugiosa*. Journal of Clinical Pathology18,752.
- 8-Russel,S.,1997.A rapid microbiological method for enumreation of *Pseudomonas fluorescens* from broiler chicken carcasses, Journal of Food Protection,60(4):385-390.
- 9-Mickova, V., Lukasova,J., and Konencny,S.,1989. *Pseudomonas aerugiosa* in raw and pasteurized milk. Veterinary Medical(Praha),7(34):411-419.
- 10-Hardalo,C., and Edberg,S.,1997. *Pseudomonas aerugiosa* assesment of risk from drinking water. Critical Reviews in Microbiology,23 (1) :47-75.
- 11.Bharath,J.,Masodeen,M., Motilal,S., Sandy,S., Sharma,S., Tessaro,K.,Thomas,K., Umamaheswaran,M., Simeon,D.,Adesiyun,A.A.,2002. Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. International Journal of Food Microbiology. 81:53-62.
- 12-Jayasekara, N.Y.,Heard,G.M., Cox, J.M.,Fleet,G.H.,1998, Populations of *Pseudomonads* and related bacteria associated with bottled non carbonated mineral water. Food Microbiology.15:167-176.
- 13-Schubert,R.,1989. The use of Arginine Brilliant Green Glucose Peptone Broth (ABGP) medium as a primary culture medium for *Pseudomonas aerugiosa* Zentrablatt. Bakteriologie. Hygiene187,266-268
- 14-King,A., Philips,I., 1978. The identification of *Pseudomonas* and related bacteria in a clinical laboratory. International Medical Microbiology.11:165-175.